

令和元年9月30日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02040

研究課題名(和文) 実験室における天然変性タンパク質のX線1分子動態計測装置開発

研究課題名(英文) Development of X-ray single molecular instrumentation of intrinsically disordered protein in laboratory

研究代表者

佐々木 裕次 (SASAKI, YUJI)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：30344401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,500,000円

研究成果の概要(和文)：X線1分子追跡法Diffracted X-ray Tracking (DXT)は、目的のタンパク質をナノ結晶で標識し、ナノ結晶からのX線回折スポットの角度変化を観測することでマイクロ秒の高時間分解能、ナノメートルの高空間分解能で1分子の内部運動を捉えることができる。この先端的オリジナル計測法を、このDXTを単色X線を用いた回折強度の自己相関や強度揺らぎを測定することで回折スポットの運動速度を評価できることを実験室X線光源の利用において確認した。この単色X線を使用した回折1分子計測法では、回折X線強度の明確な点滅(X線ブリンキング)を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会問題となっている認知症に関連する注目タンパク質1分子の動態挙動の極めて微妙な変化を早期診断システムとして、実験室レベルの施設を用いて評価することのできる診断技術の基盤構築に成功したことは極めてその意義は大きいと考えている。社会実装に向けて、すでに数社から装置市販化のお誘いを受けている。しっかり、進めていきたい。

研究成果の概要(英文)：Diffracted X-ray Tracking (DXT) is a method of labeling a protein of interest with nanocrystals and observing the angular change of the X-ray diffraction spot (Laue method) from nanocrystals, microsecond high time-resolution, high spatial resolution of nanometer can capture the internal motions of single protein molecule. As a result of this research on this advanced original measurement method, we can evaluate the movement speed of the diffraction spot by measuring the autocorrelation and the intensity fluctuation of the diffraction intensity using monochromatic X-ray as this research result as a laboratory X-ray source. In this diffractive single molecule measurement method using monochromatic X-rays, we have found a clear blinking (X-ray blinking) of diffracted X-ray intensity.

研究分野：X線1分子計測

キーワード：X線 放射光 1分子 分子動態 天然変性タンパク質 時分割計測技術 自己相関 ブリンキング現象

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の原因分子と言われていたタウタンパク質分子やパーキンソン病の主原因である α シヌクレインの構造動態特性を、大型放射光源を用いたX線1分子追跡法で1分子計測した結果、特異的な分子構造動態の確認に成功しました。疾病で注目されている多くの天然変性タンパク質分子 (Intrinsically Disordered Protein: IDP) を対象にできる実験室レベルの1分子計測を実現し、より臨床的超高感度1分子評価装置に近づけることのできる1分子評価技術の必要性が議論され始めました。

2. 研究の目的

特異的分子内部運動が極めて遅い天然変性タンパク質分子 IDP の高精度1分子計測に適した秒レベル時分割性ピコメートル微小構造変化検出可能なX線1分子評価装置を実験室X線光源によって、従来の大型放射光施設がなくてもデータがとれるような装置を実現しコンパクト化を促進します。

3. 研究の方法

計測原理であるX線1分子追跡法 Diffracted X-ray Tracking DXT は、今まで得大型放射光施設が必要であったが、実験室光源を用いて分子内部運動を検出できるように改良する。原理的な部分から見直す必要がある。

