

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008 年度～2009 年度
課題番号：20790045
研究課題名 (和文) 血清アミロイド A による脂質代謝制御とアミロイド線維形成機構の分子論的解明
研究課題名 (英文) Elucidation of molecular mechanisms of lipid metabolism regulation and amyloidogenesis by serum amyloid A.
研究代表者
田中 将史 (MASAFUMI TANAKA)
神戸薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：40411904

研究成果の概要 (和文)：

血清アミロイド A (SAA) 分子中に存在する各アミノ酸残基の疎水性度を表すハイドロパシープロットから、最も疎水性が高いと考えられる N 末端 (1-27 残基) と中間 (43-63 残基) 領域、及びアミロイド化の際に切断される C 末端 (77-104 残基) 領域を Fmoc 固相法によって合成し、HPLC により精製した。蛍光や円二色性 (CD) などの分光学的測定、あるいはゲルろ過分析によってそれらの脂質結合性を評価した結果、N 末端領域のみが脂質結合能を有することが分かった。さらに、N 末端領域中に存在する 7 残基目のロイシンをプロリンに置換すると脂質結合能が低下し、最 N 末端領域の α ヘリックス構造が SAA の脂質結合に重要な役割を果たすことを明らかにした。次に、脂質粒子に結合したアポ A-I と SAA フラグメントペプチドとの交換反応を Rhodamine ラベル化した全長アポ A-I を用いて評価したところ、SAA の N 末端領域がアポ A-I を粒子から解離することが示された。しかしながら、このときの粒子径を動的光散乱法により調べたところ、著しい粒子径の増大が観察された。すなわち、炎症時に濃度が高くなる SAA は、その N 末端領域が HDL に結合することで粒子の再構成を引き起こし、結果としてアポ A-I が解離し、脂質代謝に異常をもたらすことが推察された。また、チオフラビン蛍光を用いてアミロイド線維形成について評価したところ、SAA 分子の中間領域、C 末端領域はアミロイド線維形成能を示さず、酸性条件において N 末端領域のみがヘパリンの添加によってアミロイド線維形成能を示した。今後、脂質結合性との関連についても調べる予定である。

研究成果の概要 (英文)：

Human serum amyloid A (SAA) protein is an apolipoprotein predominantly present in the high-density lipoprotein fraction of plasma. Despite its critical roles in lipid metabolism, especially in acute phases, systematic understanding of the lipid interaction of this protein is limited. SAA shares certain structural features with other apolipoproteins including amphipathic helices, a motif that appears to be responsible for lipid binding. Previously, we examined the lipid-binding properties of the putative amphipathic α -helices in apoA-I molecule using its fragment peptides. In the present study, lipid-binding properties of synthetic fragment peptides corresponding to the N-terminal (region spanning residues 1–27), central (residues 43–63), and C-terminal (residues 77–104) parts of human SAA molecule were examined. SAA (1–27) peptide binds to lipid forming an α -helical structure, whereas SAA (43–63) and (77–104) peptides do not display binding to lipid with any conformational changes. These results indicate that the N-terminal region of SAA is important for lipid interaction. In addition, the finding that proline substitution at 7th residue in the most N-terminal region markedly decreased the binding to lipid indicates that the α -helical structure in this region is essential for lipid binding of SAA. Furthermore, binding competition assay suggests that the replacement of apoA-I in HDL might

be caused by membrane disruption by insertion of the N-terminal helix of SAA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

アミロイドが沈着することによって引き起こされる臓器の機能障害はアミロイドーシスとよばれる。続発性アミロイドーシスは、関節リウマチなど慢性の炎症性疾患をもつ患者において死因の上位を占める難治性の病態であり、本症で沈着するアミロイドの前駆体は急性相反応蛋白質として知られるSAAである。血中で大部分のSAAは高密度リポ蛋白質(HDL)と結合して存在することから、アポリポ蛋白質として分類される。SAAは炎症時にその濃度が正常時の1000倍にも増加し、大部分がHDLに結合して存在することから脂質代謝を制御すると考えられる。しかしながら、正常時におけるHDLの主要構成蛋白質であるアポリポ蛋白質A-Iに比べて生理的機能や立体構造の解明が進んでいなかった。

2. 研究の目的

「1. 研究開始当初の背景」を受けて、炎症時の脂質代謝におけるSAAの役割について分子論的な立場から解明することを目的とする。また、脂質結合性と同時にアミロイド線維形成能力の評価を行うことで、それらの因果関係について議論する。

3. 研究の方法

(1)フラグメントペプチドの合成と精製

SAA分子中に存在する各アミノ酸残基の疎水性度を表すヒドロパシープロットから、最も疎水性が高いと考えられる2つの領域、1-27領域(27残基)と43-63領域(21

