

X線1分子追跡法を用いたタウタンパク質の動態計測

志村眞弘¹, 松下祐福¹, 一柳光平², 関口博史³, 佐々木裕次^{1,3}¹ 東京大学大学院新領域創成科学研究科物質系専攻, ² 高エネルギー加速器研究機構,³ 公益財団法人 高輝度光科学研究センター SPring-8/JASRI

Observations of Tau Protein's Disordered Structures using X-ray Single Molecule Observations

Masahiro SHIMURA¹, Yuufuku MATSUSHITA¹, Kouhei ICHIYANAGI²,
Hiroshi SEKIGUCHI³, Yuji C. SASAKI^{1,3}¹Department of Advanced Materials Science, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo,²High Energy Accelerator Research Organization, ³SPring-8/JASRI

Abstract

アルツハイマー病患者には、微小管の重合や安定化に寄与するタウタンパク質分子のリン酸化が特異的に見られており、異常にリン酸化されたタウタンパク質分子がミトコンドリアの軸索輸送を阻害してアルツハイマー病を引き起こすと考えられている。しかしタウタンパク質分子は構造を持たない部分を有する天然変性タンパク質であるため、その構造機能解析は非常に困難である。

本稿ではX線1分子追跡法 (Diffracted X-ray Tracking: DXT) を用いて今日まで行ってきた実験で得られている成果と、今後の研究の展開について議論したい。

1. X線1分子追跡法の原理とその発展

科学は計測技術の発展とともに進歩してきたといっても過言ではない。ルネサンスの時代が華開く前の16世紀後半、デンマークの天文学者であったティコ・ブラーエは、デンマーク王フレデリック2世の援助を受けて天文台を建設し、従来よりもはるかに高精度な六分儀などの観測機器を作り出した [1]。その結果、高い精度で行われた天体観測が知識をより精密化させたことで、従来の理論の不十分性や実際の観測との齟齬が暴き出された。近代物理学の法則であるためには精密な定量的観測と統計的に精度の保証されたデータで裏付けられ、かつ厳密に定義された数学的言語で表現されていることが必要であり [1]、これにはまず現象を精密に測定する手法の出現が必須となる。

時代が進み、現代の生物物理の分野においても、ナノテクノロジーの発展に伴って1分子計測という新たな分野が確立されつつある。分子の機能的特徴を理解する上では、そのダイナミクスを調べるのが重要であり、従来の多数の分子の平均をとる測定手法と比較して、不均一系の中の分子の分布や、運動を平均化した情報の中に埋もれてしまう分子の揺らぎを、動的あるいは静的な運動情報として得ることが出来る [2]。

1分子計測の歴史は古く、可視光領域のプロープを利用した蛍光1分子検出法は1976年にT. Hirschfeldが開発した手法に始まる [3]。それ以降、計測制度の向上を図るべく様々な改良が為されてきたが、測定精度限界は光の波長の短さに依存しており、可視光を用いる既存の手法ではそ

の精度は数ナノメートル程度となるため、10ナノメートルほどのサイズとなるタンパク質1分子の情報を抽出するには限界があった [4]。

本研究で使用しているDXTは、標的分子に対して、その運動機能を損なわないように数十ナノメートルサイズの金ナノ結晶を標識し、強力で幅広い波長域を持つ白色X線を照射する。分子の動きに連動する金ナノ結晶からのラウエ回折斑点を時分割追跡することで、標的分子の分子内運動を0.1 nm程度の精度で観測することが可能である [5]。

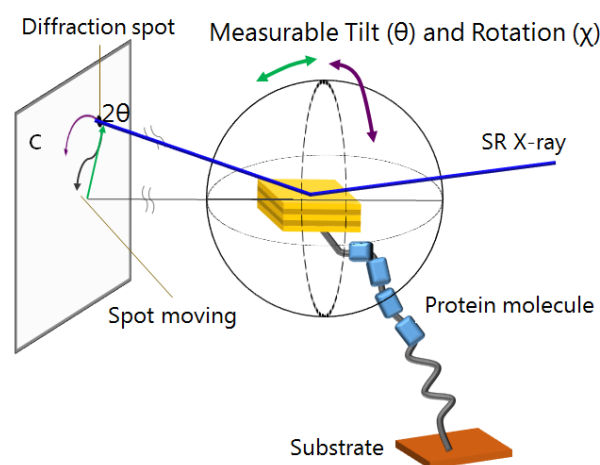


Figure 1 Schematic drawing of the Diffracted X-ray Tracking (DXT). In DXT, we observe diffraction spots from Au(111) and (200) along two dimensions, θ and χ .

