

学位論文題名

Study on the Formation of Amyloid Fibrils and its Application to Nanomaterials

(アミロイド繊維形成およびそのナノ材料への応用に関する研究)

学位論文内容の要旨

アミロイド繊維は、アミロイドーシスとして知られるアルツハイマー病やパーキンソン病等の多くの疾患に関係する、タンパク質およびペプチドの特徴的な形態である。現在、アミロイド繊維形成は医学的観点のみならず、タンパク質科学の観点からも注目されており、多くの研究が報告されている。しかしながら、アミロイド繊維形成がアミロイドーシス以外の疾病に及ぼす影響は明らかとなっていない。また、アミロイド繊維はその自己組織化能や安定な線維構造、機能化修飾の容易さ等により、機能性自己組織化ナノワイヤーの構築に有用である。しかし、アミロイド繊維のナノ材料への応用において重要な線維形成の制御は非常に困難であった。本論文では、ヒト肺がん由来変異型 p53 ペプチドのアミロイド線維形成メカニズムの解明と、その知見を基盤としてアミロイド線維形成を効果的に制御する新規方法の開発研究を実施した。

1. 生理的条件下におけるがん抑制タンパク質 p53-G334V 変異体ペプチドの凝集機構

がん抑制タンパク質 p53 は遺伝毒性ストレスに応答して細胞周期を調節する転写因子であり、p53 遺伝子の変異はヒト悪性腫瘍中最も高頻度に見られることから、p53 の変異とがん化の関係が注目されている。これまでに、p53 四量体形成ドメインのターン部分に位置する Gly334 の Val 変異がヒト肺がんにおいて報告されており、本論文では、この変異を含む四量体形成ドメインペプチド(G334V)の構造の安定性を詳細に解析した。構造変化測定およびアミロイド線維形成観察の結果、G334V は低温条件下では天然型 p53 四量体形成ドメインペプチド(WT)同様の四量体構造を形成するが、生理的 pH、温度条件下で β 優位構造の凝集前駆体へと構造変化し、アミロイド様線維を形成することを見出した。また分子モデリングにより、アミノ酸置換が側鎖の立体障害によるターン構造の不安定化を引き起こすことが示唆された。このターン構造の不安定化が β 優位構造の凝集前駆体へと構造変化につながると考えられた。さらに興味深いことに、G334V は WT とヘテロ四量体を形成し WT は G334V と共に凝集する一方、G334V への WT の混合によって G334V の凝集形成が抑制されることを見出した。これは、ヘテロ四量体形成による四量体構造の安定化によることが示唆された。このように、p53 四量体形成ドメイン中の G334V 変異が生理的 pH、温度条件下において β 優位構造の凝集前駆体を介したアミロイド線維形成を引き起こす事を明らかにした。さらに、WT-G334V のヘテロ四量体形成がアミロイド線維形成に大きく影響する事から、アミロイド形成においてアミノ酸置換とペプチドの混合が大きく影響し得ることが示唆された。

