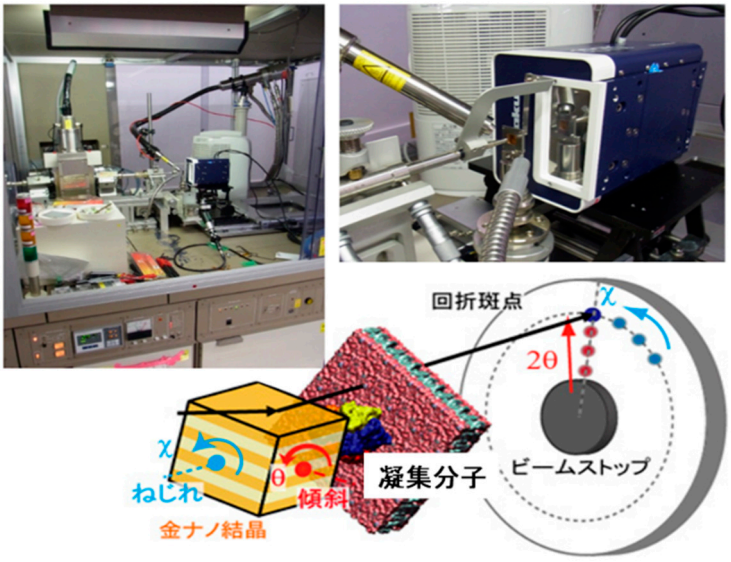
79　X線1分子動画からの蛋白質凝集疾患早期診断技術開発	佐々木　裕次

【目的】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 X 線 1 分子計測を実現し、より臨床的高感度 1 分子評価装置に近づけることのできる 1 分子評価技術の確立を目指した。そして、時分割性ピコメートル微小構造変化検出できるX線 1 分子評価装置を実験室X線光源によって高精度のデータがとれることを実現した。

【方法】計測原理であるX線 1 分子追跡法 Diffracted X-ray Tracking：DXT は、今までは、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した。回折 X 線の明滅現象を発見・利用することで、実験室光源を用いて高感度に分子動態検出を行った。また、得られたビックデータを効率的に処理できるシステムも確立させることができた。

【結果】タウタンパク質分子の動態 1 次元ヒストグラムやボックスプロットの結果から、天然状態 WT よりも疑似リン酸化した Thr205 と Thr231 の両方を変異導入した分子の硬化が一番激しかった。これは放射光施設を使った実験結果と矛盾しない結果であった。今回表記したデータは 100 ミリ秒の時分割計測の結果だけであるが、他の時間軸のデータも測定した。その結果、今回明確化した 100 ミリ秒の動態変化の差異は、500 ミリ秒や 1 秒時分割では確認出来なかったことより、かなり時間依存性がある動態変化であることが明確化された。

実験室 X 線 1 分子追跡法の外観図



79. X 線 1 分子動画からの蛋白質凝集疾患早期診断技術開発

佐々木　裕次

東京大学 大学院新領域創成科学研究科 物質系専攻

Key words：X 線 1 分子追跡法，分子内部動態，タンパク質分子，凝集化，天然変性タンパク質分子

緒　言

神経変性疾患の克服を目指す脳科学研究が進んでいる。特に、アルツハイマー病等のタンパク質分子の凝集による発症は、今後、日本が最大の課題とする高齢化社会の象徴的疾患である。遺伝的疾患と違いタンパク質分子の微妙な分子構造的変異がその発病のきかっけとなると考えられている。しかし、現状では、構造変性の結果としての凝集体形成を長時間待たなければ、その発病及び創薬効果をモニターすることは難しい。そのような状況でも、抗アルツハイマー薬の開発が進められており、期待の大きいタウ凝集阻害剤も登場しているが、新規薬剤の有効性指標を示すバイオマーカーの探索が多くの開発ステップにおいて切望されていても実現は遠い状況である。新薬の効果を短時間でモニターするために、色々な計測法も検討され始めた。短期間の治験において新薬の有効性を示唆する、極めて微妙な分子内部構造的変化を高感度に検出する迅速マーカー開発は成功していないし、その探索手法もないのが現状である。

アルツハイマー病の原因分子と言われている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た。本研究では、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 分子評価技術の確立を目指した。そして、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線光源によって高精度のデータがとれる装置として実現することに成功した。