4. 研究成果

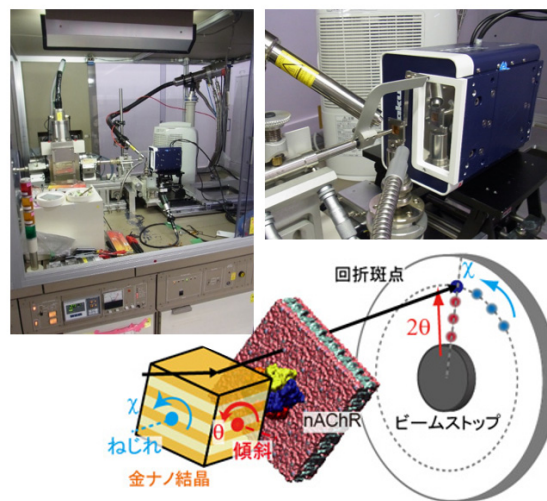
4.1 X線ブリッキング現象の確認

X線1分子追跡法 DXT は、目的のタンパク質をナノ結晶で標識し、ナノ結晶からのX線回折スポット (ラウエ法) の角度変化を観測することで、マイクロ秒の高時間分解能、ナノメートルの高空間分解能でタンパク質1分子の内部運動を捉えることができる。この先端的オリジナル計測法を、本研究成果として、この DXT のラボ化を目的に、単色X線を用いた回折強度の自己相関や強度揺らぎを測定することで回折スポットの運動速度を評価できることを実験室X線光源の利用において確認した。この単色X線を使用した回折1分子計測法では、回折X線強度の明確な点滅 (X線ブリッキング) を発見した。タンパク質1分子の観察は驚異的な発展を遂げており、生体内における分子ダイナミクスを高速・高精度性に観察することが可能となってきた。

量子プローブ唯一の1分子動態情報を取得できる DXT は、佐々木らによって1998年に考案され、今日まで困難と言われてきた巨大

分子に対しても分子動態を明確化してきた。DXT は目的のタンパク質をナノ結晶で標識し、ナノ結晶からのX線回折スポット (ラウエ法) の角度変化を観測し、マイクロ秒の高時間分解能でかつナノメートルの高空間分解能で1分子の内部運動計測を実現した。分子動態計測は色々な系で実現しており、DNA や膜タンパク質分子 (bR, KcsA, nAChR, α 7AChR, AChBP, GLIC) の分子内部運動の1分子計測に成功してきた。しかし、現在まで DXT 法はそれほど普及していない。普及しない1つの理由に、白色X線を用いた計測であることが挙げられる。通常の放射光施設は9割以上のユーザーが単色X線を利用するので、近年では、ビームライン設計段階で白色X線の利用は検討されることは少なくなってきた (最近は徐々に白色X線が見直されてきた)。そこで我々は、DXT を改良して多くのユーザーに使われることを目的に、単色X線を用いた回折強度の自己相関を測定することで回折スポットの運動特性評価の可能性を提案し、実験的に確認することに成功した。この単色X線を使用した回折1分子計測法では、回折X線強度の明確な点滅 (Diffracted X-ray Blinking X-ray: 回折X線ブリッキング) を検出することができた。

我々は、このX線ブリッキングから生体内の局所的な環境に依存した単一分子動態を評価した。X線ブリッキングにおける回折スポットの自己相関は1分子の運動速度と高い相関を示し、また時間情報を含まない回折スポットの強度揺らぎからも1分子の運動速度を評価できることがわかった。さらに、相互相関解析を行なうことで、回折スポットの運動方向の情報を得ることができると示した。これらの実験は SPring-8 BL40XU 放射光施設での実現だけでなく、実験室X線光源 (Rigaku FR-D) を利用して行われ100ミリ秒の時分割性で実測することに成功した。

