

理研NMR施設利用報告書

(産学連携無償利用)

14-700-009

平成 27 年 6 月 15 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	
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	<p>本申請課題では、豚の変異型および野生型 SAA の N 末端が形成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、①豚の野生型および変異型 SAA の N 末端ペプチドの作成、②酸性溶液中における SAA ペプチドの経時的な多次元 NMR の測定、③SAA ペプチドによるアミロイド線維形成と固体 NMR 測定を実施する。</p>	
利用実施時期及び期間	<p>平成 26 年 7 月 28 日 ~ 平成 27 年 3 月 30 日</p> <p>当初計画どおり <input checked="" type="radio"/> 当初計画変更 <input type="radio"/> (どちらかを○で囲む) (変更理由) 発現ベクターの提供を受けるための共同研究開始が遅延したため。</p>	
利用施設	立体構造解析 パイプ ライン	<p>・発現確認 : 利用回数 4 回</p> <p>・フォールド判定 : 利用回数 0 回</p> <p>・大量調製 : 利用回数 2 回</p>
	NMR 装置 (該当 部分に ○)	<p>利用装置①</p> <p>・ ( ) 溶液 600MHz、( ) 溶液 700MHz、( ) 溶液 800MHz、 ( ) 溶液 900MHz、( <input checked="" type="radio"/> ) 固体 700MHz</p> <p>利用期間 1 : 平成 27 年 3 月 10 日~平成 27 年 3 月 15 日 利用期間 2 : 平成 27 年 3 月 23 日~平成 27 年 3 月 29 日</p>
利用満足度 (複数選択不可)	<p>( ) 大いに満足、( ) ほぼ満足、( <input checked="" type="radio"/> ) やや不満、 ( ) 大いに不満</p>	

<p><b>研究チームの構成</b> (連携機関先も含む)</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><b>成果の概要</b></p>	<p><b>実施内容</b></p> <p>利用期間中に以下を実施した。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>① 豚の野生型および変異型 SAA ペプチドの大量発現系構築と単離精製の確認</li> <li>② <math>^{13}\text{C},^{15}\text{N}</math> 標識サンプル調製</li> <li>③ <math>^{13}\text{C},^{15}\text{N}</math> 標識サンプルによるアミロイド線維形成</li> <li>④ 標識アミロイド線維の固体 NMR 測定</li> </ol> <p>大腸菌を用いて、野生型、変異型ペプチドの非標識サンプルおよび <math>^{13}\text{C},^{15}\text{N}</math> 標識サンプルの大量発現系を構築した。標識サンプルの発現系構築は大陽日酸の担当者が主として実施した。</p> <p>発現した変異型ペプチドを酸性溶液で反応させ、形成された顆粒状のオリゴマーを固体 NMR で測定した。</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、豚アミロイドペプチドの野生型と変異型の <math>^{13}\text{C},^{15}\text{N}</math> 標識ペプチド大量発現する系が構築できた。また、変異型ペプチドのオリゴマーについて固体 NMR 測定を実施した。</p> <p>当初の最終目的としていた2種類のペプチドが形成する線維の構造解析は達成されなかった。これは、<math>^{13}\text{C},^{15}\text{N}</math> 標識ペプチドが線維を形成する条件を決定できなかったことによる。非標識ペプチドで線維形成が確認された酸性条件下では、標識ペプチドはいずれも顆粒状のオリゴマーを形成した。固体 NMR 測定に使用する線維サンプルの作成条件を検討する必要がある。</p>
<p>今後の展開、課題</p>	<p>今後は、各動物の SAA の N 末端ペプチドを作成し、アミロイド原性およびアミロイド線維の構造を固体 NMR で明らかにする予定である。本申請課題で対象とした豚 SAA の野生型と変異型は N 末端の3残基が異なるのみであるが、変異体のみがアミロイド線維を形成する。この結果は N 末端がアミロイド形成に重要であることを示す。SAA は動物種間で N 末端配列に差異がみられることから、動物種によって SAA のアミロイド原性が異なることが予想される。動物種間でこのアミロイド線維の構造を明らかにし比較することで、アミロイド形成に重要な配列および分子構造を明らかにしたい。</p> <p>本申請課題では、同位体標識ペプチドの大量発現に成功したが、発現ペプチドの線維形成が達成できなかった。直近の課題として、同位体標識ペプチドのアミロイド線維形成条件の最適化が必須である。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し</p>	<p>アミロイドの構造を比較生物学的に解析することで、線維形成に重要な配列を同定する。本課題の達成は AA アミロイド症だけでなく、アミロイド症全般の病理発生に新知見を加えるものであり、アルツハイマー病などの治療につながる可能性が高い。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>(○) なし : ( ) あり</p> <p>「あり」の場合理由 :</p> <p>延期希望期間 : (利用報告書提出日より最大2年)</p>

<p>理研 NMR 施設利用における感想</p>	<p>ペプチドの大量発現系構築のために共同研究としてコンストラクトを提供していただき、効率良く系を立ち上げることができた。期間の延長など柔軟な対応に感謝申し上げたい。共同研究の締結に時間がかかってしまったのが惜しかった。</p> <p>アミロイド線維の試料調整が間に合わず、目的の NMR 測定ができなかったことは非常に残念であった。期間を通じて、試料の調整法や研究計画に建設的な御助言をいただけたことは大変ありがたかった。今後の展開に役立てたい。</p>
<p>利用周辺環境に関する希望</p>	<p>固体 NMR の増設を希望。</p>
<p>今後の利用形態の予定</p>	<p><input type="checkbox"/> 再度本事業への申請を考えている。</p> <p><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。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> その他理研との共同研究等を考えている。</p> <p>具体的に： 特定課題利用</p> <p><input type="checkbox"/> 未定</p>
<p>今後期待するその他のサービス</p>	<p><input type="checkbox"/> 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)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> NMR 装置利用の技術的なサポート</p> <p><input type="checkbox"/> その他</p> <p>具体的に</p>
<p>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</p>	<p>(<a href="http://kyoyonavi.mext.go.jp/">http://kyoyonavi.mext.go.jp/</a>)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 見た : <input type="checkbox"/> 見ていない</p> <p>感想等：</p>

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。