

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006 ～ 2008

課題番号：18310148

研究課題名 (和文)

パーキンソン病に関わる蛋白質の中間領域中性子散乱法による構造研究

研究課題名 (英文)

Structural study of Parkinson disease related protein by intermediate region neutron scattering method

研究代表者

古坂 道弘 (MICHIMIRO FURUSAKA)

北海道大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：60156966

研究成果の概要：

パーキンソン病では、脳細胞内にシヌクレインタンパク質が繊維化したものを主成分とする異常な凝集体が見られる。正常なシヌクレインタンパク質と、遺伝子疾患患者から見つかった A53T 変異体の凝集機構を動的散乱で測定した。従来推測されていたのとは逆に、A53T 変異体の方が異常な凝集をおこしにくいことが判明した。凝集の初期状態の測定に適している小角散乱よりは大きな角度の散乱が測定可能な中性子の中間領域散乱実験装置を建設した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2007 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：機器分析、神経変性疾患、動的散乱、中性子散乱

1. 研究開始当初の背景

この申請を提出した当時の研究代表者は高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所の内藤幸雄特任教授であった。内藤特任教授は平成 19 年度に病気療養が必要になり、最終年度は研究代表者が現在の古坂道弘に引き継がれた。当初の申請代表者であった内藤は、それまで幾つかの民間の研究所において研究活動を行って来た。その経験の中から、医学—生理学—物理学の研究者ネットワークを作る事により、従来の学術的なアプロ

ーチとは全く異なった視点から、生物学、医学に貢献できると考えていた。その第一ステップとして申請者らは、パーキンソン病、アルツハイマー病などの脳疾患に関連した蛋白質の会合と凝集に焦点を当て、蛋白質水溶液構造を明らかにしようとしていた。タンパク質の希薄溶液を中性子小角散乱、あるいは通常の小角散乱よりは運動量変化 Q の大きな領域まで拡大した中間領域での散乱実験および、動的散乱、AFM などによる測定を行っていた。ここで中間領域散乱 (Intermediate-Angle Scattering) とは

請者等の造語であり、適当な術語が無いため、ここでは小角散乱と単結晶回折あるいは粉末結晶回折の測定の間の中間領域（角度）の散乱という意味で使っている。

パーキンソン病を初めとする種々の脳疾患には、タンパク質の異常な凝集による細胞死が関係していることは良く知られていることである。脳疾患の結果として β -アミロイドによる老人斑形成、 α -シヌクレインを主成分とする Lewy 小体の形成、タウの線維化等が見られる。この研究を始めた時にはこれらの線維化自体が病因であり、関連タンパク質の異常な凝集、線維化（異常な凝集現象の最終過程）を阻止することがこれらの脳疾患を治療するための戦略であるというのが通説であった。例えばチオフラビン等を用いた β シート構造の増加を伴う線維化を抑制する剤が提案されていた。

しかし一方で、凝集体の形成は、タンパク質の異常な凝集プロセスで生じる毒性の高いオリゴマーによる脳神経細胞の死を救うためのシステムではないかとする考えが提唱されていた。すなわち、毒性の高い、タンパク質が何個か会合した水溶性のオリゴマーを水不溶性の生理活性の低い凝集体として細胞内外に隔離しているのではないかとする考えである。もしこれが正しいとすれば、先に述べた線維化を抑制する方法は、有毒であるタンパク質のオリゴマーを線維化して無毒化する過程を阻害し、病気の症状の進行をかえって促進するという可能性をもつことになる。

このような情勢の中で、我々は問題となるタンパク質がどのように会合してオリゴマーになり、さらに線維化して行くのか、どのような条件でそのようなことが進行するかを明確にすることが不可欠であると考えていた。また、現在もその重要性は変わらないと考えている。一方、パーキンソン病に関連するタンパク質の一つである UCH-L1 の希薄溶液を中性子小角散乱で研究していく過程で、溶液の PH、塩濃度などの微妙な変化でタンパク質の会合状態が大きく変化することが分かって来ていた。通常は会合状態なんの影響も無いと思われているような操作でも、会合、線維化を起こしてしまい、状態が全く変化してしまうなどの経験をしたこともある。

