



Elucidation of the multistep process of amyloid fibril formation

柚, 佳祐

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Date of Publication)

2026-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8855号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490080>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(別紙様式 3)

論 文 内 容 の 要 旨

氏 名 柚 佳祐

専 攻 化学

論文題目 (外国語の場合は, その和訳を併記すること。)

Elucidation of the multistep process of amyloid fibril formation

(アミロイド線維の多段階的形成プロセスの機構解明)

指導教員 茶谷 絵理

Protein misfolding induces aberrant aggregation, and often results in the formation of amyloid fibrils that are associated with more than 40 amyloidoses and neurodegenerative diseases, including Alzheimer's and Parkinson's diseases. Amyloid fibrils typically show needle-like morphology and cross- β structure with β -strands stacked perpendicular to the long axis of the fibril. Amyloid fibril formation proceeds by nucleation and subsequent growth. However, the details of the process of amyloid fibril formation have not been fully understood. In this thesis, I have investigated the formation process of amyloid fibrils focusing on the multistep nature of amyloid fibril formation, in terms of early aggregation process (Chapter 2), structural propagation process (Chapter 3), and amyloid formation process inside condensate (Chapter 4).

In Chapter 2, I have investigated the early aggregation process of bovine and human insulin by static and dynamic light scattering in combination with thioflavin T fluorescence and Fourier transform infrared spectroscopy. The time dependence of light scattering has revealed that oligomers and protofibrils form in bovine insulin, in contrast to no significant aggregation in human insulin. By focusing on bovine insulin for kinetic analysis, it has been revealed that the protofibril formation process was divided into two steps with reference to fractal dimension. When modeled the experimental data of static and dynamic light scattering based on the Smoluchowski aggregation kinetics with fractal aggregation and end-to-end association, I found the initial formation of spherical oligomers and their subsequent uniaxial docking. Furthermore, the analysis of temperature and salt concentration dependence revealed that the end-to-end association is the rate-limiting step, where structure organization occurred with dehydration. The established model for protofibril formation where oligomers are incorporated as a precursor provides insight into the molecular

mechanism how protein molecules assemble during the early stage of amyloid formation.

In Chapter 3, I have investigated the behaviors of self- and cross-seeding of amyloid fibrils of human and bovine insulin in terms of thioflavin T fluorescence, morphology, secondary structure, and iodine staining. Insulin amyloid fibrils exhibited different structures depending on species, and each of which replicated in self-seeding. In contrast, gradual structural changes were observed in cross-seeding, and a new-type amyloid structure with distinct morphology and cytotoxicity was formed when human insulin was seeded with bovine insulin fibrils. Remarkably, iodine staining tracked changes in amyloid structure sensitively, and singular value decomposition analysis of the ultraviolet-visible absorption spectra of the fibril-bound iodine has revealed the presence of one or more intermediate metastable states during the structural changes. From these findings, I propose a propagation scheme with multistep structural changes in cross-seeding between two heterologous proteins, which is accounted for as a consequence of the rugged energy landscape of amyloid formation.

In Chapter 4, I focused on optical trapping as a method for spatiotemporal control of protein droplet formation and subsequent amyloid fibril formation. Droplet-like protein condensates have recently attracted much attention due to their critical roles in biological phenomena. They typically exhibit high fluidity and reversibility, but otherwise, they become reaction sites for the formation of amyloid fibrils. To understand the functionality and pathogenicity of protein condensates, it is critical to investigate their physicochemical properties at the single droplet level; however, this is currently difficult due to the lack of applicable methods, and thus the molecular details behind these processes are largely unknown. Here, we demonstrate

that optical trapping is capable of inducing the formation of a single liquid-like condensate of α -synuclein in a spatiotemporally controlled manner. The irradiation of tightly focused near-infrared laser at an air/solution interface formed a condensate in the coexistence of polyethylene glycol. The fluorescent dye-labeled imaging showed that the optically induced condensate has a gradient of protein concentration from the center to the edge, suggesting that it is fabricated through the mechanism of optical evolved assembling. Furthermore, Raman spectroscopy and thioflavin T fluorescence analysis revealed that continuous laser irradiation induces transition inside the condensate to β -sheet rich structure, ultimately leading to the formation of amyloid fibrils. These observations indicate that optical trapping is a powerful technique for tracking the molecular mechanisms of condensate appearance and growth, and furthermore, subsequent aging leading to amyloid fibril formation.

