

(様式 2)

## 学位論文の概要及び要旨

氏 名                      亀田 啓                      印

題 目 タンパク質のアミロイド線維形成抑制と細胞毒性中間体の構造特性に関する研究

### 学位論文の概要及び要旨

神経変性疾患は有効な治療法のない致死性の病気である。アルツハイマー病やパーキンソン病患者の脳内には、老人斑やレビー小体といった細胞質封入体が多くあり、それらに含まれるタンパク質の凝集が神経細胞に沈着し、細胞死を引き起こすことが原因の一つであると考えられている。凝集したタンパク質は特殊で、アミロイド線維と呼ばれる $\beta$ シート構造に富んだ構造を形成している。一方、アミロイド線維は特殊な条件下において非病原性のタンパク質においても形成されることもわかっている。細胞死を引き起こす分子種については様々に議論されておりその構造は未だにわかっていない。これらのタンパク質の構造を解析するために従来は、X線結晶構造解析や電子顕微鏡 (TEM) といった手法が用いられてきた。しかしながら、X線結晶構造解析やTEMにはタンパク質の結晶化が困難であることや、乾燥しているため水溶液中の自然な状態で観察できないといった欠点がある。これらの問題を解決するために開発されたのがX線自由電子レーザーを照射することにより回折を得る手法である。X線自由電子レーザーは非結晶の物質構造を解析することに適している。また、近年これらのアミロイド線維の形成を抑制する研究が盛んに行われており、その中でアミロイド線維を抑制する効果があると報告されているものの一つにポリフェノール類がある。

本研究では、パーキンソン病の原因タンパク質である $\alpha$ シヌクレインと非病原性タンパク質として大腸菌のコシャペロンであるGroESを用いて毒性のある分子種の同定を行った。GroESについてはアミロイド線維形成抑制物質の候補を添加してその抑制効果の有無を調査した。抑制効果を示した場合、毒性の有無も調査した。本研究で用いた抑制物質候補はポリフェノール類を多く含有するビルベリーエキス (VMA) とそこから単離することができるアントシアニン類を用いた。また、毒性が強い分子種を分離してSPing-8内のSACLAにおいてX線自由電子レーザーを照射することにより回折イメージを取得することで構造解析を行った。

本研究では初めに、37°Cで振とうすることによりアミロイド線維形成実験を行った。同時にその過程の毒性評価をマウス培養細胞Neuro-2aにより行った。その結果、 $\alpha$ シヌクレインでは36 hrに、GroESでは48 hrに最も強い毒性を示すことがわかった。VMAを添加して線維形成実験を行ったGroESは、アミロイド線維の形成を濃度依存的に抑制した。さらに、VMAを添加したGroESには毒性は見られなかった。単離したVMAの成分もGroESのアミロイド線維形成を濃度依存的に抑制した。また、アミロイド

線維と特異的に結合して蛍光を発する色素Thioflavin-Tにより、その時間帯に多い分子種は $\alpha$ シヌクレイン、GroES共に成熟したアミロイド線維ではなく、アミロイド線維形成途中の中間体であることがわかった。その構造を透過型電子顕微鏡（TEM）で観察すると、50-200 nmの大きさを持ったアモルファス様凝集物が多く確認できた。

TEMでの観察は水溶液中で形成された毒性中間体の構造を正確に反映することは困難である。そこで、毒性のある状態を正確に反映可能なX線自由電子レーザーを用いて回折イメージの取得を試みた。その結果、回折イメージを位相回復するとアミロイド線維形成中間体と考えられるイメージを取得することができた。そのイメージから、中間体分子の大きさは200-1000 nmのアモルファス様の凝集物だった。それらのイメージが取得できた回折イメージには中心から対称に伸びる強弱のある縞模様の回折パターンが見られた。縞模様の回折パターンをさらに詳しく解析すると、縞模様の周期が位相回復したイメージが持つ2つの端面の距離であることが示唆された。これは従来のTEMなどの構造解析法で観察することができないX線小角散乱独特の情報である。2つの端面は、アミロイド線維が形成される過程で生じるオリゴマー構造の凝集体にモノマーのタンパク質が結合する面であることが示唆された。この構造的特徴は、 $\alpha$ シヌクレインやGroESといった異なったタンパク質間においても共通であった。これらの結果より、アミロイド線維を形成する過程はタンパク質に関わらず共通の特徴を持つ分子種を経て線維形成が行われるということが強く示唆された。これは、異種のタンパク質間で確認されているシーディング効果と深い関係があるものと思われる。さらには、牛海綿型脳症に代表されるタンパク質の伝染性にも関連づけることができる。アミロイド線維形成抑制物質が異なるタンパク質由来のアミロイド線維形成においても同様の効果を示すことは、共通した線維伸長の機構を持っていることを示唆している。これらの結果は、アミロイド線維形成機構に大きく寄与するだけでなく、神経変性疾患の治療に一助を与えるものである。