このような状況の中では、タンパク質溶液の中性子、あるいは X 線の小角散乱がもっとも強力な手段になる。X 線小角散乱、あるいは放射光の小角散乱装置は中性子のそれに比較し、数桁も強度が強い。そのため、圧倒

的に計測時間が短く、数秒で 1 測定が完了する。これに対し、中性子小角散乱では、1 測定に数時間がかかる。しかし、その強度故に、X 線では試料に対する損傷が問題になる。今のように、会合のような非常に微妙な相互作用を問題にする場合、そのような損傷の問題は避けて通れないため、中性子での測定には利点がある。

さて、UCH-L1 たんぱくであるが、wild のタンパク質と、パーキンソン病になりやすい家系の DNA から再構成したものでは、アミノ酸シーケンスが 1 ヶ所違うだけである。そのような試料で中性子小角散乱を行うと、それぞれのタンパク質で形状がわずかに異なっていることが我々の研究で明らかになって来ていた。このような形状変化を測定するためには、会合の状態がほとんど変化しないような希薄溶液で、さらに、実空間で小さなスケールに対応した情報が取れる、運動量変化の大きな領域、 $Q \geq 2\text{nm}^{-1}$ の測定が不可欠である。X 線の小角散乱では、通常この領域では窓材からのバックグランドが無視出来ないこと、溶媒である水の散乱断面積が大きく、良好な S/N が取れないなどの困難が有る。中性子小角散乱では、X 線に比較して断面積の差が大きく、S/N を良く出来る可能性が高く、X 線に比較すればまだ測定が容易になる可能性が高い。

しかしながら、中性子小角散乱を行うための装置は現在国内に 2 台しか無く、マシンタイムが十分には取れない状況である。このため、そのような領域の中性子小角散乱を十分なマシンタイムで測定出来るような装置は、国内はもとより、海外にもほとんど無いと言ってよい状況であったし、現在もそのような状況は変化していない。

2. 研究の目的

パーキンソン病に罹病したヒトの脳では、神経細胞死の亢進がおこり、ドーパミン産生細胞が減少する。ドーパミンの現象でパーキンソン病になると考えられている。このような病気にかかったヒトの脳では Lewy 小体と呼ばれる、シヌクレインを主成分とする異常なタンパク質の凝集体が見られる。最初に述べたようにこのようなタンパク質の線維化、凝集体を作ることは、毒性の高いタンパク質のオリゴマーによる細胞死を防ぐための機構なのではないかという仮説がある。そこで、wild なシヌクレインと、遺伝子疾患患者から見つかった A53T 変異体との動的散乱実験による会合状態の研究を行うことを目的と

した。また、このような研究を行うためには中性子の中間領域散乱が強力な手段となるため、そのような測定が可能になる装置の建設を行うこととした。しかし、中性子散乱実験装置を建設するのはそれほど容易なことではないため、また、中性子小角、中間領域散乱を取る上で必要なデータを取るという意味も含め、平行して動的光散乱法によってシヌクレインの会合過程、高分子化の過程の測定を行うこととした。

3. 研究の方法

パーキンソン病の原因タンパク質である、 α -シヌクレインの wild-type と遺伝子疾患患者から見つかった A53T 変異体を、大腸菌を用いて、酸化的雰囲気下で合成・精製した試料の中性水溶液中でのモノマー、オリゴマー構造を動的光散乱法で測定をおこなった。

また、中間領域中性子散乱装置に関しては、研究用原子炉 JRR-3 の C1-3 冷中性子ガイド管に設置された極小角中性子散乱実験装置 (ULS) のモノクロメータ遮蔽の位置に設置することとした。

4. 研究成果

wild の α -シヌクレイン、遺伝子疾患患者から見つかった A53T 変異体試料について動的光散乱測定を行った結果を図 1 に示す。双方ともこの状態ではまだモノマーが存在し、wild type, A53T 両者ともに似たような凝集プロセスを経ることが分かる。しかし、wild type の方が A53T に比べて比較的初期の段階から高分子凝集体を形成し易いという結果が得られた。