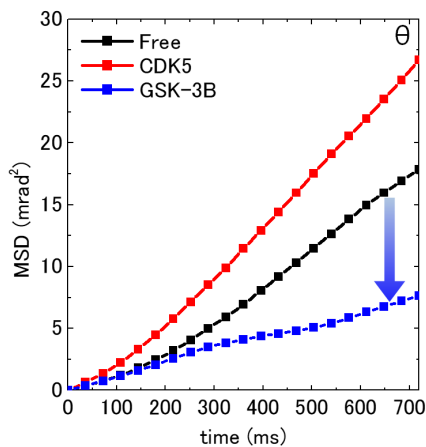


図：実験室X線光源 FR-D の写真と DXT の原理図

4.2 タウ分子を用いた動態評価と実験室光源の利用

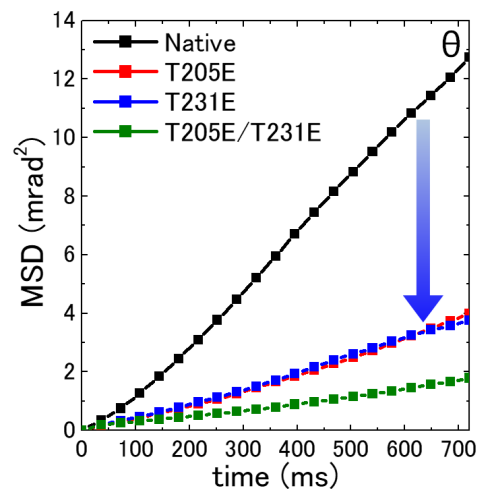
実験は、タウタンパク質 1 分子の動態挙動計測を確立するためにリン酸化反応時の動態計測を行った。リン酸化反応は、ヒトの神経細胞中でタウタンパク質をリン酸化している cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) と glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) を用いてタウタンパク質をリン酸化して測定した。タウタンパク質のアミノ酸配列にはセリン (Ser) とスレオニン (Thr) というリン酸化を受けるサイト (リン酸化サイト) が複数存在しており、CDK5 と GSK-3 β はそれぞれリン酸化をするサイトが異なる。試料となるタウタンパク質は同志社大学生命医科学部の宮坂助教から提供いただいた。最初は、X線 1 分子追跡法で高輝度 X 線を用い、全ての実験は大強度の準白色光の利用が可能である SPring-8 BL40XU 及び KEK PF-AR NW14A にて行い、このサンプル系を実験室 X 線光源で確認した。

X 線 1 分子追跡法では、水溶液中におけるタンパク質のブラウン運動を観測しているため、統計処理指標として平均二乗変位 (Mean Square Displacement : MSD) を用いた。MSD はある決まった時間幅の中での運動の始点と終点の距離の二乗の総和を表す。タウタンパク質をリン酸化酵素 CDK5 でリン酸化した条件 (CDK5) 及び GSK-3 β でリン酸化した条件 (GSK-3 β) について測定を行ったところ、CDK5 を用いてリン酸化された場合には分子内運動がより大きくなることが分かった (下図)。一般にリン酸化によってタンパク質分子には負電荷が 2 価付加されて親水性が増すため、水溶液中でより安定になって大きく揺らいだと考えられる。一方、GSK-3 β を用いてリン酸化された場合に MSD の値が減少したことから、分子内運動が低下するという特異的な結果が得られた。



図：タウタンパク質のリン酸化酵素による分子動態の変化

続いて、タウタンパク質分子中で GSK-3 β によるリン酸化によって分子内運動に影響を与えるリン酸化サイトを特定するために、Thr181・Ser199・Ser202・Thr205・Thr231・Thr235 の各リン酸化サイトを、リン酸化の影響を受けないアラニン (Ala) に置換した変異体に対して、それぞれ GSK-3 β を用いてリン酸化した。その結果、Thr205 と Thr231 をアラニンに置換した変異体 (T205A 及び T231A)、天然状態に比べて分子内運動は変わらないか、むしろ運動が大きくなる結果となった。1 次元ヒストグラムの解析結果からも、天然状態 (Native) では低移動度側のピーク面積が GSK-3 β でのリン酸化に伴って増加しているのに対して、T205A と T231A では低移動度側ピーク面積が変化しないまたは減少していたことより、測定しているタウタンパク質分子全体の分布として運動が低下していないことがわかった。また、SDS-PAGE を用いて CDK5 と GSK-3 β でリン酸化されているサイトを確認したところ、Thr205 と Thr231 は、CDK5 ではリン酸化されず GSK-3 β によってリン酸化されるサイトであることが分かった。これらの結果から、Thr205 及び Thr231 がリン酸化されることでタウタンパク質の分子内運動が低下することが示唆された。