本装置開発では、わずかな分子内運動変化をモニターすることで、上記の目的を短時間測定で達成できる。原理的には X 線 1 分子追跡法（DXT 法、図 1）[1〜3] を用いる。最近、この DXT 計測をルーチン的利用のできる実験室ラボサイズのコンパクト化に成功した。10〜100 ミリ秒露光で 10〜100 秒間測定し、トータル 10,000 枚以上のX線動画というビック画像データから、標識された金ナノ結晶（結晶サイズ 20〜40 nm）の動態挙動を自動解析できるソフト開発と、得られた分子動態挙動の分子動力学（Molecular Dynamics）解析からの分子動態予測とを照らし合わせながら、新薬の動態効果やその制御を可能にする分子設計戦略が現実に近づいた。本研究は生体医工学、生体情報学、そして生体材料学への貢献が期待される。

わずかな構造変異がある凝集前駆体の存在を 1 分子レベルでモニターできる DXT 実験室装置を用いて、得られた大量X線動画から分子動態を高感度に 1 分子自動解析できるソフト開発を実現し、創薬の加速化と病気の早期発見へ貢献することを開発の目的としている。サンプル対象は、タウ、αシヌクレイン、Aβ等の天然変性タンパク質分子（Intrinsically Disordered Protein：IDP）である。また、神経変性疾患で注目分子だけではなく、分子動態変化が疾患発症プロセスで重大なモニタリングに役立つと期待されている RNA 顆粒、各種エクソソームも対象に検討できると考えている。

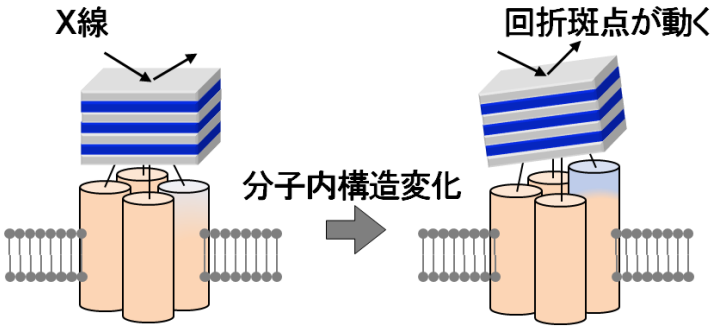


図 1. DXT 原理図

図では生体膜上の膜タンパク質分子をターゲットとしている。ターゲット分子のモノマーとダイマーの区別も運動を通して明確に区別できることはすでに実証されている。この方法を天然変性タンパク質分子に適応することが可能となった。

方　法

計測原理である X 線 1 分子追跡法 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した。得られたビックデータを GPGPU ラックマウントサーバー（HPC5000-XBWGPU3R1S、NVIDIA® Tesla® V100 16 GB 搭載モデル）を用いて GPU 演算資源を汎用計算に適応し、さらに CUDA 環境構築することで並列処理による大量データの一括処理を実行した。尚、Tesla V100 は、CPU 100 個分の性能に匹敵する。この処理法によって、膨大な本画像計測データ（1 サンプルあたり約 1,500×2,000 次元データ）を迅速処理することができた。

結果および考察

1.　X線ブリンキング現象の確認

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 線ブリンキング）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、α7AChR、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。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：回折 X 線ブリンキング）を検出することができた（図 2）。

我々は、このX線ブリン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線ブリン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、回転スポットの運動方向の情報を得ることができることを示した。これらの実験は SPring-8 BL40XU 放射光施設での実現だけではなく、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。

