

内容の要旨及び審査結果の要旨

平成 28 年 2 月 5 日

氏名	佐藤 大輔
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	甲第 139 号
学位記の授与日	平成 28 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 創価大学大学院学則第 31 条第 2 項該当 創価大学学位規則第 3 条の 3 第 1 項該当
論文題目	時間分解X線小角散乱によるフェリチン・アセンブリメカニズムの研究
論文審査機関	工学研究科委員会
論文審査委員	主査委員 理学博士 池口 雅道 委員 医学博士 丸田 晋策 委員 博士（工学） 松山 達

<論文の内容の要旨>

生体内にはリボソームやヌクレオソームなど超分子と称される巨大な構造体が多数存在する。これらの超分子構造体は一般に単一の分子により構成されるのではなく、多数の分子が自己組織化することによって構築されている。その自己組織化メカニズムは古くから生物物理学分野の研究対象であるが、現在でも完全には明らかにされていない。

提出された学位請求論文は、生体内の鉄貯蔵に関わるフェリチンという超分子の自己組織化（アセンブリ）メカニズムを時間分解X線小角散乱（TR-SAXS）という手法を用いて研究した成果を纏めたものである。フェリチンは細菌、動物、植物を問わずほとんどの生物種が持っているタンパク質で、共通に 24 個のサブユニットが球殻状にアセンブルした構造を持っている。

論文は 4 章から構成されており、第 1 章ではタンパク質の立体構造を概説した上で、ウィルス・キャプシドのアセンブリを含むタンパク質のアセンブリ研究に関しての歴史と現在知られている知見を解説するとともに、本論文の研究対象であるフェリチンというタンパク質についての知見を述べている。

第 2 章では申請者が TR-SAXS という手法を用いる着想に至った経緯、すなわち第 3 世代放射光施設により高輝度 X 線が得られるようになった点、最新の X 線検出器のデータ取り込み時間の改良などが述べられた上で、X 線による蛋白質試料の損傷の検討など実験方法の詳細が記述されている。これらの検討の上で実験が行われ、ミリ秒から数百秒にわたる時間域で起こるフェリチンのアセンブリ反応の全体を観測することに成功したことが述べられている。さらには反応のタンパク質濃度依存のデータから反応次数を推定し、2 次反応と 3 次反応に限定できると結論している。その結論に基づき、結晶構造から推定される全ての中間体を考慮して可能なアセンブリ・モデルを提案している。観測された実験結果は提案されたモデルにより概ね再現されており、モデルの妥当性が示されている。

第 3 章ではフェリチンの様な同一のサブユニットが多数集まる反応ではサブユニット同士の電荷間の静電反発がアセンブリの障壁となるであろう点に着目し、TR-SAXS により観測されるアセンブリ反応が溶液の pH やイオン強度にどのように依存するかを観測し、サブユニットの正味電荷間の静電的な反発により説明されると推測している。その仮説を証明するために、部位特異的変異により、サブユニット界面から離れて表面に露出した解離性残基を電荷の無い残基に置換することで、正味電荷数を変化させた変異体をいくつか調製し、そのアセンブリ反応を TR-SAXS により追跡している。その結果、アセンブリ速度は正味電荷の減少に伴って上昇するこ

とを明らかにし、仮説が正しいことを示している。しかし、イオン強度の高い場合には正味電荷間の反発は無視できるようになり、局所的な静電相互作用が中心になることも明らかにしている。

第4章では総括として、ホモオリゴマーのアセンブリ・メカニズムに関して議論し、フェリチン同様の球殻構造をとるウィルス・キャプシドのアセンブリでは一般に遅延相（ラグ）が観測されるのに対して、フェリチンのアセンブリではラグが生じない原因などについて議論を展開している。

<論文審査結果の要旨>

申請者は、近年、第3世代放射光施設において強力なX線が得られるようになったこと、フォトン数計測型のX線検出器が開発されたことに着目し、フェリチンのアセンブリ反応をSAXSにより高い時間分解能で直接観測することを試み、従来不可能だった観測に成功している。このような観測は世界初の観測と言って良く、顕著な研究成果である。また、提出された論文はこの新規な観測データに基づいて、フェリチンのアセンブリ・メカニズムについて可能なすべての中間体を考慮したモデルを提案しており、フェリチンのアセンブリ・メカニズムの理解を大きく前進させるものである。さらにアセンブリ反応におけるサブユニットの電荷間の反発に関する考察は、フェリチンのみならずホモオリゴマーのアセンブリに共通する問題に対して、一定の解答を示しており、本論文は博士（工学）の学位論文として十分な価値を有するものと認める。

なお、本論文の一部はアメリカ化学会が発行する学術雑誌に下記の論文2編として掲載されている。

- 1) Ferritin Assembly Revisited: A Time-resolved Small-angle X-ray Scattering Study
Sato, D., Ohtomo, H., Yamada, Y., Hikima, T., Kurobe, A., Fujiwara, K. & Ikeguchi, M.
Biochemistry (2016) 55, 287-293
- 2) Electrostatic Repulsion during Ferritin Assembly and its Screening by Ions
Sato, D., Takebe, S., Ohtomo, H., Kurobe, A., Fujiwara, K. & Ikeguchi, M.
Biochemistry (2016) 55, 482-488