図：タウタンパク質の変異体を用いた分子動態の変化

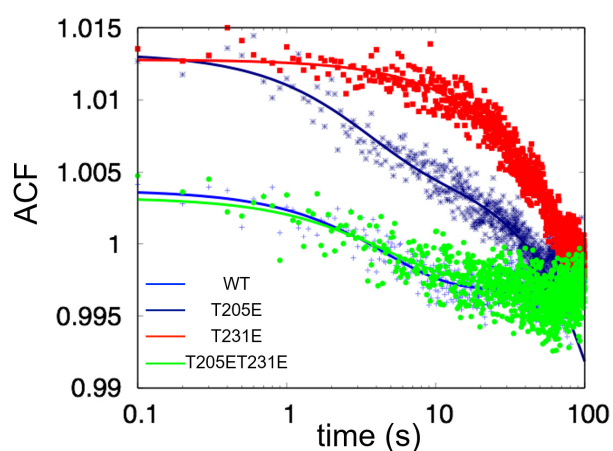
以上の実験のようにリン酸化酵素を用いたリン酸化は非常に複雑で、全てのタンパク質分子の特定のリン酸化サイトが 100%リン酸化されるということはないため、Thr205 と Thr231 をグルタミン酸で置換して疑似的にリン酸化を行った変異体 (T205E, T231E) についても X 線 1 分子追跡法で測定を行った。その結果、T205E と T231E のいずれもが天然状態 (Native) に比べて分子内運動が低下していることが分かった。

これらの結果より、リン酸化されることで

分子内運動が低下につながるサイトは Thr205 と Thr231 であると特定できた。

X 線 1 分子追跡法を用いて、CDK5 と GSK-3 β という 2 つのリン酸化酵素を用いて タウタンパク質分子をリン酸化した際に生じる分子内運動変化を計測した。その結果、GSK-3 β を用いてリン酸化した場合には分子内運動が低下することがわかった。また、タウタンパク質分子中に複数あるリン酸化サイトの中で、Thr205 と Thr231 がリン酸化されることで分子内運動の低下につながるということ特定した。

同様のサンプル系を代表例として、実験室 X 線光源を用いて、DXB にて測定した結果が下図である。放射光実験と完全に一致した結果が得られた。



図：タウタンパク質のリン酸化酵素による分子動態の変化

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 14 件)

(1) H. Sekiguchi, M. Kuramochi, K. Ikezaki, Y. Okamura, K. Yoshimura, K. Matsubara, JW. Chang, N. Ohta, T. Kubo, K. Mio, Y. Suzuki, L. Chavas, Yuji C. Sasaki, Diffracted X-ray Blinking Tracks Single Protein Motions, Scientific Reports (Nature Publishing Group) 8:17090 (2018). 査読あり

(2) Daiki Usui, Satomi Inaba, Hiroshi Sekiguchi, Yuji Sasaki, Toshiki Tanaka, Masayuki Oda “First observation of metal ion-induced structural fluctuations of α -helical peptides by using diffracted X-ray tracking”, Biophysical Chemistry 228, 81

(2017). 査読あり

(3) Y. Y. Yamamoto, Y. Uno, E. Esha, K. Ikegami, N. Ishii, N. Dohmae, H. Sekiguchi, Y.C.Sasaki, M. Yohda, “Asymmetry in the function and dynamics of the cytosolic group II chaperonin CCT/TRiC”, PLoS One 2, e0176054 (2017). 査読あり

(4) Y. Matsushita, H. Sekiguchi, JW. Chang, M. Nishijima, K. Ikezaki, D. Hamada, Y. Goto, Y.C.Sasaki, Nanoscale Dynamics of Protein Assembly Networks in Supersaturated Solutions, Scientific Reports (Nature Publishing Group) 7, 13883 1-8, (2017). This paper is Collection Top 100 in Chemistry in Scientific reports (26 位) 査読あり

(5) 松下裕福、関口博史、太田昇、一柳光平、池崎圭吾、後藤佑児、佐々木裕次、”マイクロ秒過飽和状態のダイナミクス観察”、日本結晶成長学会誌 44(1), 31-37 (2017). 査読あり

