

実施課題名 アミロイド構造を伝達する豚SAAペプチドの立体構造の解明

【背景】

異なるタンパク質間でアミロイド線維形成が誘導されるcross seedingは、アミロイド構造の伝達と考えられ、伝達機序の解明には構造解析が必須である。本課題では豚のAAアミロイドを対象とし、cross seedingを誘導するアミロイド線維の立体構造を明らかにすることを目的とした。

【実施内容】

立体構造パイプラインにて、豚SAAの野生型、変異型N末端ペプチド14,12残基の $^{13}C^{15}N$ 標識体を作成し、His精製にて高純度ペプチドを得た。各標識体ペプチドの収量を上げるために、ペプチド配列が連続したタンデム配列プラスミドを用い、各ペプチドについて約10mgを回収した。各ペプチドを3mMの濃度で10%酢酸中で反応させると、電子顕微鏡で線維状構造物の形成が確認された。変異型ペプチドは直鎖状の典型的なアミロイド線維を形成したが、野生型ペプチドは不規則に折れ曲がった線維を形成し、線維構造に違いが観察された。アミロイド線維と考えられる変異型ペプチドが形成した線維状構造物3mgを超遠心により沈殿させた後に乾燥させ、固体NMR測定試料とした。DARR法にて測定したところ、シグナルは得られたがピークは高度にブロードであった。この結果から、形成された線維には構造多型が存在することが示唆された。

● Fig.1

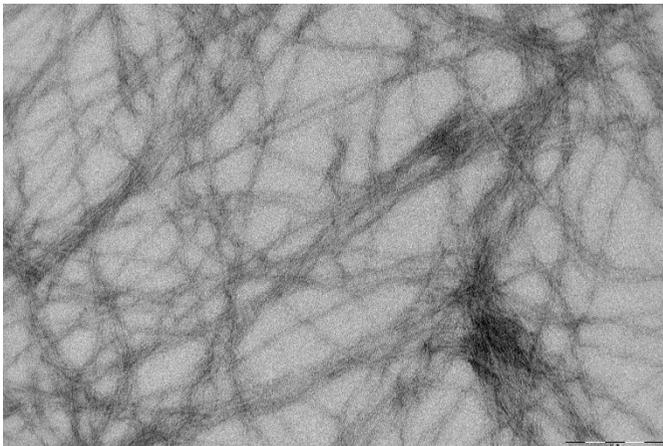


Fig.1 豚の変異型SAAのN末端ペプチドにより形成されたアミロイド線維の電子顕微鏡像。

● Fig.2

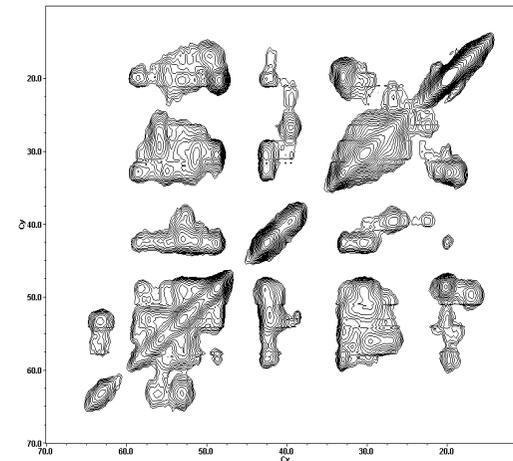


Fig.2 豚の変異型SAAのN末端ペプチドにより形成されたアミロイド線維の二次元交換NMRスペクトル(DARR)。

NMR 共用プラットフォーム 特定課題利用
利用報告書

申請番号	PF023	課題受付番号	PF15-100-009
実施機関名	麻布大学		
実施部署名	獣医学部 獣医学科 病理学研究室		
実施責任者管理職名・氏名	職名	准教授	氏名 上家潤一
実施部署所在地	〒252-5201 神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71		
利用課題名	アミロイド構造を伝達する豚 SAA ペプチドの立体構造の解明		
本課題の概要・目的 (字数制限はありませんが 400字～600字以内(程度)で お書きください。)	異なるタンパク質間でアミロイド線維形成が誘導される cross seeding は、アミロイド構造の伝達と考えられ、伝達機序の解明には構造解析が必須である。本課題では豚の AA アミロイドを対象とし、cross seeding を誘導するアミロイド線維の立体構造を明らかにすることを目的とした。豚の AA アミロイドを形成する SAA タンパク質には、野生型および変異型 SAA が存在し、変異体のみが形態学的に典型的なアミロイド線維を形成する。これまでに申請者らは豚の SAA の N 末端がアミロイド線維形成に重要であることを見出していることから、本課題では、野生型および変異型 SAA の N 末端ペプチドが形成する線維について、固体 NMR による測定を実施した。本課題は大陽日酸株式会社との連携による「産学連携研究による若手高度専門家の育成」課題である。		
利用実施時期、及び期間	平成 27 年 8 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日 総利用日数： 10 日 当初計画どおり・当初計画変更 (変更理由)		
利用施設 理化学研究所	NMR 装置 (該当部分に ○)	利用装置① ・ () 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、() 溶液 800MHz、() 溶液 900MHz (○) 固体 700MHz、() 固体 900MHz 利用期間 1：平成 27 年 12 月 11 日～平成 27 年 12 月 13 日 利用期間 2：平成 28 年 2 月 19 日～平成 28 年 2 月 21 日 利用期間 3：平成 28 年 2 月 29 日～平成 28 年 3 月 3 日	
	立体構造解析 パイプライン	・ 発現確認 : 利用回数 0 回 ----- ・ フォールド判定 : 利用回数 0 回 ----- ・ 大量調製 : 利用回数 4 回	
その他の 利用施設			

