

X線1分子追跡法を用いた構造を持たないタンパク質の動態計測

Intramolecular motions of unstructured proteins studied by Diffracted X-ray Tracking

志村真弘¹, 松下祐福¹, 一柳光平², 関口博史³, 佐々木裕次^{1,*}

¹東京大学大学院新領域創成科学研究科物質系専攻, 〒277-8561 柏市柏の葉 5-1-5

²物質構造科学研究所, 高エネルギー加速器研究機構, 〒305-0801 つくば市大穂 1-1

³高輝度光科学研究センター, 〒679-5148 佐用郡佐用町光都 1-1

Masahiro Shimura¹, Yufuku Matsushita¹, Kouhei Ichiyanagi²,
Hiroshi Sekiguchi³, and Yuji C. Sasaki¹

¹The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, 277-8561, Japan

²Photon Factory, 1-1 Oho, Tsukuba, 305-0801, Japan

³SPRING-8/JASRI, 1-1 Koto, Sayo-cho, Sayo, 679-5148, Japan

1 はじめに

現代の生物物理の分野では、ナノテクノロジーの発展に伴い1分子で計測するという極微的な領域を観測する技術が確立されつつある。タンパク質のような大きな分子サイズの複雑な機能的特徴を理解するために、機能性と機能発現に関わる分子内部運動を調べることが重要となる。従来のアボカドロ数に近い分子の平均的な変化を測定する手法があるが、不均一系の中での分子の分布や、運動を平均化した情報の中に埋もれてしまう。微細な分子の揺らぎを高輝度白色X線により分子内運動情報として得ることが出来るようになってきた[1, 2]。

特に、特定の構造を持たない領域を有する天然変性タンパク質では、従来のX線構造解析技術では構造決定が不可能であり、さらには特定の機能的な因子を予測することは難しい。そのためタンパク質の詳細な構造からではなく、もし分子内運動の観測ができれば、タンパク質内の部位に対して機能性を比較し予測することが原理的に可能である。

アルツハイマー病に関わるタウタンパク質のリン酸化では、タウタンパク質が天然変性タンパク質の一種であることから発病に起因する構造が明らかになっていない。そこで我々は、X線1分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking: DXT)を用いて、タウタンパク質のリン酸化に関わる部位と分子内運動性の違いについて調べた。

本研究で使用しているDXTは、数十ナノメートルサイズの金ナノ結晶を標的分子に運動機能を損なわないように標識し、エネルギー幅の広い白色X線(10-18 keV)を照射する。標識した金ナノ結晶からの分子運動に連動するラウエ回折点を時分割的に追跡することで、標識分子の分子内運動を0.1 nmの精度で観測することが可能である。その原理をFig. 1に示す。X線に対して平行な方向は、 θ 方向の回転運

動に対応し、X線に対して垂直な回転軸を持つ χ 方向の分子内運動をDXTにより観測することが出来る。またDXTで追跡しているタンパク質1分子の運動は、溶液中における機能的運動を含む分子内運動である。

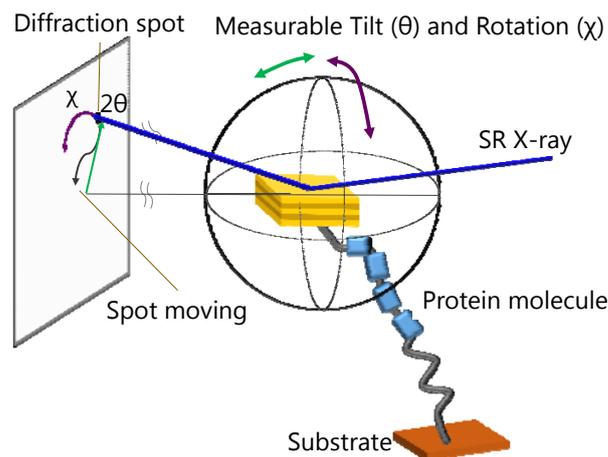


Figure 1

Schematic drawing of the Diffracted X-ray Tracking (DXT). In DXT, we observe diffraction spots from Au(111) and (200) along two dimensions, θ and χ .

