

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07020

研究課題名(和文) 血清アミロイドA4の基本的性質の理解と生理的・病理的意義の解明

研究課題名(英文) Understanding of the fundamental properties of serum amyloid A4 to elucidate its physiological and pathological significance

研究代表者

田中 将史 (Tanaka, Masafumi)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40411904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血清アミロイドA4(SAA4)はヒトの血液中に高濃度で存在するタンパク質であるが、生体内での機能や疾患との関連性が不明であるがゆえにこれまで注目されることがなかった。研究代表者は、同じファミリーのSAA1の研究を展開してきた。本研究では、SAA4の基本的性質をタンパク質分子レベルで理解することを目的に、大腸菌発現系によるSAA4の調製を行うとともに、培養細胞から分泌されるSAA4の性質について調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SAA4に関する研究は世界的に見てもほとんど行われていない。したがって、学術的には未知のタンパク質分子の構造や機能を解明するという意義があると考えられるが、現時点では、社会的意義があるかは不明である。しかしながら、SAA4の生理的・病理的意義があると信じ、研究材料を準備すると同時にいくつかの評価系を確立することができたため、本研究によりSAA4の基本的性質の理解に向けた下地ができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Serum amyloid A4 (SAA4) is a protein that circulates in human blood. Despite its high blood concentrations, little attention has been paid to the significance of SAA4 molecule because its physiological functions and relationship to disease are largely unknown until now. So far, we have focused on the pathological understanding of SAA1. In the present study, in order to understand the fundamental properties of SAA4 at the protein molecular level, we prepared SAA4 using an E. coli expression system and investigated the characteristics of SAA4 secreted from cultured cells.

研究分野：物理系薬学

キーワード：血清アミロイドA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アポリポタンパク質として脂質代謝を担う血清アミロイド A (SAA) にはいくつかの種類が存在する。研究代表者を含め多くの研究者は、炎症性疾患に伴って血中濃度が著増する急性期型の SAA (主に SAA1) に注目してきた。それに比べ、SAA4 は正常時の血中に高濃度で存在するにもかかわらず、生体内での機能や疾患との関連性が不明であるがゆえにこれまで注目されることがなかった。しかしながら近年、病態や加齢によって SAA4 の発現量や糖鎖付加割合が変化することが報告され、この現象がなぜ起こるのか疑問を抱いた。そこで本研究では、研究代表者が他のアポリポタンパク質で培ってきた知識や経験に基づき、SAA4 の基本的性質をタンパク質分子レベルで理解することで、脂質代謝における機能に関する情報を得るとともに、SAA4 の糖鎖付加が機能に及ぼす影響やその疾患などとの関連性を調べることにした。

2. 研究の目的

アポリポタンパク質として未知な SAA4 に焦点をあて、まずは SAA4 の基本的性質 (構造・物性) を理解すること、脂質代謝機能 (生理的意義) に関する手がかりをつかむこと、糖鎖付加の意義 (特に病理的な意義) の解明につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) SAA4 タンパク質の調製

大腸菌により、アフィニティタグ (His あるいは GST) の付加したタンパク質を発現した。得られたリコンビナントタンパク質を用いて、切断酵素であるエンテロキナーゼの量、反応温度、反応時間等を変化させ、電気泳動 (SDS-PAGE) により分離後、抗 SAA4 抗体および抗 His タグ抗体を用いてウェスタンブロットにより検出した。

(2) 培養細胞を用いた SAA4 発現の量的・質的変動の解析

肝臓由来の細胞株 (HepG2) を 6 ウェルプレートあるいはディッシュに一定細胞数で播種し、前培養した。その後、様々な条件の培地に変えて一定時間培養後、培養上清およびライセートを回収した。必要に応じて、培養上清をゲルろ過クロマトグラフィーで分画した。SDS-PAGE により分離後、抗 SAA4 抗体を用いてウェスタンブロットにより検出した。