2. A β ペプチド末端へのアミノ酸付加によるアミロイド線維形成の制御

ナノテクノロジー、ナノ材料の開発には、自己組織化に基づくボトムアップ式の原子・分子の積み重ねが重要であると考えられている。原子や分子の配列をナノスケールで自在に制御する技術の開発や、望みの性質を持つ材料、望みの機能を発現するデバイスを実現するためには、ナノサイズの分子の自己組織化の制御が必須である。特に、アミロイド線維はその自己組織化能や安定な線維構造、機能化修飾の容易さ等により、機能性自己組織化ナノワイヤーの構築に有用であると期待されている。しかしながら、アミロイド線維をナノ材料としての応用するためには、線維の長さ、幅、形などの線維構造の制御が不可欠であり、構造を自在に制御できる手法が必須である。本論文では、アミロイドペプチドとしてアミロイド- β ペプチド(A β (10-35))を用い、その末端にそれぞれ性質の異なる側鎖を有するアミノ酸を付加することでアミロイド線維形成を変化させ、さらにそれらを組み合わせることで線維形成の制御を行った。非常に興味深いことに、3 残基のリシンを N 末端に付加したペプチド(K3-A β)は 20 μ m 以上の極めて長い線維を形成した。これは、これまでに報告されている中で最も長いアミロイド線維であり、ナノ材料への応用において極めて有用である。一方、1 残基のリシンを付加したペプチドは短い線維のみが観察され、付加するアミノ酸の数が異なると形成する線維の構造が異なることが示唆された。また、リシンと同じく正電荷を側鎖に持つヒスチジン、アルギニンを 3 残基 N 末端に付加したペプチドも同様に長い線維 (20 μ m 以上)を形成し、N 末端への塩基性アミノ酸の付加が長い線維の形成に有効であることを見出した。一方、酸性アミノ酸であるグルタミン酸の付加ペプチド(E3-A β)は非修飾の A β (10-35)に比べ線維形成が速く、アミノ酸付加は線維構造のみではなく線維形成速度にも影響することが示された。他の各種アミノ酸の付加ペプチドについても観察を行った結果、付加したアミノ酸がアミロイド線維の構造および形成速度に大きく影響することが明らかとなり、ペプチド末端へのアミノ酸付加が線維形成の制御に有用である事が示唆された。さらに、異なる付加ペプチドを混合することにより線維構造、線維形成速度のさらなる制御が可能になることを見出した。これらの手法を用いて、導電性ナノワイヤーへの応用を目指し、構造を制御した線維上への金ナノ粒子(AuNP)の結合を行った。Au-S 結合を介してアミロイド線維上に AuNP を固定するため、 α リポ酸を K3-A β の N 末端に付加したペプチド(Lip-K3-A β)を用いた。Lip-K3-A β 単独では短い線維のみ形成したが、他のアミノ酸付加ペプチドと混合することで、導線として有用な長い線維を形成した。さらに金コロイド溶液とインキュベーションすることで線維上へ AuNP を結合させ整列することに成功した。

アミロイド線維形成のメカニズムの解明と線維形成の制御は、多くの重篤な疾患との関連のみならずアミロイド線維のナノ材料への応用においても重要である。本論文では、ヒト肺がんにおいて報告された p53 の G334V 変異を含むペプチドのアミロイド形成を見出し、そのアミロイド形成メカニズムを示した。また、アミロイド形成においてアミノ酸置換とペプチドの混合が大きく影響し得ることが示唆された。この結果は、いわゆるアミロイドーシス以外の疾病にもアミロイド線維形成によるタンパク質機能の不全が関与していることを示唆するものであり、p53 の G334V 変異体をターゲットとした抗がん剤の開発において重要な知見となると期待される。さらに、この知見を踏まえ、各種アミノ酸の付加によりアミロイドペプチド末端の電荷等の物理的性質を変え、さらに数種のペプチドを混合することにより、アミロイド線維の構造および形成速度を制御し得ることが示唆された。さらに、本手法により構造を制御したアミロイド線維上への機能性分子の結合が可能となり、自己組織化に基づく機能性ナノワイヤーの構築に非常に有用である

事が示唆された。この手法を展開することで、構造を制御したアミロイド線維の空間的に制御された新規ナノ材料への応用が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 坂 口 和 靖
副 査 教 授 魚 崎 浩 平
副 査 教 授 石 森 浩 一 郎
副 査 准 教 授 今 川 敏 明

学 位 論 文 題 名

Study on the Formation of Amyloid Fibrils and its Application to Nanomaterials

(アミロイド繊維形成およびそのナノ材料への応用に関する研究)

アミロイド繊維は、アミロイドーシスとして知られるアルツハイマー病やパーキンソン病等の多くの疾患に関係する、タンパク質およびペプチドの特徴的な形態である。現在、アミロイド繊維形成はタンパク質科学の観点からも注目され多くの研究が報告されており、アミロイドーシス非関連タンパク質の *in vitro* でのアミロイド形成が多数報告されている。しかし、アミロイド繊維形成がアミロイドーシス以外の疾病に及ぼす影響は明らかとなっていない。また、アミロイド繊維は自己組織化に基づく機能性ナノワイヤーの構築に有用であると期待されているが、ナノ材料への応用において重要な繊維形成の制御は非常に困難であった。そこで申請者は、アミロイドーシス非関連タンパク質である p53 由来変異型ペプチドのアミロイド繊維形成メカニズムの解明を行い、そこで得た知見を基盤としてアミロイド繊維形成を効果的に制御する新規方法の開発研究を実施した。

本論文は四章で構成されている。

第 1 章では、アミロイド繊維形成と疾患との関連、アミロイド繊維の構造、繊維形成のメカニズム、アミロイド繊維の材料科学への応用等に関して現在までに報告された研究について総括している。さらに、本研究の目的を示しその重要性を述べている。