残基)、及びアミロイド化する際に切断される77-104領域(28残基)をFmoc固相法によって合成し、HPLCにより精製する。

(2)蛍光測定

各フラグメントペプチド配列中に一残基のみ存在するトリプトファン残基(W@18, @53, @85)の蛍光を利用して、細胞モデル脂質膜ベシクル(SUV)への結合に伴う最大蛍光波長のブルーシフトを観察し、アポA-Iの脂質結合部位ペプチドと比較する。

(3)脂質膜結合性の評価

フラグメントペプチドのSUVに対する結合性をゲルろ過法により評価する。これにより、脂質膜への結合に重要なドメインを明らかにする。

(4)CD測定による二次構造評価

フラグメントペプチドについて、溶液状態における二次構造と、SUVとの相互作用に伴うその変化をCD測定により評価する。

(5)脂質粒子に対する結合選択性の評価

Rhodamineラベル化した全長アポA-Iを脂質粒子に結合させ、SAAフラグメントペプチドの添加によるアポA-Iの解離をゲルろ過法により評価する。

(6)アミロイド線維形成能の評価

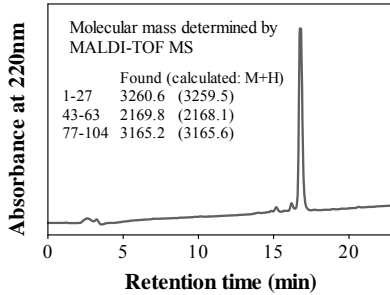
フラグメントペプチドのアミロイド線維形成について評価し、線維形成に関与する領域について明らかにする。*in vitro*で短期間のうちにアミロイド線維の形成を行うため、pHの変化やヘパリンの有無などの条件検討を行う。

4. 研究成果

(1) フラグメントペプチドの合成と精製

SAA の N 末端、中間、及び C 末端に相当するフラグメントペプチドを Fmoc 固相法によって合成した。MALDI-TOF 質量分析から目的とするペプチドの分子量が得られ、HPLC により高純度に精製できていることが確認された (Fig. 1)。

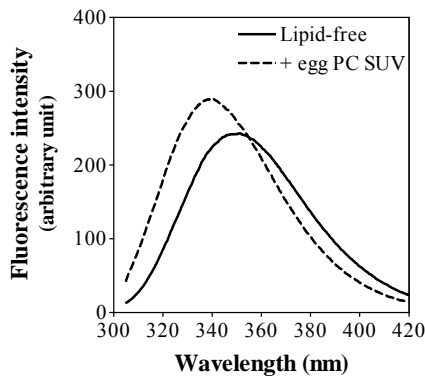
Fig.1 RP-HPLC profile of purified SAA (1-27) peptide



(2) 蛍光測定

SUV 存在下におけるトリプトファン蛍光をモニターしたところ、SAA (1-27) ペプチドでは最大蛍光波長の低波長側へのシフトが見られた。これはペプチドが脂質膜に結合したことでトリプトファンが疎水的な環境に移行したためと考えられる。一方、SAA (43-63), (77-104) ペプチドではこのような変化は観察されなかった (Fig. 2)。

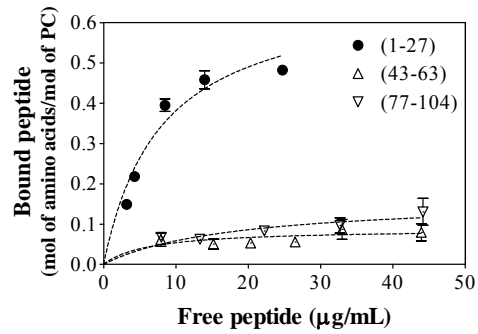
Fig.2 Fluorescence spectra of SAA (1-27) peptide in the absence and presence of egg PC SUV



(3) 脂質膜結合性の評価

蛍光測定の結果と同様、ゲルろ過分析においても SAA (1-27) ペプチドは高い脂質結合性を示したが、SAA (43-63), (77-104) ペプチドは脂質結合性をほとんど示さなかった (Fig. 3)。

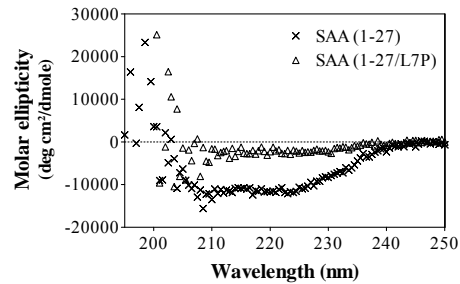
Fig.3 Binding isotherms of SAA peptides



(4) CD 測定による二次構造評価

SUV との相互作用に伴う二次構造の変化を CD 測定により調べた。SUV 非存在下の SAA (1-27) ペプチドはランダム構造であったが、SUV に結合すると α -ヘリックス構造の形成を示唆するスペクトルを示し、約 10 残基程度が α -ヘリックス構造を形成していると計算された。N 末端領域のうち、最初の 10 残基程度は特に疎水性が高いことから、この領域に存在する 7 残基目のロイシン (L) をプロリン (P) に置換した SAA (1-27/L7P) ペプチドを作製し、同様の測定を行った結果、 α -ヘリックス構造の形成と共に脂質結合性を失い、最 N 末端領域の α -ヘリックス構造の形成が脂質への結合における駆動力となることが明らかとなった (Fig. 4)。