4. 研究成果

(1) SAA4 タンパク質の調製

まず初めに、大腸菌発現系により、C 末端領域に His タグを有する non-glycosylated SAA4 を準備した。以前の実験結果より、精製後に凍結乾燥を行うと再溶解時に SAA4 の溶解性が著しく低下することが予想されていたため、溶液状態で凍凍保存することとした。その結果、溶解性の改善が認められ、変性剤に溶かした SAA4 溶液を中性 pH に対して透析した場合においても、実験可能な濃度 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度) まで溶解することが明らかとなった。円二色性 (CD) スペクトル測定により、SAA1 の場合と同様に、37 $^{\circ}\text{C}$ において SAA4 は二次構造をもたないという結果となった。一方、4 $^{\circ}\text{C}$ においては、SAA1 の場合とは異なり、SAA4 は二次構造をもたないという結果となった (図 1)。次に、他のアポリポタンパク質で広く用いられている、ヘリックス構造を誘起する溶媒であるトリフルオロエタノールを添加したが、二次構造の顕著な変化は認められなかった。これらの結果は、C 末端領域に His タグを有するためであると考えられた。

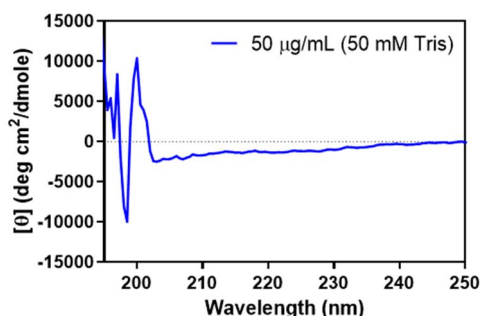
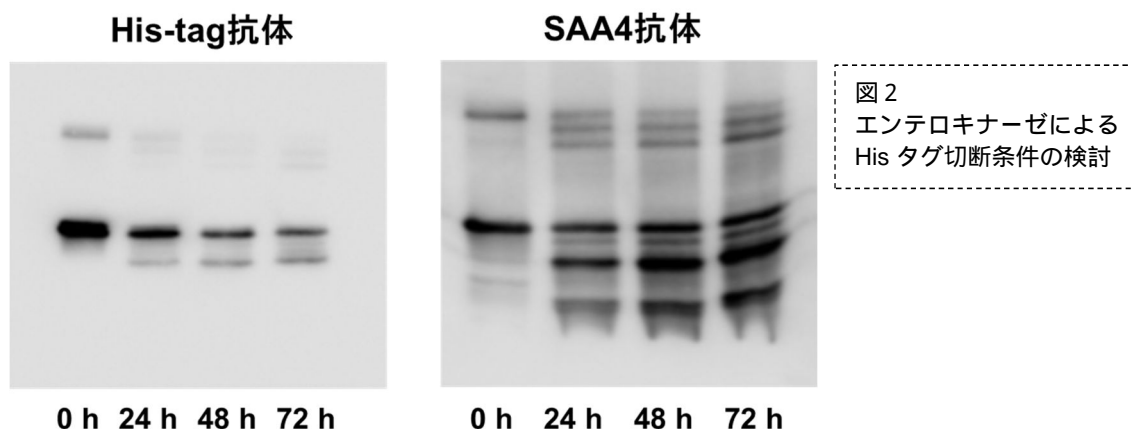


図 1
C 末端領域に His タグを有する non-glycosylated SAA4 の CD スペクトル (4 $^{\circ}\text{C}$)

C 末端領域の His タグを切断することは不可能であったため、次に、N 末端領域に His タグを有する non-glycosylated SAA4 を用い、His タグの除去条件を改めて検討することとした。その結果、エンテロキナーゼ処理開始後 72 時間が経過してもタグが切断できていないタンパク質が多く存在し切断効率が著しく低いこと、His タグが切断された場合でも目的外の部位でも切断が起こることなどが認められた (図 2)。なお、タグの切断に伴う会合体の形成も認められた。現在

までのところ、His タグ切断の最適条件の決定には至っていない。



そこで、アフィニティータグを GST に変更し、大腸菌での発現から検討することとした。まず、発現誘導剤である IPTG 濃度や培養時間などを検討した (図3)。その結果、IPTG 濃度は 1.0 mM 程度、培養時間は 2 時間程度で十分であることが示された。そこで次に、小スケールで GST タグの除去を検討した。その結果、エンテロキナーゼ処理後 6 時間で GST タグの切断が認められ、His タグに比べて切断効率が高くなることが示唆された (図4)。さらに、酵素処理後 20 時間が経過すると GST-SAA4 融合タンパク質に相当するバンドが顕著に消失しており切断が進行していることが示唆されたが、His タグタンパク質と同様に、目的外の箇所での切断も認められており、現在、GST タグ切断や精製の最適条件を調べている。