第 2 章では、がん抑制タンパク質 p53 由来変異型ペプチドのアミロイド繊維形成メカニズムの解明を行っている。初めに、ヒト肺がんにおいて報告された p53 四量体形成ドメイン中の変異に注目し、この変異を含むペプチド(G334V)の構造安定性を詳細に解析している。構造変化測定およびアミロイド繊維形成観察の結果、G334V は低温条件下では天然型 p53 四量体形成ドメインペプチド(WT)同様の四量体構造を形成するが、生理的 pH、温度条件下で β 優位構造の凝集前駆体へと構造変化し、アミロイド様繊維を形成することを見出している。また分子モデリングにより、アミノ酸置換が側鎖の立体障害によるターン構造の不安定化を引き起こすことが示唆され、このターン構造の不安定化が β 優位構造の凝集前駆

体へと構造変化につながる凝集メカニズムを明らかにしている。さらに興味深いことに、G334V が野生型ペプチド(WT)とヘテロオリゴマーを形成し、WT が G334V と共に凝集することを見出している。本研究で得られた知見は、p53 の G334V 変異体をターゲットとした抗がん剤の開発への展開が期待される。また、単独ではアミロイド形成能を有していない WT が G334V 存在下において凝集する事から、ペプチドの混合がアミロイド形成に大きく影響することに着目し、アミロイド線維形成の新規制御法の開発への展開について述べている。

第 3 章では、アミロイド線維形成の新規制御手法の開発を行っている。ナノテクノロジー、ナノ材料の開発には、自己組織化に基づくボトムアップ式の原子・分子の積み重ねが重要であると考えられており、原子や分子の配列をナノスケールで自在に制御する技術の開発や、望みの性質を持つ材料、望みの機能を発現するデバイスを実現するためには、ナノサイズの分子の自己組織化の制御が必須である。特に、アミロイド線維はその自己組織化能や安定な線維構造、機能化修飾の容易さ等により、機能性自己組織化ナノワイヤーへの応用が期待されている。しかしながら、アミロイド線維をナノワイヤーとするためには、線維の長さ、幅、形などの線維構造の制御が不可欠であり、構造を自在に制御できる手法が必須である。本論文では、アミロイドペプチドとしてアミロイド- β 由来の A β (10-35)を用い、その末端にそれぞれ性質の異なる側鎖を有するアミノ酸を付加することでアミロイド線維形成を変化させ、さらにそれらを組み合わせることで線維形成の制御を行っている。非常に興味深いことに、3 残基のリシンを N 末端に付加したペプチド(K3-A β)が 20 μm 以上の極めて長い線維を形成する事を見出している。これは、これまでに報告されている中で最も長いアミロイド線維であり、ナノ材料への応用において極めて有用と期待される。一方、グルタミン酸付加ペプチドは非修飾の A β (10-35)に比べ線維形成が速く、アミノ酸付加が線維構造のみではなく線維形成速度にも影響している事を示唆している。他の各種アミノ酸の付加ペプチドについても観察を行った結果、付加したアミノ酸がアミロイド線維の構造および形成速度に大きく影響することを示し、ペプチド末端へのアミノ酸付加が線維形成の制御に有用であることを明らかにした。さらに、異なる付加ペプチドを混合することにより線維構造、線維形成速度を効果的に制御可能であることを見出している。これらの手法を用いて、導電性ナノワイヤーへの応用を目指し、構造を制御した線維上への金ナノ粒子(AuNP)の結合を行っている。本研究では、Au-S 結合を介してアミロイド線維上に AuNP を固定するため、 α リポ酸を K3-A β の N 末端に付加したペプチド(Lip-K3-A β)を用いている。Lip-K3-A β 単独では短い線維しか形成しないのに対し、他のアミノ酸付加ペプチドと混合することで、導線として有用な長い線維を形成している。さらに金コロイド溶液とインキュベーションすることで線維上へ AuNP を結合させ整列することに成功している。これをさらに展開することで、導電性ナノワイヤーへの応用が期待される。

第 4 章では、本研究で得られた結果の総括と、今後の展開について述べている。

本論文で行ったアミロイド線維形成のメカニズムの解明と線維形成の制御は、アミロイド線維形成と多くの重篤な疾患との関連や、アミロイド線維自己組織化に基づく機能性ナノワイヤーへの応用において重要な知見であり、新規抗がん剤等の創薬やボトムアップ式のナノテクノロジーの発展へ貢献するところ大なるものがある。関連原著論文は 2 編あり、英文で国際誌に掲載されている。よって審査員一同は、申請者が北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと判定した。