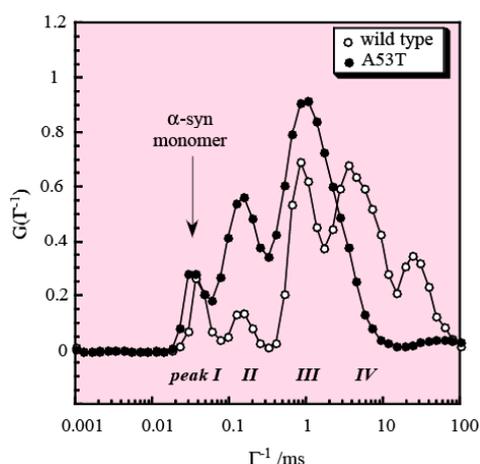


図 1 α -シヌクレイン及び A53T 変異体試料の動的光散乱による初期的な凝集過程における分子サイズ分布。

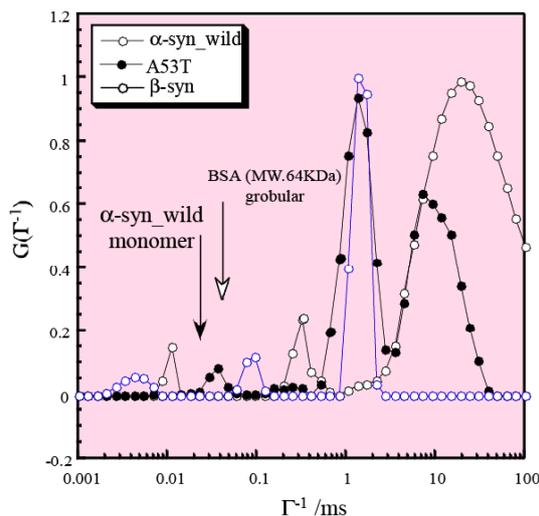


図 2 wild の α -シヌクレイン (黒色白抜き)、A53T 変異体 (黒丸) 及び、乾燥凍結品を溶解した β -シヌクレイン (青色白抜き) に対する動的光散乱の実験結果。

次に、 4°C で 12 時間攪拌溶解したそれぞれの試料、及び、凝集し難いと言われている凍結乾燥品 β -シヌクレインの可溶物について動的光散乱の実験を行った結果を図 2 に示した。これをみると、凝集し難いと言われている凍結乾燥品 β -シヌクレインの可溶物にはモノマーが見られず、 $\Gamma^{-1}=1\text{ms}$ より少し長い時間のところにピークが見られ、凝集中間体を作っているのが分かる。しかし、これは溶解性も高く、高分子凝集体ではない。これに対し、wild-type の α -シヌクレインには $\Gamma^{-1}=30\text{ms}$ の付近に大きなピークがあり、高分子凝集体が見られるが、凝集中間体は見られない。また、wild-type より線維化し易いとされる A53T 変異体であるが、 $\Gamma^{-1}=8\text{ms}$ の付近に高分子凝集体が見られるが、それとともに溶解性の高い凝集中間体も見られる。

結果をまとめると、wild type, A53T 両者ともにランダムコイル状であり、wild type, A53T 両者ともに同様な凝集プロセスを経ることが分かる。さらに、ランダム凝集ではなく、もし一定の大きさの凝集中間体を経て凝集すると仮定すると、凝集体は何らかの構造をとる可能性があることが示唆される。

これまでの多くの研究者が行ってきたような、チオフラビンを用いたシヌクレインの凝集 (β -sheet 構造依存) とは異なり、凝集の初期過程においては、A53T 変異体は wild type より凝集し難く、凝集中間体として長く水中に存在することが示唆された。

A53T はパーキンソン病患者から同定された変異体であり、細胞毒性（細胞死をもたらす）が強いとすれば、今後、モノマーからの、凝集機構がどうなっているのかを知ることが非常に重要となる。

シヌクレインの研究と平行して、中間領域散乱（Intermediate-Angle Scattering、iANS）実験装置の製作／設置を行った。この装置は日本原子力研究開発機構（JAEA）の研究用原子炉 JRR-3 の C1-3 冷中性子ガイド管に設置された極小角中性子散乱実験装置（ULS）のモノクロメータ遮蔽の位置に設置した。モノクロメータとしては湾曲化シリコン完全結晶を用い、5.8Å の中性子を取り出した。