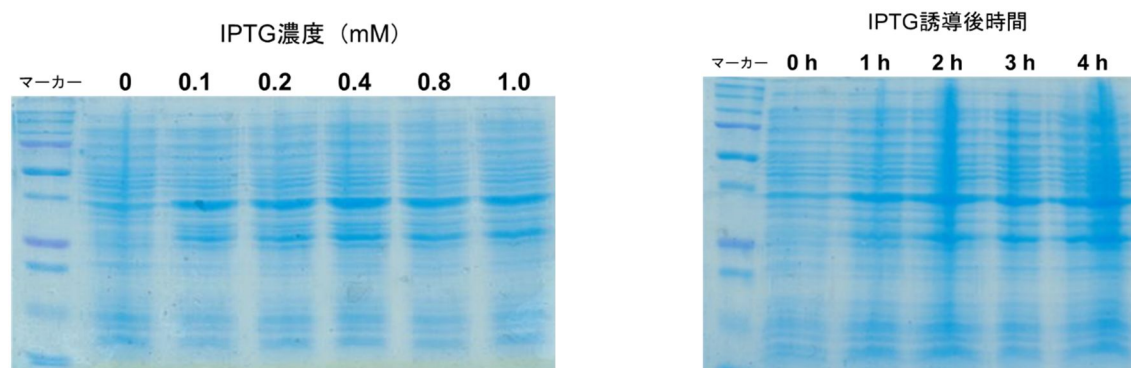


図3
N 末端領域に GST タグを有する non-glycosylated SAA4 の発現検討

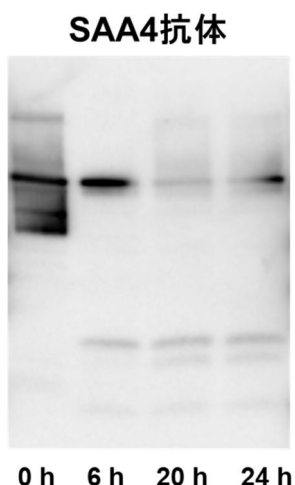


図4
エンテロキナーゼによる GST タグ切断条件の検討

(2) 培養細胞を用いた SAA4 発現の量的・質的変動の解析

HepG2 から培養上清に SAA4 が分泌していること、および non-glycosylated SAA4 のみならず、glycosylated SAA4 も検出可能であることが分かった (図 5)。しかしながら、実験によっては glycosylated SAA4 のバンドが検出されないこともあり、この理由について検討が必要であると考えている。一方、ライセートでは、non-glycosylated および glycosylated SAA4 が検出される場合もあった (図 5) が、同じ条件であるにもかかわらず、SAA4 のバンド自体が全く検出されない場合もあった。

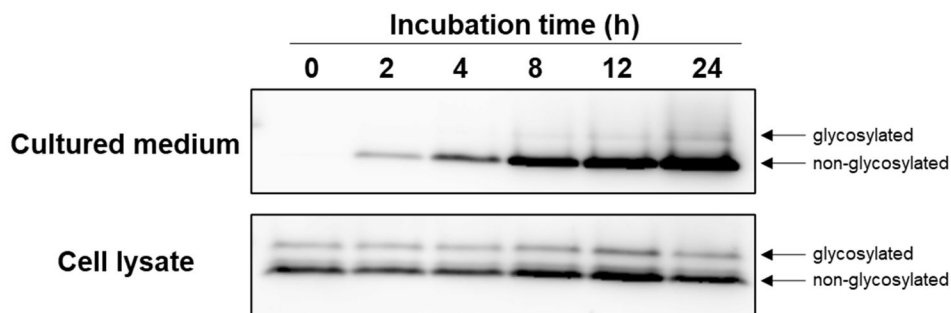


図 5
時間経過に伴う HepG2 からの SAA4 の細胞外分泌

SAA4 発現の量的・質的変動の解析を行うために、いくつかの異なる培養条件で HepG2 を培養した。例えば、培養液中のグルコース濃度の変動に対しては、SAA4 の分泌量に大きな変化は認められなかった。一方、培養液中に IL-6 および IL-1 β を添加した場合には SAA4 の分泌量が増加する結果となり (図 6)、これまでの報告とは異なり、炎症を起こした際に SAA4 の分泌が増加する可能性が示された。