2 タンパク質への金ナノ結晶標識とサンプル調整

金ナノ結晶は、KCl(001)基板の上にアイランド状態を維持したままエピタキシャル成長させることで約20-30 nm程度に調整した。また金ナノ結晶は標的タンパク質のアミノ配列内にあるメチオニンやシステインのチオールと金の間で共有結合している。

3 白色X線を用いたDXT測定

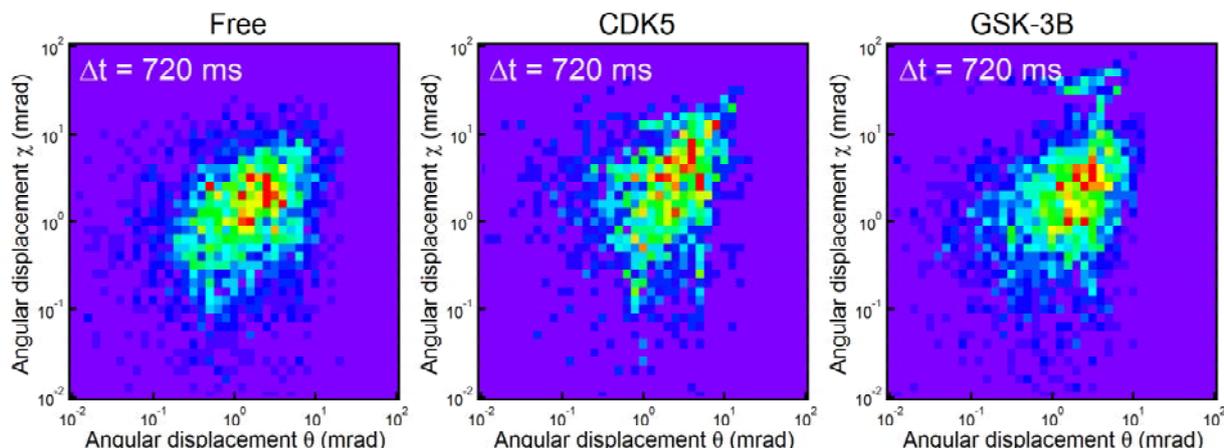


Figure 2

Sequences of 2D histogram. 2D histogram can show displacement of θ and χ with respect to time.

比較的広範囲に動くタウタンパク質と結合している金ナノ結晶からの回折斑点を追跡するためには、波長帯が広くかつ大強度の白色 X 線を用いることが必要となる。そのため、大強度の準白色放射光の利用が可能な PF-AR の NW14A ビームラインを用いた。

DXT における回折動画撮影は、36 ms/frame で 90 枚測定した。また、サンプルへの X 線照射ダメージを避けるため、4 mm x 4 mm のサンプル内を測定毎に位置を変え各条件で 36 回測定した。すべての回折点において、 (θ, χ, t) を追跡し統計量を算出した。

4 結果と考察

タウタンパク質は、リン酸化していない天然状態 (Free)、CDK5 を用いてリン酸化した状態 (CDK5)、GSK-3 β を用いてリン酸化した (GSK-3 β) の 3 条件について、各々のタンパク質について分子内揺らぎを比較した。

Free における時間に対するタンパク質分子の運動の大きさを算出し、これらの 1 つの金ナノ結晶の運動の統計量を出すことにより各状態における揺らぎを比較した。金ナノ結晶の移動量より、 θ と χ 方向の移動量の時間変化を同時に現わした 720 ms での 2 次元ヒストグラムを Fig. 2 に示す。各状態における詳細な運動に微細な違いが観測された。CDK5 ではリン酸化された場合には Free と比べて θ と χ 方向ともに多く運動していることが分かった。結果、Free にたいして CDK5 でリン酸化した場合、より大きな運動する分子が多くなっているのに対して、GSK-3 β でリン酸化した場合では運動の小さい分子が多いことが分かった。以上の結果より、GSK-3 β でリン酸化した場合では平均的な運動量 (移動量の平均値) では CDK5 と比べて小さくなった。

5 まとめ

DXT 測定により、決まった構造を取らないタウタンパク質のリン酸化状態における運動変化を観測することが出来た。分子内部運動のヒストグラムを取

ることにより微差な運動差からリン酸化に伴う運動性を議論出来る可能性が示された。

将来的には、アルツハイマー病患者から採取したタウタンパク質についても測定を行いたい。

謝辞

本実験を行うにあたり、野澤俊介准教授、佐藤篤志研究員にご協力いただきました。深く感謝致します。

参考文献

- [1] Y.C. Sasaki, Y. Okumura, S. Adachi, H. Suda, Y. Taniguchi, and N. Yagi, *Phys. Rev. Lett.* **87**, 24 (2001).
- [2] Y. Okumura, T. Oka, M. Kataoka, Y. Taniguchi, Y.C. Sasaki., *Phys. Rev. E* **70**, 021917 (2004).

成果

志村眞弘、
物構研サイエンスフェスタ 2013 学生奨励賞「構造を持たないタウタンパク質 1 分子の動的挙動計測」

* ycsasaki@k.u-tokyo.ac.jp