その原理を Fig. 1 に示す。

標的 1 分子の一部に構造変化が起ると、その部位に標識されているナノ結晶が構造変化と同期して運動し、金ナノ結晶の方位が変化することで回折斑点の位置が動く。測定次元としては、極座標表示のうちの θ 方向、 χ 方向について独立な次元として測定することができる。基板の垂直方向に対して平行となる微小運動は、 θ 方向の回折斑点の運動に対応し、タンパク質の面内方向の回転運動には χ 方向の回折斑点の運動が対応している。我々のラボではこの X 線 1 分子追跡法を用いて、イオンチャンネルの AChR やシャペロニンの回転運動といったタンパク質の動的運動計測に留まらず、金ナノ結晶をマーカーとして用いて力場の測定なども行ってきた [6][7]。

2. タウタンパク質とアルツハイマー病

平均寿命の延伸と出生率の低下により地球規模で人口高齢化が進行しているが、中でも特に日本の高齢化は急速に進んでおり、認知症患者の数は 2012 年の段階で 462 万人にも上るとされている [8]。

アルツハイマー病は認知症患者の中で最も多く見られる病気で、脳の細胞が変異を起こして記憶障害や判断力の低下などが起こる病気である [9]。アルツハイマー病の病理的特徴として神経原線維変化 (Neurofibrillary tangles: NFT) と老人斑 (senile plaque: SP) が見られる。神経原線維変化は過剰にリン酸化されたタウタンパク質が神経細胞内で凝集したものであり、老人斑とは神経細胞外において β アミロイドから成る構造物である [10]。

この神経原線維変化の元となるタウタンパク質は、人間の中枢神経細胞に多量に存在するタンパク質で、神経軸索を構成する微小管に結合して、その重合の促進や安定化をする役割を果たす [11]。その構造は N 末部分、proline-rich な部分、4 つの微小管結合領域部分、C 末部分の 4 つの部分に分けることが出来る [12]。Fig. 2 に示すよ

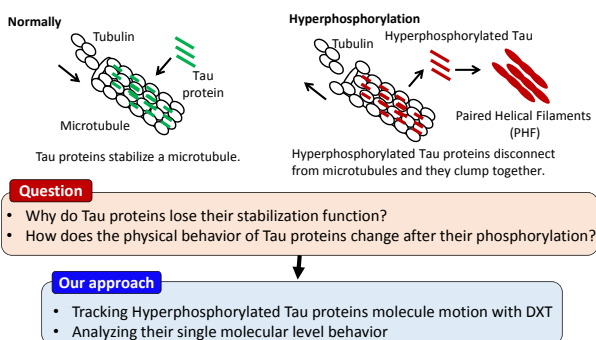


Figure 2 Tau proteins have partly disordered structures. They bind microtubules to stabilize them. But when Tau proteins are hyperphosphorylated, they disconnect from microtubules and clump together. Aggregated Tau proteins form the Paired Helical Filaments (PHF). We have tracked hyperphosphorylated Tau proteins molecule motions using the Diffracted X-ray Tracking (DXT) to reveal mechanisms of loss in Tau proteins functions.

うに、このタウタンパク質が過剰にリン酸化されると微小管との結合機能を喪失する。そして剥がれたリン酸化タウタンパク質が細胞内で凝集し (Paired Helical Filament: PHF)、軸索輸送を阻害することによって神経細胞の死を引き起こす [13]。

このようなメカニズムからアルツハイマー病の原因物質と考えられているタウタンパク質であるが、構造を持たない部分を有する天然変性タンパク質の一種であるために、X線結晶構造解析などによる構造解析は困難な状況である。この天然変性タンパク質とは、天然状態で決まった形を持たないタンパク質の総称である。タンパク質がその機能を発揮するのは天然構造という決まった構造を持っている時であると長い間考えられてきたが、近年天然状態で変性したタンパク質が広範囲にかなりの割合に存在していることがわかってきた [14]。

タウタンパク質をリン酸化する酵素は大別して 3 種類に分けられ、そのうちの 1 つである proline-directed kinase に帰属される GSK-3 β と CDK5 と呼ばれる酵素がある [15]。これらは、アミノ酸配列中のセリンやスレオニンをリン酸化する酵素であり、過剰リン酸化されたタウタンパク質では proline-directed site の多くがリン酸化されているため、GSK-3 β と CDK5 がタウタンパク質の過剰リン酸化に大きな影響を与えていると考えられている [16][17]。

