 茨城県 IBARAKI Prefectural Government	MLF Experimental Report	提出日(Date of Report)
課題番号(Project No.) 2018PX0006 実験課題名(Title of experiment) FAP 病因タンパク質 TTR 変異体の繊維化メカニズム解明 実験責任者名(Name of principal investigator) 日下 勝弘 所属(Affiliation) 茨城大学	装置責任者 (Name of responsible person) 日下 勝弘 装置名(Name of Instrument : BL No.) BL03, iBIX 実施日(Date of Experiment) 2018.6.12~25	

実験目的、試料、実験方法、利用の結果得られた主なデータ、考察、及び結論を記述して下さい。

実験結果などの内容をわかりやすくするため、適宜図表添付して下さい。

Please report experimental aim, samples, experimental method, results, discussion and conclusions. Please add figures and tables for better explanation.

1. 実験目的(Objectives of experiment)

トランスサイレチン(TTR)は線維化し組織に沈着することでアミロイドーシスを引き起こすタンパク質である。TTR 野生型のアミノ酸残基 Tyr116 を Val に置き換えた変異体は野生型より安定であり、Tyr116 を Ser に置き換えた変異体は野生型より不安定で線維化しやすい。特に Tyr116Ser 変異体は難病である家族性アミロイド神経症を引き起こす。本研究では中性子回折計の茨城県生命物質構造解析装置 iBIX を用いて、野生型とは安定性の異なる2つの TTR 変異体について中性子構造解析を行い、水素を含む全原子構造を明らかにする。これにより中性子構造解析の新たな特長として注目されているプロトン互変異性の有無を観測すると共に、側鎖の配向と水分子の配位の状況を詳細に解明することで TTR の安定性変化の仕組みを捉え、TTR 線維化における TTR アミロイド線維形成のメカニズムに迫り、アミロイドーシス発症を抑制する新たな知見を得る。

2. 試料及び実験方法

Sample(s), chemical compositions and experimental procedure

2.1 試料 (sample(s))

TTR の Tyr116Ser 変異体は大腸菌を用いて大量培養・精製した。これを用いて、大型結晶化条件の検索を実施した。結晶化剤に硫酸アンモニウムを用いることで大型結晶の育成に成功した。構造解析用のフルデータの測定用には結晶体積 2.7mm³ の単結晶資料を得ることができた。(図 1)

2.2 実験方法(Experimental procedure)

得られた複数の単結晶試料の予備測定を行い、結晶性および分解能が最も良い結晶を選定し、これを本測定に用いた(図 1)。またこの結果から、測定に最適波長領域及び測定方位数を決定した。選定した結晶試料を用いて、中性子構造解析用のフルデータの測定を実施した。測定条件は以下のとおりである。加速器出力:500kW、測定波長領域:2.8~5.7 Å、測定方位:28 セット、測定温度:室温。X 線のデータとの同時構造精密化を実施するため、同一結晶を用いて PF, BL-05A にて回折データ収集を行った。



図 1 本測定に用いた結晶

3. 実験結果及び考察（実験がうまくいかなかった場合、その理由を記述してください。）

Experimental results and discussion. If you failed to conduct experiment as planned, please describe reasons.

準備した複数の単結晶資料を 30 分程度の露光時間の予備測定を行った結果、良質で目視分解能 1.9 Å が得られる結晶を選定することができた。この結晶を用いて、構造解析用のフルデータ測定を実施した。図 2 に得られた回折パターンの 1 つを示した (Det#1, 2 θ center=33°)。結晶性が良い子をと示す非常にシャープな回折斑点が得られている。

得られた全測定データを構造精密化を行うための積分強度データ $hklI(hkl)$ に変換するために、iBIX 用データ処理ソフトウェア STARGazer を用いて、データ処理を実施した。ヒストグラム化、ピークサーチ、UB 行列決定と精密化、積分強度計算を行い、積分強度データを得ることに成功した。表 1 にデータ処理の統計値を示した。積分を行った結果、分解能は 1.9 Å、等価反射の一致度を示す Rmerge:16.5% であり、非常に良好な統計精度のデータを得ることができた。

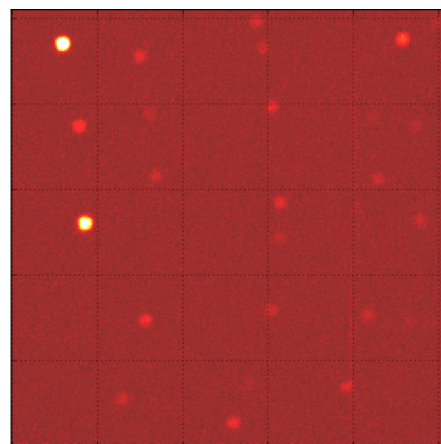


図 2 Det#1 の回折パターン

得られた中性子及び X 線の積分強度データと用いて、構造解析ソフトウェア PHENIX により、構造の精密化を行った。初期位相として X 線で決定された構造を用い、差合成の密度を参照しながら、主鎖の水素(重水素)、側鎖の水素(重水素)、水の水素(重水素)の順にモデルに水素(重水素)の付加を繰り返した。現状で、Rwork=16.8%, Rfree=21.9%の構造モデルを得ることができている。115-117Ser の側鎖及び主鎖の水素やこれらに関連する His88 のプロトンーション状態を観測することができた。今後、他の変異体や野生型との構造比較を行い、成果をまとめる予定である。

	TTR Y116S Neutron data	TTR Y116S X-ray data
Diffractometer	BL03 iBIX, MLF	BL-05A, PF
Space Group	P2 ₁ ,2 ₁ ,2	P2 ₁ ,2 ₁ ,2
Unit cell a (Å), b (Å), c (Å)	43.6, 85.8, 67.2	43.5, 85.8, 67.0
Resolution range (Å)	19.25-1.90 (1.97-1.90)	42.90-1.40 (1.45-1.40)
Temperature (K)	293	293
Total no. of reflection	103219 (7689)	270004 (26331)
No. of unique reflection	20166 (1971)	50123 (4922)
Completeness (%)	98.1 (96.9)	99.6 (99.1)
R _{merge} (%)	16.5 (59.5)	5.1 (52.6)
R _{p,lim.} (%)	8.1 (44.1)	2.2 (22.2)
Redundancy	5.1 (3.9)	5.4 (5.4)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	12.2 (1.6)	19.5 (3.1)
Rwork (%)	16.8	15.8
Rfree (%)	21.9	18.6

表 1 データ処理・解析統計

4. 結論(Conclusions)

TTR Tyr116Ser 変異体の構造解析用中性子回折データの取得に成功した。構造解析に十分な分解能:1.9 Å のデータを得ており、X 線データと合わせた Joint-refinement を行うことにより、水素(重水素)を含む構造情報(Rwork=16.8%, Rfree=21.9%)を得ることができた。目的とした 116Ser を中心としたアミノ酸側鎖及び骨格の水素(重水素)及び周辺の重水の水素(重水素)が観測することができた。今後、もう一つの変異体 Tyr116V 変異体の構造精密化を実施し、野生型を含めた構造を比較し、側鎖の配向と水分子の配位の状況を詳細に検討することにより、TTR の安定性変化の仕組みを捉え、アミロイドーシス発症を抑制する新たな知見を得ることを試みる。