中間領域散乱の測定を行うためには広い立体角をカバーする検出器が不可欠であり、これまで高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所中性子科学研究施設の小角散乱装置 SWAN で用いていた直径 1/2 インチ、有効長 607mm を持ったチューブ型の 1 次元位置敏感型 PSD を 48 本並べて 2 次元検出器にしたものを再利用している。この様子を図に示した。この装置で測定出来る Q 範囲はほぼ 0.6 nm^{-1} から 6 nm^{-1} の領域となる。また、最小角での Q 分解能は約 30% であり、このような高強度低分解能の測定には十分な分解能を持っている。図 3 に PSD ユニットの装置への設置状況の写真を示した。

この装置と相補的に利用出来る小型集束型中性子小角散乱装置（mfSANS）があり、通常の小角散乱領域、 $5 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ から 0.6 nm^{-1} が測定出来る仕様となっている。このため、この PSD のデータ収集エレクトロニクスは同じ計算機、同じ National Instrument 社製 LabView ソフトウェアで制御出来るようにソフトウェアを整備した。また、生データを読み込み、データ解析を行い、様々な表示をするソフトウェアの基本部分については Wolfram Research 社製の Mathematica で開発した。このような中間領域散乱装置を用い、直接ビームの測定、標準試料の測定を行い、 $Q=6 \text{ nm}^{-1}$ までの測定が出来ることが確認された。

モノクロメータへビームを供給するガイド管は Ni 製膜した冷中性子ガイド管であり、その口径は幅 20mm 高さ 50mm である。このビームの直下には別の装置へのガイド管／コリメータが設置されており、このビームの下側 15mm はほとんどビームが来ない状況であり、また、上側 10mm のビーム強度は弱いことが判明した。また、単結晶の湾曲化装置の機構により、結晶の一部分しか湾曲せず結晶



図 3 中間領域散乱測定装置に設置された一次元位置敏感検出器（PSD）ユニット。1 ユニットの 8 本の PSD が設置されている。

での中性子反射強度が弱いことが判明した。

この湾曲化結晶モノクロメータでの測定を行う過程で、結晶を出たビームがある限られたアパーチャーを通過する必要がある場合には、入射中性子のビーム発散角に比例して強度が増すことが分かった。逆に結晶の湾曲極度を大きくしても、ガイド管から出てくる中性子の発散角が小さい場合には強度を上げることは出来ない。つまり、中性子強度を上げるためには結晶の湾曲度を通常より一桁以上上げるとともに、それに見合った発散角の大きな中性子を入射する必要がある。

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 1 件）

- ① M. Sugiyama, M. Furusaka et. al. SANS simulation of aggregated protein in aqueous solution, Nucl. Instr. & Meth. A, A600, 272-274, (2009), 有

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 古坂道弘、JRR-3 における小型集束型中性子小角散乱装置（mfSANS）における技術開発、日本中性子科学会第 7 回年会、2007 年 11 月 27 日-28 日、九州大学、福岡市
- ② 佐々木 陽介、古坂道弘、JRR-3 に建設中の小型集束型中性子小角散乱装置（mfSANS）の性能評価、日本中性子科学会第 7 回年会、

2007年11月27日-28日、九州大学、福岡市

③ M. Furusaka, First results from a mini-focusing Small-Angle Neutron Scattering (mfSANS) Instrument, International Collaboration on Advanced Neutron Sources (ICANS-XVIII), 2007年4月25-29日, Dongguan Exhibition International Hotel, Dongguan, 中国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古坂 道弘 (MICHHIRO FURUSAKA)

北海道大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：60156966

内藤 幸雄 (SACHIO NAITO)

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・特任教授

研究者番号：20312233

(研究代表者：2006-2007)

(2) 研究分担者

杉山 正明 (MASAAKI SUGIYAMA)

京都大学・原子炉実験所・准教授

研究者番号：10253395

望月 秀樹 (HIDEKI MOCHIDUKI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90230044

藤田 文行 (FUMIYUKI FUJITA)

北海道大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：10002312

本間 彰 (AKIRA HOMMA)

北海道大学・大学院工学研究科・技術専門員

研究者番号：80374594

(3) 連携研究者

和田 圭司 (KELJI WADA)

国立精神神経センター・神経研究所・部長

研究者番号：70250222

(研究分担者：2006-2007)