3. タウタンパク質への金ナノ結晶の標識

本手法の要点は、タンパク質 1 分子に対して金ナノ結晶を標識し、そのラウエ回折点を高精度かつ適切な時間分解能で測定することにある。ラベルとなる金ナノ結晶は Fig. 3 に示すように、KCl(100) 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 20-40 nm 程

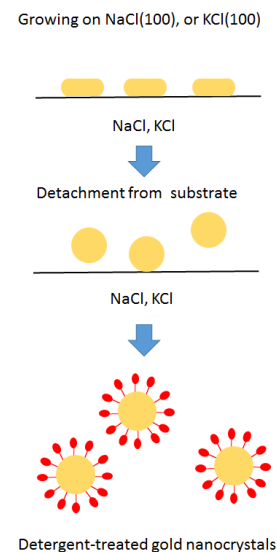


Figure 3 This figure explains the preparation of gold nanoparticles. A gold thin layer deposit on substrate using the vacuum evaporation and the deposited gold formed islands on substrate. Then, the deposited gold was dispersed in detergent solutions.

度の大きさで得ることが出来ている [18]。

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との共有結合を利用して結合させている。実際には、金ナノ結晶が載っている基板表面を界面活性剤入りのバッファーで洗い流し、これをタンパク質が固定されている基板に滴下することで標識しているため、金ナノ結晶の配向は一意に制御できないという課題がある。比較的広範囲に動く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。

4. 実験結果

実験は PF-AR NW14A において行われた。このビームラインの特徴は大強度の準白色放射光が利用できる点であり、前節で触れたように、金ナノ結晶からの回折斑点の位置を時分割的に追跡する DXT の実験を行う上で非常に適したビームラインである。DXT の装置配置写真を Fig. 4 に示す。

基板の垂直方向に対して平行となる微小運動は、 θ 方向の回折斑点の運動に対応し、タンパク質の面内方向の回転運動には χ 方向の回折斑点の運動に対応する。

DXT で追跡しているタンパク質 1 分子の運動は、溶液中における分子自身のブラウン運動である。

実験条件として、リン酸化を行っていない天然状態のタウタンパク質、そしてリン酸化酵素として CDK5 及び GSK-3 β を用いてリン酸化を行ったタウタンパク質について測定を行った。タウタンパク質には複数のリン酸化サイトが存在し、リン酸化酵素の種類によってどのリン酸化サイトをリン酸化するかは異なる [19]。

また、タウタンパク質には 6 種類のアイソフォームが存在し、微小管結合部位と挿入部位が各々異なっている。本研究では微小管結合領域の繰り返しを 4 つ持つ 0N4R を

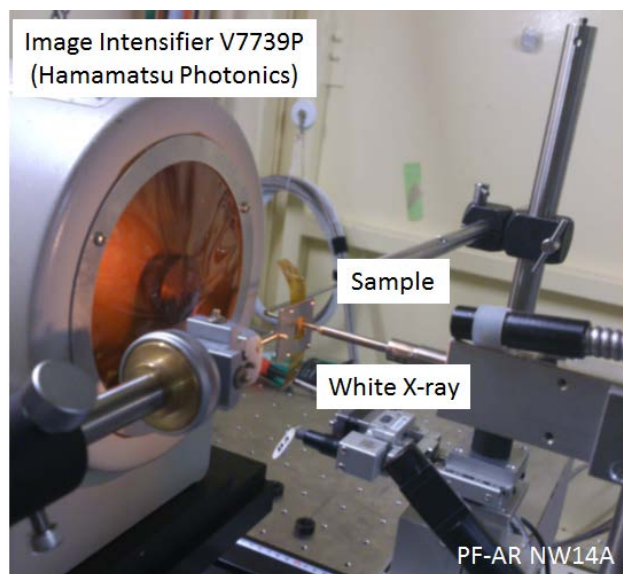


Figure 4 Photograph of the instrumental arrangements for DXT at PF-AR NW14A.

