

(別紙様式第3号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: 原田 哲仁

題目: Expression and Secretion of the Stabilized and destabilized Lysozyme by Using *Pichia pastoris* Expression System and Impact of them for Amyloid Fibril Formation.

(酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いた安定化・不安定化リゾチームの発現分泌とそれら変異体がアミロイド形成に及ぼす影響)

近年問題となっているアルツハイマー病・プリオン病・パーキンソン病などの神経変性疾患は、治療法が未確立な難病の一つである。この発病機構は、原因となる変異タンパク質分子内の α -helix が β -sheet に転移することで、 β -sheet 構造の分子間重合により形成された不溶性のアミロイド線維が、組織に沈着することで起こるとされている。現在こうしたアミロイド病は 20 種類以上のタンパク質の変異によることが示されているが、これらの病気に広く共通している分子機構の解明はなされていない。ヒトリゾチーム(hLz)もまた家族性非神経性全身性アミロイドーシスの原因タンパク質であり、また鶏卵白リゾチーム(cLz)は、hLz との相同性が高く、I55T, D66H 変異体はアミロイドーシスを生じることが示されている。

本研究は、未だ明確には明らかにされていないアミロイド線維の形成機構を、古くから研究されているリゾチームを用いて解明しようとするものである。研究方法としては、原因となる変異タンパク質分子内の α -helix が β -sheet に転移することによりアミロイド線維が形成されると考えられていることから、リゾチームの α -helix を安定化・不安定化させる変異体を作成することにより、アミロイド線維形成の進行に伴い、 α -helix が β -sheet に転換する可能性とその後のアミロイド線維形成に及ぼす影響を検討することにした。そこで、まず α -helix の安定化・不安定化変異が、リゾチームの安定性に及ぼす影響について酵母発現系を用いて研究を行った。部位指定変異により、 α -helix 安定化変異体として N27D、N93D を作成し、 α -helix 不安定化変異体として K13D、K33D、K97D を作成した。これら変異体の熱安定性の測定から、 α -helix 安定化変異によって野生型よりも熱安定性の上昇がみられた。さらに、疎水性コアを強化する変異(S91T)との組み合わせによって更なる安定化がみられた。一方で、 α -helix 不安定化変異では、その熱安定性が低下していた。また、これら変異体の熱安定性と酵母発現系における分泌量に相関がみられた。

つぎに、これら変異体を用いて高温・酸性下でのアミロイド線維形成に対する影響を調べた。評価方法としては、Thioflavin-T 蛍光測定、CD による 2 次構造変化の測定、及び透過型電子顕微鏡によるアミロイド線維の確認を行った。その結果、 α -helix 安定化変異体では、 α -helix から β -sheet への転移が遅くなっており、その結果としてアミロイド線維形成が有意に遅くなっていることが明らかとなった。一方で、 α -helix 不安定化変異体は、アミロイド線維形成の促進がみられた。特に、C-Helix において、顕著にその差が確認された。このことから、リゾチームのアミロイド線維形成は、 α -helix から β -sheet への転移によって起こり、特に C-Helix がアミロイド線維形成に重要であるということが示唆された。また、このアミロイド線維形成機構は他のアミロイドタンパク質においても共通である可能性があり、このような変異導入により、その機構を明らかにすることが可能であると考えられる。