

論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨の公表

学位規則第 8 条に基づき、論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

フリガナ 氏名	サカグチ ユウコ 坂口 裕子		授与番号 甲 第 1356 号
学位の種類	博士(薬学)	授与年月日	2019 年 9 月 25 日
学位授与の要件	本学学位規程第 18 条第 1 項該当者(学位規則第 4 条第 1 項)		
博士論文の題名	ヒトプリオンタンパク質の C-端領域の構造と性質に関するペプチド化学的研究		
審査委員	(主査) 豊田 英尚 (立命館大学薬学部教授)	井之上 浩一 (立命館大学薬学部准教授)	
	土肥 寿文 (立命館大学薬学部教授)		
論文内容の要旨	<p>本論文の 2.1 節、2.2 節および 2.3 節ではヒトプリオンタンパク質(hPrP)の C-端領域のペプチドの性質を検討し、hPrP180-192 ペプチドが自己凝集すること、およびそれが Cu^{2+} の共存によって抑制されることを明らかにした。興味深いことに、一旦凝集した後に Cu^{2+} を添加することで、その凝集体が可溶化することも示された。日本人の遺伝性プリオン病では、hPrP の 180 番目のアミノ酸がバリン(Val)からイソロイシン(Ile)に変異した hPrP180-192 V180I 構造が最も高頻度に見出される。そこで 2.4 節、2.5 節および 2.6 節では hPrP180-192 V180I ペプチドと正常型である hPrP180-192 ペプチドの比較を行った。自己凝集をおこすこと、および Cu^{2+} の共存によってそれが抑制されることは同様であったが、hPrP180-192 V180I ペプチドでは、一旦凝集した後に Cu^{2+} を添加しても可溶化が起こらないことが示された。この結果は、hPrP180-192 V180I ペプチド内のポイントミューテーションによって、銅代謝の異常による凝集体の蓄積がおきやすくなっていることを意味しており、プリオン病の発症メカニズム解明が大きく進展した。</p> <p>プリオン病は、正常細胞タンパク質(PrP^C)からプロテアーゼ耐性のアイソフォーム(PrP^{Sc})へのミスフォールディングによって引き起こされる神経変性疾患である。この構造変化には、ヒスチジン残基への Cu^{2+} の結合が関与すると考えられている。しかしながら、PrP の凝集メカニズムは、溶解性や凝集性、そして立体構造や変異の多様性などの PrP の物理的特性を解析する必要があるため、明確にされていない。本研究では、構造変化と凝集における PrP の C-端領域の役割の解明を試みた。合成フラグメントペプチドである ヒト-PrP180-192 (hPrP180-192) と点変異体の hPrP180-192 V180I の物理的および生理学的特性を、円二色性スペクトル、高速液体クロマトグラフィー、AFFINIX QN μ 水晶振動子マイクロバランスおよびチオフラビン T 染色法を用いて、Cu^{2+} の影響を含めて検討した。hPrP180-192 と hPrP180-192 V180I の二次構造は、Cu^{2+} 非存在下の緩衝液中で random coil から β-sheet/β-strand へ変化した。さらに、両ペプチドで分子間相互作用と凝集がみとめられ、それらは Cu^{2+} によって抑制されることが判明した。しかしながら、凝集した hPrP180-192 と hPrP180-192 V180I に対する Cu^{2+} の効果は完全に異なっていた。すなわち、凝集した hPrP180-192 の二次構造は Cu^{2+} の添加により β-sheet から random coil に戻ったが、hPrP180-192 V180I は戻らなかった。以上より、hPrP180-192 を含む PrP の C-端領域は、PrP^C から PrP^{Sc} への構造変化に重要な役割を果たすと考えられた。さらに、V180I の点変異</p>		

	<p>は、プリオン病の重大な原因の一つであると結論された。これらの結果は、PrP の凝集メカニズムにおける核依存重合説を支持していた。</p>
<p>論文審査の結果の要旨</p>	<p>現在の分子生物学的研究手法を用いれば、プリオン病の研究のために全長プリオンタンパク質を用いることは可能であるが、きわめて凝集性が高いことや、感染の危険性を考慮すると、物理化学的性質を検討するための実験材料とすることは難しい。そこで本研究では、フラグメントペプチドを用いた精密な実験を行っている。CD スペクトルの測定、AFFINIX QNμによる分子間相互作用の測定、ペプチド固定化ビーズを用いた Pull down assay、HPLC を用いた可溶化ペプチドの分析、チオフラビン T 染色法を用いた凝集性の検討を通じて、C-端領域のペプチドの物理化学的性質を解析した。その結果、hPrP180-192 ペプチドと、日本人の遺伝性プリオン病患者で高頻度に存在する hPrP180-192 V180I ペプチドの凝集における Cu²⁺の作用が大きく異なることを見出した。この研究成果は、プリオン病発症メカニズムの解明に大きく貢献しており高い評価に値する。</p> <p>本論文の審査に関しては、2019 年 7 月 6 日(土)に公聴会を開催し、学位申請者による論文内容の説明の後、審査委員は学位申請者に対する口頭試問を行った。各審査委員および公聴会参加者より、実験に用いたペプチドの選択理由や実験手法の細部に関する質問があった。また、さらに研究を進展させるために、NMR スペクトルを測定する工夫の必要性や、糖鎖付加による影響を考慮した実験の必要性の説明を求められた。いずれの質問に対しても学位申請者の回答は適切なものであった。</p> <p>以上により、公聴会での口頭試問結果を踏まえ、審査委員会は、本論文は本研究科の博士学位論文審査基準を満たしており、博士学位を授与するに相応しい水準に達しているとの判断で一致した。</p>
<p>試験または学力確認の結果の要旨</p>	<p>本論文の公聴会は、2019 年 7 月 6 日(土)11 時 00 分～12 時 00 分にサイエンスコア 5 階会議室において行われた。</p> <p>学位申請者は、本学学位規程第 18 条第 1 項該当者であり、主査および副査は、論文内容および公聴会での質疑応答を通して、学位申請者が十分な学識と、博士学位に相応しい能力を有していることを確認した。</p> <p>以上の点を総合し、学位申請者:坂口裕子に対して、本学学位規程第 18 条第 1 項に基づいて、「博士(薬学 立命館大学)」の学位を授与することが適当であると判断する。</p>