主に用いている。このタンパク質分子は、381 残基で分子量約 5 万の分子であり、その大きさは 50 nm 程度である [20]。

リン酸化をしない天然状態 (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状態 (GSK-3 β) の 3 条件について、各々のタウタンパク質分子が時間に対してどれだけ揺らいだかを測定した結果、天然状態に対して CDK5 でリン酸化した場合にはより大きく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には運動の小さい分子が多いことがわかった。一例として、天然状態における時間に対するタンパク質分子の揺らぎの大きさを表した図を Fig. 5 に示す。

通常、タンパク質はリン酸化によって親水基であるリン酸基が導入されると疎水性部分が大きく親水性に傾くため、水中での運動が大きくなると考えられる。

そのため、CDK5 でリン酸化された場合においては、MSD の値が Free と比較して大きくなったことはリーズナブルな結果となったが、GSK-3 β でリン酸化した場合には MSD の値が小さくなったことについては意外な結果となった。

以降、PF-AR や SPring-8 において同様の実験を繰り返して再現性を確かめた結果、いずれの実験においても GSK-3 β でリン酸化した場合には MSD の値が小さくなった。この結果から、GSK-3 β によって特異的にリン酸化されるサイトがリン酸化されることによって何らかの構造変化を誘発し、分子が硬化した可能性が示唆された。

本稿の Fig. 5 で紹介したプロットの他に、 $\theta \cdot \chi$ の各方向について移動度に対する分子数の分布を示す 1 次元ヒストグラム (Fig. 6)、 $\theta \cdot \chi$ 両方向に対して移動度の時間変化を

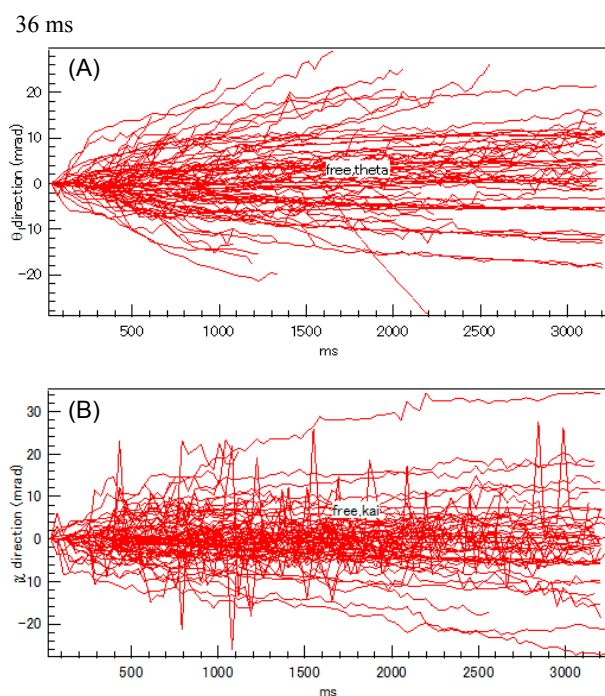


Figure 5 Each molecules displacement with respect to time interval Δt . Frames are spaced at 36 ms intervals. (A) show displacement of θ direction, and (B) show displacement of χ direction.

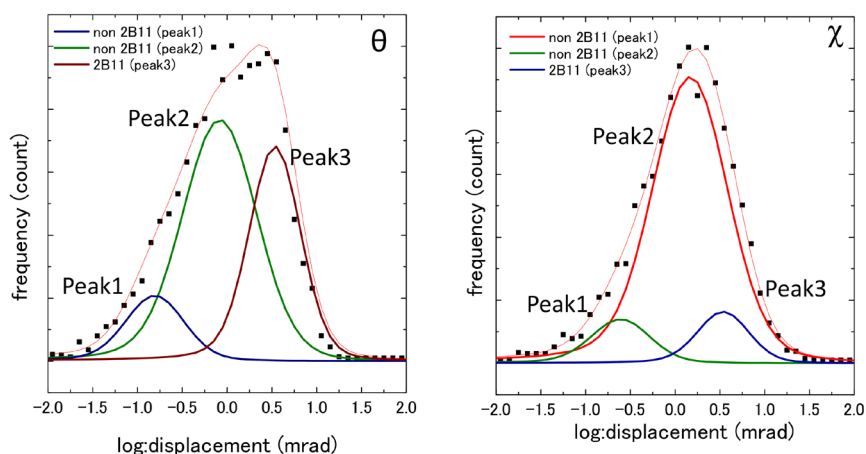


Figure 6
An example of 1D histogram. 1D histogram shows displacement distribution of Tau protein molecules. When the antibody 2B11 was bound to the Tau protein, new peak, peak3, rose in higher displacement. This peak indicate effect of the binding antibody against Tau protein molecule.

