HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Investigation on the Effect of Flow Field on the Amyloid Fibril Formation [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	SHARMA, Rajesh Kumar
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11555号
Issue Date	2014-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57282
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Rajesh_Kumar_Sharma_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（**生命科学**）　　氏　名　　Rajesh Kumar Sharma

審査担当者	主　査	特任教授	佐々木直樹
	副　査	教　授	出　村　誠
	副　査	准教授	福井彰雅
	副　査	助　教	古澤和也

学 位 論 文 題 名

Investigation on the Effect of Flow Field on the Amyloid Fibril Formation
(アミロイド線維形成に及ぼす流動場の効果に関する研究)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

アミロイド線維とは変性タンパク質が巻戻りにより到達する非天然型線維構造である。多くのタンパク質やペプチドがアミロイド線維を形成することから、アミロイド線維はタンパク質の種類によらない、普遍的な構造形態であると考えられる。形成された線維の安定性から、近年新規バイオマテリアルとしての応用も期待されている。アミロイド線維の形成機構は核形成・成長型とされているが、核形成から成長に至る過程については、不明な点が多い。線維形成反応過程が明らかになれば、工業的応用に資することはもとより、アミロイドーシスの根本治療への道も開けることも予想される。近年、アミロイド線維形成に影響を及ぼす因子として、流動場や還元糖の存在が挙げられている。本学位論文著者は、これらの因子を制御して、アミロイド線維形成反応を調べることで、反応過程を明らかにすることが可能ではないかと考えた。

本論文は、β-lactogroblin (βLG)を前駆体タンパク質として線維形成反応を調べ、線維形成機構を明らかにすることを目的とした。特に核形成から成長過程に移行する初期過程を調べるために、βLG 溶液のインキュベーション時における流動場の効果を測定した。流動場としては、マグネチックスターラーによる撹拌を利用した。0 rpm, 250 rpm, 474 rpm の 3 種類を用いた。最大せん断歪速度はそれぞれ 96 s^{-1}, 183 s^{-1} に対応する。アミロイド線維は、線維軸に垂直にβシートが規則正しく並ぶクロスβ構造を持つ。この構造から、アミロイド線維溶液は、強い流動複屈折を発生することが予測される。著者は線維形成をモニターするために伸長流動複屈折法を用いた。この方法は、従来の流動複屈折法と同様回転拡散係数から線維長を決定できるのに加え、線維の屈曲性を吟味することが可能である。一旦線維ができた後は、アミロイド線維は上の様な構造を取り安定化する。この状態に物性・構造測定のために加える流動場は、線維そのものには影響を及ぼさないことが予想されていたが、著者により実際に確かめられた。流動複屈折パターンから、得られた線維は剛体棒状であることが確認され、更に線維の回転拡散係数が求められた。

これら流動複屈折実験の詳細な結果から、著者は撹拌による流動場が核形成・成長を促進し、最適の流動場が 250 rpm 付近であることを見出した。この一方で、同じ試料溶液中の生成物の原子間力顕微鏡(AFM)観測を行った。AFM 画像から作成したアミロイド線維の長さのヒストグラムは、流動複屈折実験の結果から予想された線維長の流動場依存性とよく対応した。更に、線維長のヒストグラムは、Knowles 等の提案している、成長線維の部分的切断・二次核

化を考慮した線維形成反応方程式が予測する結果にも対応していることが明らかになった。これを受けて著者は、蛋白質モノマーの衝突による核形成過程、核同士の衝突による線維成長過程、成長線維の部分開裂過程、開裂線維を二次核とした線維成長過程など、線維形成反応の各素過程での物輸送現象に、流動場がポジティブに効いているという立場で解析を行った。この結果、流動場は歪速度依存的にアミロイド線維形成過程において、核形成過程の短縮をもたらし、線維成長速度を増加させることが予測された。流動複屈折実験の結果は、この予測を裏付けるものであることが明らかになった。

これを要するに、著者は伸長流動複屈折法を用いアミロイド線維形成過程に及ぼす流動場の効果を実験的に調べ、線維形成反応で考えられるほぼすべての素過程に流動場が歪速度依存的に働いていることを見出した。更に、線維形成に対する最適な歪速度を見出し、流動場による線維形成反応の制御の可能性を示し、工業的応用時の品質制御やアミロイドーシス治療への糸口を提示した。

よって著者は、北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格あるものと認める。