(6) Y. Yamamoto, K. Tsuchida, K. Noguchi, N. Ogawa, H. Sekiguchi, Y.C.Sasaki, M. Yohda; Characterization of group II chaperonins from an acidothermophilic archaeon *Picrophilus torridus*, FEBS OPEN BIO, 6(7), 751-764 (2016). 査読あり

(7) Y. Sato, Y. Tanaka, S. Inaba, H. Sekiguchi, T. Maruno, Y.C.Sasaki, H. Fukada, Y. Kobayashi, T. Azuma, M. Oda; Structural dynamics of a single-chain Fv antibody against (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl, INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACRO MOLECULES, 91, 151-157 (2016). 査読あり

(8) Y. Matsushita, H. Sekiguchi, N. Ohta, K. Ichianagi, K. Ikezaki, Y. Goto, Y.C.Sasaki, “Time-resolved X-ray Tracking of Expansion and Compression Dynamics in Supersaturating Ion-Networks”, Sci. Rep., 5, 17647-(1-8), (2015). 査読あり

(9) K. Ichianagi, H. Sekiguchi, T. Sato, S. Nozawa, A. Tomita, M. Hoshino, S. Adachi, Y.C.Sasaki, “Cooling dynamics of self-assembled monolayer coating for integrated gold nanocrystals on a glass substrate”, J. Synchrotron Rad., 22, 29-33, (2015). 査読あり

(10) H. Kozono, Y. Matsushita, N. Ogawa, Y. Kozono, T. Miyabe, H. Sekiguchi, K.

Ichiyanagi, N. Okimoto M. Taiji, O. Kanagawa, Y.C.Sasaki, "Single Molecular Motions of MHC Class II Rely on Bound Peptides", *Biophys. J.*, 108, 350-359, (2015). 査読あり

(11) 松下裕福、関口博史、一柳光平、池崎圭吾、後藤佑児、佐々木裕次、"酢酸ナトリウム過飽和溶液中における金ナノ結晶の分散状態とその高精度1分子回転動態観察"、*表面科学* 36:539 (2015). 査読あり

(12) 関口博史、一柳光平、八木直人、佐々木裕次、放射光 X 線をプローブとする多量体タンパク質の機能的分子内運動・1分子解析"、*生物物理* 55:192 (2015). 査読あり

(13) 松下裕福、関口博史、一柳光平、池崎圭吾、後藤佑児、佐々木裕次、"酢酸ナトリウム過飽和溶液中における金ナノ結晶の分散状態とその高精度1分子回転動態観察"、*表面科学*, 36, 539-542, (2015). 査読あり

(14) 関口博史、一柳光平、八木直人、佐々木裕次、"放射光 X 線をプローブとする多量体タンパク質の機能的分子内運動・1分子解析" *生物物理*, 55, 192-195, (2015). 査読あり

〔学会発表〕 (計 12 件)

(1) Mio, Kazuhiro; Kuramochi, Masahiro; Matsubara, Ken, Sasaki, Y. C., Rotational Brownian Motion of TRPV1 Channel Observed by Synchrotron Diffracted X-Ray Tracking and Laboratory X-Ray Blinking Analysis, Conference: 62nd Annual Meeting of the Biophysical-Society Location: San Francisco, CA Date: FEB 17-21, 2018

(2) Sasaki, Yuji C., Kuramochi, M.; Sekiguchi, H., Novel in Vivo Observations of Single Protein Motions Using Laboratory X-Ray Source, Conference: 62nd Annual Meeting of the Biophysical-Society Location: San Francisco, CA Date: FEB 17-21, 2018

(3) Sekiguchi, Hiroshi, Aoyama, Koki, Sasaki, Yuji C., Development of Advanced Diffracted X-Ray Tracking for Single Molecule Intra-Dynamics with Low Dose and Wide Angular Dynamic Range, Conference: 62nd Annual Meeting of the Biophysical-Society Location: San Francisco, CA Date: FEB 17-21, 2018