氏名	柚 佳祐		
論文 題目	Elucidation of the multistep process of amyloid fibril formation (アミロイド線維の多段階的形成プロセスの機構解明)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	准教授	茶谷 絵理
	副 査	教授	内野 隆司
	副 査	教授	大西 洋
	副 査	准教授	田村 厚夫
要 旨			
アミロイド線維はタンパク質の凝集体の一種であり、細長い形状と線維軸に対してβストランドが直交するクロスβ構造を特徴的に示す。アミロイド線維は様々な神経変性疾患やアミロイドーシスに関与することが知られており、その形成メカニズムに関する研究が進められている。アミロイド線維の基本的な形成スキームは、核形成とそれに続く線維成長によって説明される。しかし今日まで、個々の段階のプロセスの詳細は明らかにされていない。 そのような折、最近では核形成相におけるオリゴマー種の形成のようなアミロイド線維形成における準安定状態の存在が確認され始めており、形成プロセスの途中段階の観測が重要な研究項目として注目を集めている。柚 佳祐氏の本学位論文は、以下のようなアミロイド線維の多段階的な形成ステップを追跡及び解析し、機構解明を行っている。 本学位論文は、全体として五章から構成され、各章の内容は以下のとおりである。 第一章は、序章である。アミロイド線維とアミロイドーシスの関連や、アミロイド線維の一般的な形成スキーム、さらに本学位論文でアミロイド線維の多段階的形成プロセスに着目するに至った研究背景を述べている。 第二章では、アミロイド線維の形成初期段階に着目し、ウシ由来およびヒト由来インスリンを用いてプロトフィブリルの形成プロセスの解析を行った成果を述べている。まず、チオフラビンT蛍光アッセイ及びフーリエ変換赤外分光法による解析を通して、ウシ由来インスリンは特徴的な急速な初期凝集を伴うアミロイド線維形成を示すが、ヒト由来インスリンでは典型的なラグ相を有するという、由来種によるアミロイド線維経路の違いを示した。さらに定量解析に適した単分散的発達を示したウシ由来インスリンの初期凝集に着目し、静的及び動的光散乱法により観測したサイズおよび形状変化に対して、Smoluchowski凝集式に基づくモデリングを実施した。その結果、実験データを再現することに成功し、球状のオリゴマー形成とその後の脱水和を伴うオリゴマーの一軸ドッキングによるプロトフィブリルの多段階形成を明らかにしている。 第三章では、アミロイド線維の成長段階に着目し、シーディング反応における構造伝播プロセスの解析を行っている。ウシ由来及びヒト由来インスリンを自発線維化させたところ、両者は異なる構造を形成することを明らかにしたうえで、同一種でのシーディング（セルフシーディング）と異種でのシーディング（クロスシーディング）を行い、構造伝播プロセスを調べている。このとき、チオフラビンT蛍光アッセイやフーリエ変換赤外スペクトルなどの手法に加え、ヨウ素染色したサンプルの紫外可視吸収スペクトル測定を独自に適用しており、その特異値分解により構造変化の追跡に成功している。解析結果より、セルフシーディングでは構造伝播の際に構造が強固に複製されるが、クロスシーディングでは多段階的に構造が変化することを実証した。 第四章では、最近新たなアミロイド線維の形成場として注目を集めているタンパク質液滴の解析を行っている。まず集光レーザーを用いた光トラッピングを用いてαシヌクレインの液滴を時空間的に生成させ、一液滴レベルでの解析が可能な条件を確立している。生成した液滴は流動性と可逆性を有していたが、継続的なレーザー照射による液滴サイズの直線的な増大と液滴内部のタンパク質濃度の加速的な増加と			

氏名	柚 佳祐
もに、次第に液滴は固化し始めることを見出した。またラマン分光法やチオフラビンT 蛍光イメージングにより、固化した液滴はその後アミロイド線維を形成することを示し、液滴状態から固体状のアミロイド線維への多段階な構造変化プロセスの存在を突き止めている。 第五章では、論文の総括および今後の展望が述べられている。 以上のように、本研究は、アミロイド線維の形成プロセスに伴う多段階的な構造変化を研究したものであり、アミロイド線維形成の分子機構について未解明な側面に迫り、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の柚 佳祐は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。	