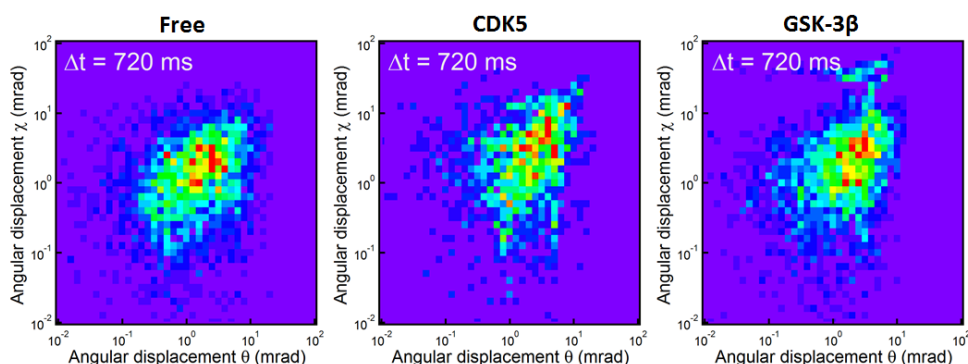


Figure 7 Sequences of 2D histogram. 2D histogram can show displacement of θ and χ with respect to time.

同時に現した2次元ヒストグラム (Fig. 7) があり、それぞれの指標を用いてリン酸化に伴うタウタンパク質分子の構造ダイナミクスを解析している。

5. 撮影速度変化の試み

2. で述べたように、これまでタウタンパク質1分子の分子内動態計測は行われたことがなかった。そのため本研究では、タウタンパク質分子の構造変化の時定数についての知見を得るため、PF-AR での実験において、ソレノイドシャッターとカメラの同期を調整して 36 ms, 300 ms と撮影速度を変化させて (SPring-8 では高速カメラを用いて 100 μ s/frame で撮影した)、異なる時間幅での分子の運動の違いについても検証を重ねている。その結果、マイクロ秒の時分割測定ではリン酸化タウタンパク質の硬化現象を検出することが難しく、数十ミリ秒での時分割測定によって明確な硬化現象を確認できることがわかっている。

6. 今後に向けて

本実験では、タウタンパク質のリン酸化は 24 時間しか行っていないが、人間の体内では、タウタンパク質にとっては更に過酷で複雑な環境下で長期間にわたるリン酸化が

行われているため、体内で起きているタウタンパク質のリン酸化を再現できているとは言い難い。そのため将来的には、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の測定も行いたい。

7. 謝辞

本稿で紹介した研究は、同志社大の井原康夫教授、宮坂知宏助教との共同研究によるものである。またタウタンパク質の DXT 計測は、PF-AR NW14A において行われた。実験にあたって野澤俊介准教授、佐藤篤志研究員にご協力いただいた。深く感謝する。

参考文献

- [1] 山本義隆, 磁力と重力の発見 (みすず書房, 2003), p.705.
- [2] P. Hinterdorfer and A. van Oijen ed., Handbook of Single-Molecule Biophysics (Springer, 2009), p.3.
- [3] A. A. Deniz, S. Mukhopadhyay, and E. A. Lemke, J. R. Soc. Interface **5**, 15 (2008).
- [4] Y. C. Sasaki, Y. Okumura, S. Adachi, H. Suda, Y. Taniguchi, and N. Yagi, Physical Review Letters **87**, 24

(2001).