成果の概要	実施内容	<p>立体構造パイプラインにて、豚 SAA の野生型、変異型 N 末端ペプチド 14, 12 残基の ¹³C¹⁵N 標識体を作成し、His 精製にて高純度ペプチドを得た。各標識体ペプチドの収量を上げるために、ペプチド配列が連続したタンデム配列プラスミドを用い、各ペプチドについて約 10mg を回収した。各ペプチドを 3mM の濃度で 10%酢酸中で反応させると、電子顕微鏡で線維状構造物の形成が確認された。変異型ペプチドは直鎖状の典型的なアミロイド線維を形成したが、野生型ペプチドは不規則に折れ曲がった線維を形成し、線維構造に違いが観察された。アミロイド線維と考えられる変異型ペプチドが形成した線維状構造物 3mg を超遠心により沈殿させた後に乾燥させ、固体 NMR 測定試料とした。DARR 法にて測定したところ、シグナルは得られたがピークは高度にブロードであった。この結果から、形成された線維には構造多型が存在することが示唆された。</p>
	本課題により得られた成果と当初目標との比較	<p>本課題では、①豚の野生型および②変異型 SAA の N 末端ドメインが形成する線維の立体構造、および③変異型 SAA 線維が誘導する野生型アミロイド線維の構造を明らかにすることを目的としていた。このうち、②変異型 SAA の N 末端について固体 NMR の測定を実施することができ、線維構造に関する知見を得ることができた。①野生型 SAA の N 末端ペプチドについては ¹⁵N 標識ペプチドを用いて線維を形成することには成功したが、期間中に NMR 測定することが出来なかった。また、本課題では cross seeding により生じたアミロイド線維の解析を予定していたが、期間中では ¹⁵N 標識した試料の作成を実施することができなかった。しかし、非標識体を用いた検討で、変異型 SAA ペプチドが形成したアミロイド線維が野生型 SAA ペプチドによるアミロイド線維形成を誘導する seeding 条件を確定しており、今後標識体ペプチドで seeding 誘導線維を形成し NMR 測定を実施する予定である。¹⁵N 標識タンパク質の作成について大陽日酸社と連携し、同社の無細胞合成技術を用いて野生型および変異型の SAA タンパク質を作成した。大陽日酸社の申請者に固体 NMR の測定および解析について指導を行った。</p>
	成果発表	<p>成果の一部を第四回アミロイドーシス研究会学術集会で発表予定 (2016. 8. 19)</p>
	今後の展開	<p>アミロイド線維を形成するタンパク質は複数報告されているが、線維形成の詳細な機序は未だ不明である。特に、異種タンパク質間の cross seeding によるアミロイド伝播の機序についてはほとんど報告がない。本課題では、cross seeding のコアとなる豚 SAA の変異体について、わずかではあるが構造情報を得ることが出来た。また、豚変異型 SAA と野生型 SAA 間で cross seeding によるアミロイド線維の誘導条件を確立した。今後は、同位体標識ペプチドを用いた cross seeding を行い、誘導されたアミロイド線維の構造を明らかにする。本課題で実施した cross seeding によるアミロイド線維の形成を他のアミロイドタンパク質にも応用することで、アミロイドに共通する線維化機序の解明につながると期待する。</p>
社会・経済への波及効果の見通し		<p>今回の課題実施期間では、社会・経済へ直接波及効果が期待される成果は得られていない。</p>

<p>利用における感想 (改善要望等を含む) 利用周辺環境に関する希望</p>	<p>NMRの初心者に対して、専門化のアドバイスをいただきながら無償で測定から解析まで実施していただけたことに感謝申し上げます。また、今回の課題では試料の大量調整が困難でしたが、パイプラインの利用でクリアーできました。こちらについてもご協力いただきました皆様に感謝申し上げます。</p> <p>固体NMRを利用しましたが、測定が込み合っており、測定回数が限定されたことが残念でした。今後、利用可能な固定NMRが増設されることを期待いたします。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	<p>無償利用がなくなったことは非常に残念です。復活を希望します。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>() あり : (○) なし 「あり」の場合理由 :</p>
<p>その他</p>	