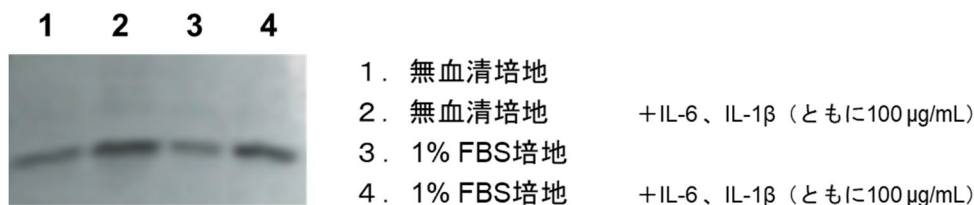


図 6
分泌される SAA4 の量的・質的変動に及ぼす培養環境の影響

さらに、細胞密度や細胞周期の影響、および低酸素誘導による影響についても検討を行い、変化が認められる場合も観察された。例えば、低酸素状態の模倣に汎用されている HIF1 誘導剤の塩化コバルトを添加した場合、分泌型の GAPDH の細胞外分泌量は増加した一方で、SAA4 およびアポ A-I は著しく低下した (図 7)。しかしながら、これらについても再現性に乏しく、明確な発現変動を示す条件の確立には現在までのところ至っていない。

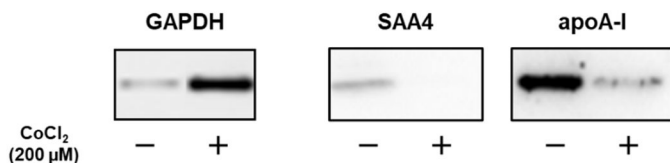


図 7
SAA4 の分泌に及ぼす低酸素誘導の影響

次に、培養液をゲルろ過クロマトグラフィーで分離した (図 8)。各フラクションをスポットし、抗 SAA4 抗体を用いたドットプロットを行ったところ、いくつかのフラクションで SAA4 が検出された (図 8)。今回のゲルろ過クロマトグラフィーではリポタンパク質画分の分離が十分に行えていないため、今後はカラムを連結するなどして、様々な条件において分泌された SAA4 がどのような性状を有するのかを明らかにしていく。

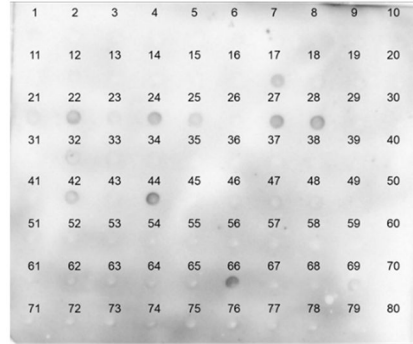
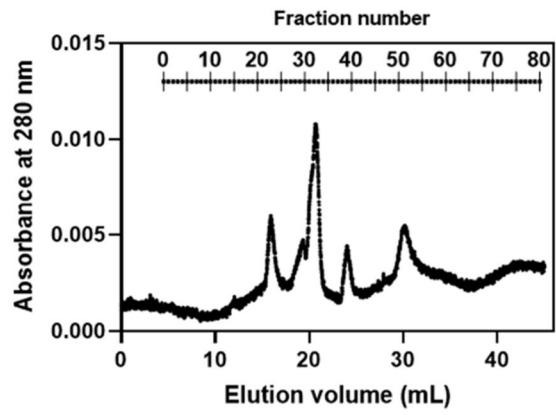


図 8
培養液のゲルろ過クロマトグラフィープロファイルと各フラクションのドットプロット

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山田 俊幸 (Yamada Toshiyuki) (50211636)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関