- [5] Y. C. Sasaki, Y. Okumura, S. Adachi, Y. Suzuki, and N. Yagi, Nucl. Instrum. Methods A. **467**, 1049 (2001).
- [6] H. Sekiguchi, A. Nakagawa, K. Moriya, K. Makabe, K. Ichianagi, S. Nozawa, T. Sato, S. Adachi, K. Kuwajima, M. Yohda, and Y. C. Sasaki, PLoS ONE **8**, e64176 (2013).
- [7] N. Ogawa, K. Hoshisashi, H. Sekiguchi, K. Ichianagi, Y. Matsushita, Y. Hirohata, S. Suzuki, A. Ishikawa, and Y. C. Sasaki, Scientific Reports **3**, 2201 (2013).
- [8] 厚生労働省編, 第45回社会保障審議会介護保険部会資料(2013)資料6.
- [9] R. J. Bateman, C. Xiong, T. L. Benzinger, A. M. Fagan, A. Goate, N. C. Fox, et al., New England Journal of Medicine **367**, 795 (2012).
- [10] L. Martin, X. Latypova, C. M. Wilson, A. Magnaudeix, M. L. Perrin, C. Yardin, and F. Terro, Ageing Research Reviews **12**, 289 (2013).
- [11] G. Lindwall, and R. D. Cole, J. Biol. Chem. **259**, 5301 (1984).
- [12] C. Ballatore, V. M. Y. Lee, and J. Q. Trojanowski, Nature Reviews Neuroscience **8**, 663 (2007).
- [13] T. Kambe, et al., Neurobiology of Disease **42**, 404 (2011).
- [14] 寺島正秀, Molecular Science **7**, A0063 (2013).
- [15] K. Ishiguro, M. Takamatsu, K. Tomizawa, A. Omori, M. Takahashi, M. Arioka, T. Uchida, and K. Imahori, J Biol Chem. **267**, 10897 (1992).
- [16] M. Goedert, and R. Jakes, Biochim. Biophys. Acta. **1739**, 240 (2005).
- [17] D. P. Hanger, B. H. Anderton, and W. Noble, Trends Mol. Med. **15**, 112 (2009).
- [18] Y. Okumura, T. Miyazaki, Y. Taniguchi, and Y. C. Sasaki, Thin Solid Films **471**, 91 (2005).
- [19] E. Planel, X.-Y. Sun, and A. Takashima, Drug Development Research **56**, 491 (2002).
- [20] N. Hirokawa, Y. Shiomura, and S. Okabe, The Journal of cell biology **107**, 1449 (1988).

(原稿受付日:2014年6月20日)

著者紹介

志村真弘 Masahiro SHIMURA



東京大学大学院 新領域創成科学研究科
物質系専攻 修士課程2年
〒277-8561 千葉県柏市柏の葉5-1-5 基
盤棟609(7H8号室)
TEL: 04-7136-3892 (内線63892)
e-mail: 2660350345@mail.ecc.u-tokyo.
ac.jp

略歴: 2013年3月慶應義塾大学理工学部化学科卒業。
2013年4月東京大学大学院新領域創成科学研究科物質系
専攻入学。

趣味: 食べること

松下祐福 Yuufuku MATSUSHITA



東京大学大学院 新領域創成科学研究科
物質系専攻 博士課程1年
〒277-8561 千葉県柏市柏の葉5-1-5 基
盤棟609(7H8号室)
TEL: 04-7136-3892 (内線63892)
e-mail: 8113178469@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

略歴: 2012年千葉大学工学部共生応用
化学科卒業。2014年3月東京大学大学院新領域創成科学
研究科物質系専攻修士課程修了。現在、同博士課程在学中、
日本学術振興会特別研究員(DC1)。

趣味: スキューバダイビング

一柳光平 Kouhei ICHIYANAGI



高エネルギー加速器研究機構 物質構
造科学研究所 特任准教授
〒305-0801 茨城県つくば市大穂1-1
TEL: 029-879-6186
e-mail: kouhei.ichianagi@kek.jp

略歴: 2014年 物質構造科学研究所特
任准教授。博士(理学)。

最近の研究: 時間分解X線回折法による物質ダイナミクス
の研究

趣味: 園芸

関口博史 Hiroshi SEKIGUCHI



(公財)高輝度光科学研究センター 利
用研究促進部門 研究員

〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都
一丁目1番1号

TEL: 0791-58-0833 FAX: 0791-58-0830

e-mail: sekiguchi@spring8.or.jp

略歴: 2004年 東京工業大学生命理工学
研究科博士課程修了。博士(理学)。

最近の研究: タンパク質の分子内ダイナミクス計測

趣味: 自転車, 野球全般

佐々木裕次 Yuji C. SASAKI



東京大学大学院 新領域創成科学研究科
物質系専攻 教授

〒277-8561

柏市柏の葉5-1-5 基盤棟609

TEL: 04-7136-3856 FAX: 04-7136-3857

e-mail: ycsasaki@k.u-tokyo.ac.jp

略歴: 1991年東北大学大学院工学研究
科博士課程修了(工学博士)。

最近の研究: X線, 電子線, そして中性子を用いた新規1
分子計測法の考案と学融合研究。

趣味: メジャー雑誌に投稿して落ちまくること, 科学啓蒙
活動及び執筆。