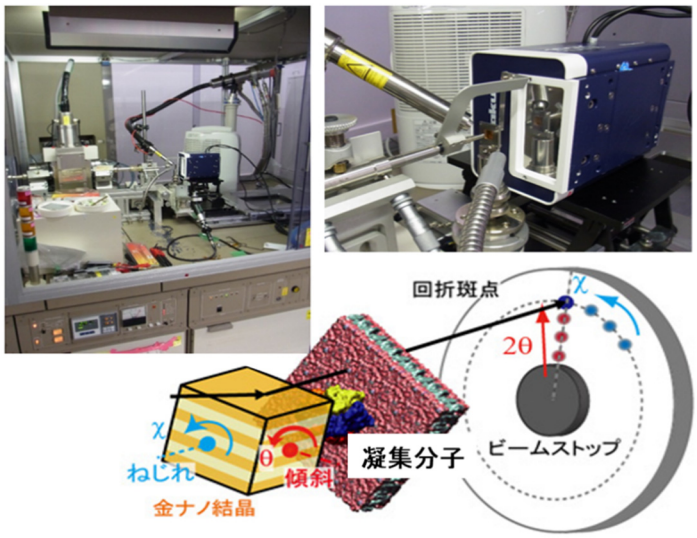


図 2. 実験室光源（Rigaku FR_D）を用いたX線 1 分子動態計測装置外観（左図）、検出器（右図）、下図はサンプル配置図
標識された金ナノ結晶からの回折斑点を時分割する。基本、θ方向とχ方向のX線回折強度の時分割計測を行うが、回折X線ブリンキング現象を用いる場合は、主にθ方向のX線回折強度の時分割計測を行う。

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 1 分子動態変化計測を行った。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 glycogen synthase kinase 3β（GSK-3β）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、GSK-3βはリン酸化をするサイトが複数箇所ある。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った。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量を表す。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-3βでリン酸化した条件　　（GSK-3β）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。X 線 1 分子追跡法では、水溶液中におけるタンパク質のタウ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-3β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。

以上の結果を踏まえ、タウタンパク質分子中で GSK-3β 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-3βを用いてリン酸化した。その各サンプルを実験室X線光源（Riguku FR-D、50 kV、60 mA）を用いて、DXB 測定を 100 ミリ秒の時分割性を維持して、X 線 2 次元検出器ピラタスを持ちいて測定した。その結果を図 3 に示す。DXB のデータ解析は、現在、何種類か開発しているが図のような自己相関関数で表記して、その減衰係数を比較するのが一番直感的な解析方法である。

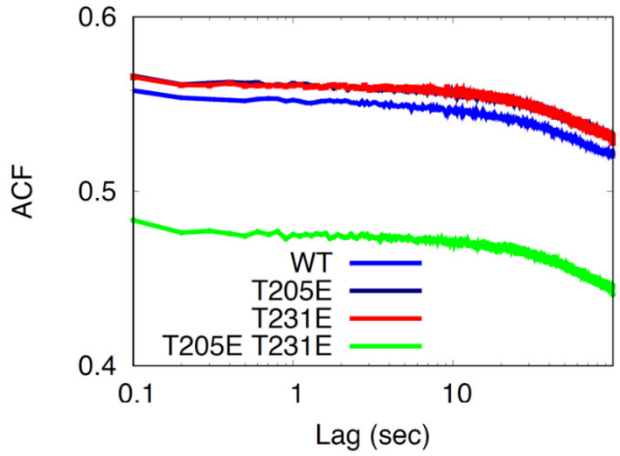


図 3. 4 つのタウタンパク質分子の 100 ミリ秒時分割 X 線動態計測からの自己相関曲線
T205E／T231E の緑線は、明らかに他の 2 つの変異体よりも曲線の減衰度合いが小さく運動性が低い。

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 WT 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。図 4 に示した 1 次元ヒストグラムやボックスプロットの解析結果からも、天然状態 WT よりも Thr205 と Thr231 の両方を変異した分子の硬化が一番激しかった。これは放射光施設を使った実験結果と矛盾しない結果を得ることができた。SDS-PAGE を用いて CDK5 と GSK-3β でリン酸化されているサイトを確かめたところ、Thr205 と Thr231 は、CDK5 ではリン酸化されず GSK-3β 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ということが示唆された。

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）について行い、その結果、T205E と T231E の両方を変異させると天然状態 WT 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。

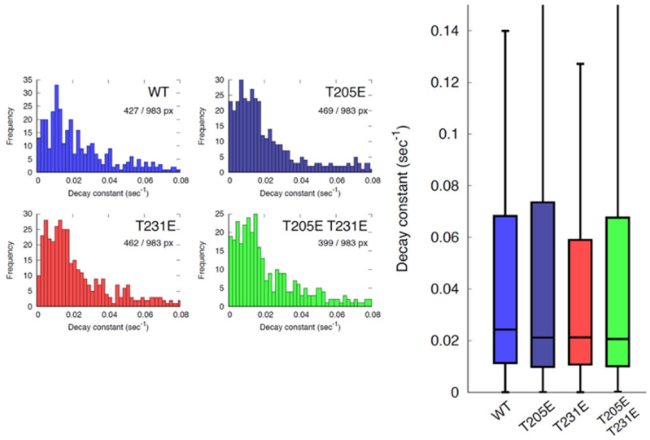


図 4. タウタンパク質変異体における動態計測結果
自己相関関数のフィッテングを無数回行うと減衰係数のガウシアン分布を導き出せる（左図）。
その結果のボックスプロット表記が右図である。2 つの疑似リン酸化部位を導入した T205E／T231E の結果は、分子内動態が最も硬化していることを示している。しかし、その運動幅が比較的広域に存在するのは非常に興味深い。

