

# 理研NMR施設利用報告書

(産学連携無償利用)

13-700-005

平成 26 年 8 月 4 日

利用機関名	麻布大学	
実施部署名	獣医学部	
実施責任者管理職名・氏名	准教授/上家 潤一	
実施部署所在地	神奈川県相模原市中央区淵野辺一丁目 17 番 71 号	
実施部署連絡先		
利用課題名	哺乳類 AA アミロイドの立体構造の解明と比較解析	
利用目的・内容	豚の野生型および変異型 SAA タンパク質の N 末端の構造を解析することを目的とした。立体構造解析パイプラインで得たペプチドについて、酸性溶液中でアミロイド線維形成過程を NMR で測定した。	
利用実施時期及び期間	平成 25 年 11 月 18 日～平成 26 年 5 月 19 日  当初計画どおり	
利用施設	NMR 装置 (該当部分に○)	利用装置① ・ ( ) 600MHz、( ○ ) 700MHz、( ) 800MHz、( ) 900MHz 利用期間 1 : 平成 25 年 11 月 18 日～平成 25 年 12 月 4 日 利用期間 2 : 平成 26 年 2 月 24 日～平成 26 年 3 月 3 日

		<p>利用装置②</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ ( )600MHz、( )700MHz、( ○ )800MHz、( )900MHz</li> </ul> <p>利用期間1：平成 25年 12月 18日～平成 25年 12月 25日      利用期間2：平成 25年 12月 27日～平成 26年 1月 6日      利用期間3：平成 26年 1月 7日～平成 26年 1月 17日      利用期間4：平成 26年 4月 1日～平成 26年 4月 8日</p> <hr/> <p>利用装置③</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ ( )600MHz、( )700MHz、( )800MHz、( ○ )900MHz</li> </ul> <p>利用期間1：平成 26年 1月 29日～平成 26年 2月 12日      利用期間2：平成 26年 4月 30日～平成 26年 5月 19日</p> <hr/> <p>立体構造解析 パイプ ライン</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 発現確認 : 利用回数 5回</li> <li>・ フォールド判定 : 利用回数 3回</li> <li>・ 大量調製 : 利用回数 2回</li> <li>・ 構造決定 : 利用回数 0回</li> </ul>
<p>利用満足度 (複数選択不可)</p>		<p>( )大いに満足、( ○ )ほぼ満足、( )やや不満、 ( )大いに不満</p>
<p>研究チームの構成</p>		<p>麻布大学 獣医学部 病理学研究室      准教授 上家潤一      神奈川県相模原市中央区淵野辺一丁目17番71号〒252-5201</p> <p>大陽日酸株式会社 開発・エンジニアリング本部 つくば研究所      SI 開発部開発課      課長 横山 順      茨城県つくば市大久保10番地〒300-2611</p> <p>大陽日酸株式会社 開発・エンジニアリング本部 つくば研究所      SI 開発部開発課      池田 明夏里      茨城県つくば市大久保10番地〒300-2611</p>

<p>成果の概要</p>	<p>実施内容</p>	<p>①合成ペプチドの NMR 測定</p> <p>10%酢酸溶液中で野生型、変異型ペプチドの経時的変化を NMR で測定した。どちらのペプチドも N 末端のピログルタミン酸化が観察され、高濃度 (3.5mM) では低濃度 (1.75mM) に比較してピーク強度が経時的に低下し、高濃度条件における凝集体の形成が示唆された。野生型ペプチドにアミロイド核を添加したところ、低濃度でもピーク強度が低下し、凝集反応が示唆された。</p> <p>両ペプチドの解析では経時変化に伴うピークシフトは観測されず、アミロイド形成に伴う構造変化は捉えられなかった。</p> <p>②無細胞発現によるペプチド発現</p> <p>野生型および変異型ペプチドについて、無細胞発現により高純度ペプチドを得た。いずれの発現ペプチドも、10%酢酸溶液中でチオフラビン T 陽性を示すアミロイド線維を形成した。</p>
<p>本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較</p>	<p>本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較</p>	<p>アミロイド核の添加により、野生型 S A A ペプチドの凝集促進が示唆されたことは、豚のアミロイド症発生機序を明らかにするうえで重要であり、当初目標を上回る結果である。</p> <p>しかし、当初目標としていた、アミロイド線維形成に伴う構造変化は測定することができなかった。</p>

	<p>今後の展開、課題</p>	<p>今後はアミロイド線維の構造解析を目的として、固体NMRを用いた解析を実施する。豚の野生型、変異型S A A N末端ペプチドからアミロイド線維を作成して解析する。固体NMR測定のために 15 N, 13 C 標識ペプチドを数百mg 作成する必要があることから、安定同位体標識培地中で大腸菌を用いたペプチド発現を行うことで解決を図る。</p> <p>また、本事業で明らかになった野生型S A A ペプチドのアミロイド核添加による凝集反応の促進は、アミロイド線維形成の機序解明に重要であると考えられる。核添加による凝集物について、超微形態観察および色素結合試験によりアミロイド線維を実証する。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し</p>	<p>アミロイド罹患率の極端に低い豚のアミロイド線維構造を明らかにすることで、ヒトを含めた他の動物種におけるアミロイド線維形成機序の解明につながることを期待される。</p>	
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>( ) あり : ( O ) なし 「あり」の場合理由:</p>	
<p>理研 NMR 施設利用における感想</p>	<p>NMR測定に当たり終始丁寧なアドバイスがいただけたことに感謝いたします。当初の目的は残念ながら達成できませんでしたが、固体NMRによる解析を提案していただき、進展が見込まれます。</p>	

利用周辺環境に関する希望	固体NMRの増設を希望します。
今後の利用形態の予定	<input type="radio"/> 再度本事業への申請を考えている。 <input type="checkbox"/> 成果の非公開を前提とした「外部利用」(有料)を考えている。 <input type="radio"/> その他理研との共同研究等を考えている。 具体的に：本事業で無細胞発現に用いた発現ベクターの提供いただくことで、麻布大学で同位体標識ペプチドを作成したい。  <input type="checkbox"/> 未定
今後期待するその他のサービス	<input type="radio"/> NMR 装置利用の教育 (これまで NMR を使用した経験の無い方に対する教育も含む) <input type="radio"/> NMR 装置利用の技術的なサポート <input type="checkbox"/> その他 具体的に
文部科学省の共用ナビ (研究施設共用総合ナビゲーションサイト) に対する感想・改善について	<a href="http://kyoyonavi.mext.go.jp/">(http://kyoyonavi.mext.go.jp/)</a> <input type="radio"/> 見た : <input type="checkbox"/> 見ていない 感想等 :
その他	(上記の項目以外でご意見等お願いします。)

本報告書については、印刷または必要な編集・加工を行った上で公開します。また、別途開催予定の成果報告会・シンポジウムや委託事業報告書作成時において、本報告書の内容についての資料作成または発表をお願いする場合があります。