Fig.4 Far-UV CD spectra in the presence of egg PC SUV



(5) 脂質粒子に対する結合選択性の評価

SUV に結合したアポ A-I とペプチドとの交換反応を Rhodamine ラベル化した全長アポ A-I を用いて調べた。予めアポ A-I を SUV に結合させ、ここに SAA (1-27) ペプチドをアポ A-I に対して過剰量添加したところ、アポ A-I の SUV 上からの解離を示すゲルろ過プロファイルを得た (Fig. 5a)。しかしながら、このときの粒子径を動的光散乱法 (DLS) により調べたところ、著しい粒子径の増大が観察され、SAA (1-27) ペプチドによるプロファイルの変化は SUV 粒子の崩壊に起因する可能性が示唆された (Fig. 5b)。炎症時に濃度が高くなる SAA の N 末端領域が HDL に結合するこ

とで粒子の再構成が起こり、その結果としてアポ A-I が解離し、脂質代謝に異常をもたらすことが推察された。

Fig.5a Elution profiles of apoA-I pre-incubated with SUV in the absence and presence of SAA (1-27) peptide.

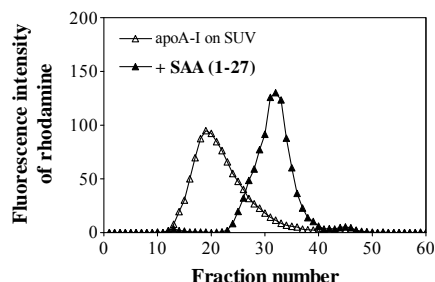
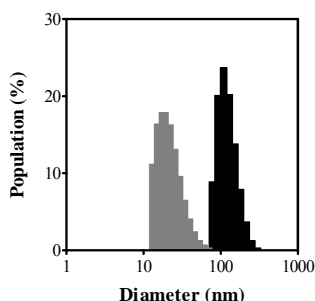


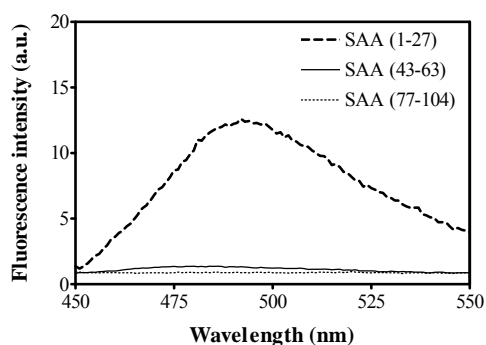
Fig.5b Changes in particle diameters induced by SAA (1-27) peptide



(6) アミロイド線維形成能の評価

チオフラビン蛍光測定及び CD 測定によりアミロイド線維形成について評価したところ、SAA (43-63), (77-104) ペプチドはアミロイド線維形成能を示さず、酸性条件において SAA (1-27) ペプチドのみがヘパリンの添加によってアミロイド線維形成能を示した (Fig. 6)。

Fig.6 Fluorescence spectra of thioflavin T



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

① Tanaka M., Tanaka T., Ohta S., Kawakami T., Konno H., Akaji K., Aimoto S., Saito H. *J. Pept. Sci.* 2009, 15 (1): 36-42. "Evaluation of Lipid-Binding Properties of the N-Terminal Helical Segments in Human Apolipoprotein A-I Using Fragment Peptides" (査読有)

② Ohta S., Tanaka M., Sakakura K., Kawakami T., Aimoto S., Saito H. *Chem. Phys. Lipids* 2009, 162 (1-2): 62-68. "Defining Lipid-Binding Regions of Human Serum Amyloid A Using Its Fragment Peptides" (査読有)

〔学会発表〕 (計 3 件)

① 大田慎也, 田中将史, 川上徹, 相本三郎, 齋藤博幸 「急性期タンパク質血清アミロイド A (SAA) の脂質結合部位の特定」 第 58 回日本薬学会近畿支部大会 平成 20 年 10 月 25 日 神戸

② 大田慎也, 田中将史, 川上徹, 相本三郎, 齋藤博幸 「ヒト Serum Amyloid A の N 末端領域は脂質結合に重要な役割を果たす」 第 45 回ペプチド討論会 平成 20 年 10 月 29 日 東京

③ 田中将史, 大田慎也, 坂倉広大, 川上徹, 相本三郎, 齋藤博幸 「脂質代謝異常に関与する血清アミロイド A の脂質膜結合機構の解明」 膜シンポジウム 2009 平成 21 年 11 月 18 日 広島

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 将史 (MASAFUMI TANAKA)
神戸薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：40411904

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：