3. より一層のコンパクト化したX線動態計測装置を目指して

本実験により分子動態を 1 分子計測できる装置構成が、放射光施設を用いることなく、実験室 X 線光源を用いてもその差異を明確に得ることができた。今回表記したデータは 100 ミリ秒の時分割計測の結果だけであるが、他の時間軸のデータも測定した。その結果、今回明確化した 100 ミリ秒の動態変化は、500 ミリ秒や 1 秒時分割では確認出来なかったことより、かなり時間依存性がある動態変化であることが明確化した。これは、今までの大型放射光施設を用いた DXT では、X 線強度が 3 桁以上強いので、サンプルに対してのダメージ問題で、1 秒間隔の時分割測定は不可能であった。それが、実験室 DXB 法を用いると、長時間測定が可能になったことは非常に重要な進展であったことがわかった。

分子動態の計測技術を他の計測法で探してみると、X 線小角散乱、蛍光相関分光法、原子間顕微鏡法や、蛍光標識 1 分子 FRET 法は、タンパク質 1 分子の微小な構造変異をモニターできる先端計測法であるが、DXT の感度に比べたら 1 桁以上悪く（ナノメーターの構造変化がないと検出できない）、細胞や組織での *in vivo* 計測は不可能で、ラボ DXT の競争相手は存在しない。マクロな測定例としては、光感受性系を用いた分光方法も対象になるがサンプル系が極めて限定されてしまう。また、陽電子放射断層撮影 Positron Emission Tomography によって、タウタンパク質の凝集状態をモニターする研究も精力的に研究されているが、感度的に 1 分子レベルではないので、ラボ DXT の方が優れている。ただ、臓器の深い部分を *in vivo* 計測できるとい意味では PET 計測には及ばないが、X 線が減衰しない深さ程度であれば計測は可能である。実用的なラボ DXT の *in vivo* 計測としては、細胞を採取（侵襲）してナノ結晶を標識して計測できる。ターゲットタンパク質分子を全く精製しないで計測ができる点や、タウタンパク質分子の変性プロセスを研究する場合は効力が極めて高い。現状の問題点は、「分子内部運動」と「タンパク質分子機能発現」の関係が、定量的に議論されてまだ歴史が浅いという点である。タンパク質凝集性の疾患メカニズム研究に DXT/DXB が極めて有効であることは、本研究で初めて世界に示すことができるだろう。放射光施設を用いた DXT 測定研究は、1998 年に、代表者の佐々木裕次がスタートして以来、海外では、APS（The Advanced Photon Source at Argonne National Laboratory）や ESRF（European Synchrotron Radiation Facility）等で DXT 研究の普及活動を行ってきた。X 線を用いた唯一の 1 分子計測法としての評価は、日に日に高まっている。X 線自由電子レーザーXFEL で同様の試みがなされようとして未だに成功に至っていない。本装置開発によって、ルーチン化して分子動態基本情報が蓄積し、より高度な利用法も検討できる。また、「京」に代表されるスーパーコンピュータを利用した分子運動の計算においても、実験データを出せる DXT・DXB 法は、今後非常に注目されて行くことに違いない。世界中の大型施設とラボ施設両方で、未知なる 3 次元分子動態 1 分子情報が取得できる DXT を普及させたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院新領域創成科学研究科物質系専攻多次元計測科学研究室の助教である倉持氏である。

文　献

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 8, 17090 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-35468-3

2） H. Sekiguchi, Yuji C. Sasaki, Dynamic 3D visualization of active protein's motion using diffracted X-ray tracking, JAPANESE JOURNAL OF APPLIED PHYSICS, 58 (12), 120501 (2019). DOI: 10.7567/1347-4065/ab56fd

3） A. Sato-Tomita, H. Sekiguchi, Yuji C. Sasaki, Progression of 3D Protein Structure and Dynamics Measurements, JOURNAL OF THE PHYSICAL SOCIETY OF JAPAN, 87(6), 061015 (2018). DOI: 10.7566/JPSJ.87.061015