(4) Chang, Jaewon, Kuramochi Masahiro, Beak, Youngsuk, Sasaki, Y. C., In Vivo X-Ray Monitoring of Dynamics between Interleukin 2 and Interleukin 15 on NK Cells, Conference: 62nd Annual Meeting of the Biophysical-Society Location: San Francisco, CA Date: FEB 17-21, 2018

(5) Chang, J-W., Baek, Y. S., Mio, K., Sasaki Y. C., X-ray single molecule dynamics of interleukins bonded receptors on live NK cells membranes, Conference: 19th IUPAB Congress / 11th EBSA Congress Location: British Biophys Soc, Edinburgh, SCOTLAND Date: JUL 16-20, 2017

(6) Kubo, T., Baba, T., Ohashi, S., Sasaki Y.C., PAMs modulate molecular dynamics of nAChR alpha 7: direct observation by DXT and electrophysiology, Conference: 19th IUPAB Congress / 11th EBSA Congress Location: British Biophys Soc, Edinburgh, SCOTLAND Date: JUL 16-20, 2017

(7) Mio, K., Ikezaki, K., Sekiguchi, H., Sasaki, Y.C., Asymmetric rotational brownian motion on TRPV1 cation channel with X-ray single molecule technique, Conference: 19th IUPAB Congress / 11th EBSA Congress Location: British Biophys Soc, Edinburgh, SCOTLAND Date: JUL 16-20, 2017

(8) Sasaki, Y. C., Ikezaki, K.; Mio, K., New X-ray single molecular observations from super-Poisson distribution using laboratory X-rays, Conference: 19th IUPAB Congress / 11th EBSA Congress Location: British Biophys Soc, Edinburgh, SCOTLAND Date: JUL 16-20, 2017

(9) Matsushita Yufuku; Sekiguchi Hiroshi, Ohta Noboru, Sasaki, Y. C., X-ray Observation of Novel Nucleation Factor in Protein Supersaturated Solution, Conference: 60th Annual Meeting of the Biophysical-Society Location: Los Angeles, CA Date: FEB 27-MAR 02, 2016.

(10) Kubo Tai, Baba Tomoyuki, Ikezaki Keigo, Sasaki YC. et al., Realtime Single Molecular Motion Analysis of Nicotinic Acetylcholine Receptor Alpha 7 by Diffracted X-Ray Tracking Method, Conference: 60th Annual Meeting of the Biophysical-Society Location: Los Angeles, CA Date: FEB 27-MAR 02, 2016.

(11) Hara, Naruki; Matsushita, Yufuku; Ikezaki, Keigo, Sasaki Y.C. et al., X-Ray Digital Aggregated Dynamics of Intrinsically Disordered Protein, Conference: 60th Annual Meeting of the Biophysical-Society Location: Los Angeles, CA Date: FEB 27-MAR 02, 2016

(12) Sasaki, Y. C., Shimura M., Hara N. et al., Structural flexibility of Tau protein and alpha-synuclein from X-ray single molecule observations, Conference: 10th European-Biophysical-Societies-Association (EBSA) European Biophysics Congress Location: Dresden, GERMANY Date: JUL 18-22, 2015.

〔図書〕 (計 2 件)

1. H. Daimon, Y.C.Sasaki, Introduction of 3D Active-site Material Sciences, World Scientific Publishing Co Ltd., <https://doi.org/10.1142/11083> | December 2018.

2. 大門寛・佐々木裕次 監修「機能構造科学入門」2016.11 (丸善)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：運動計測装置

発明者：佐々木裕次、池崎圭吾

権利者：佐々木裕次

種類：特許

番号：特願 2016-226495 (整理番号 16-116-ZZ)

出願年月日：2017 年 11 月 22 日

審査請求期限日：2019 年 11 月 22 日

(審査請求予定あり)

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://sasakilab.k.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 佐々木 裕次

(SASAKI, Yuji, C.)

(東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授) 研究者番号：30344401