

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」

平成 18 年度採択研究代表者

佐々木 裕次

((財)高輝度光科学研究センター 主幹研究員)

「高精度 1 分子内動画計測から見える生体分子構造認識プロセス」

## 1. 研究実施の概要

生体高分子が機能発現に伴い分子内部で構造変化する様子や分子間相互作用によって新たな動的構造特性に変化する様子を原子レベル以下の精度で高速1分子動態計測する技術は、従来の間接的な作動原理解明の限界を打開する唯一の方法であり究極的計測手法と言える。本研究ではÅ以下の位置決定精度を有するX線1分子追跡法をマイクロ秒レベルへ高速化し、ラベル結晶を直径 10nm に微小化し、極めて微細な分子認識の差がその後の生命反応系の鍵を握るとされる免疫系や生体膜系の高速1分子ダイナミクス計測を行う。細胞内の 1 分子挙動が最終的にマクロな生命現象にどのように関与していくか、計測ターゲットを絞って研究を行う。また1分子内構造変化を高精度で検出できるラボサイズの電子線1分子追跡装置も開発する。電子線ナノサイズプローブを用いたウェットセル観察用走査電子顕微鏡を使用し、小型1分子内動的挙動計測装置を実現する。放射光と電子線を用いた計測系の対比実験から、高エネルギープローブによる生物系へのダメージ低減策を体系的に進め、超短波長ビーム系を用いた高精度1分子計測技術の可能性を示し本方法論の普及に努める。

## 2. 研究実施内容

H18 年度において進展のあった研究内容について研究グループ毎に報告する。

### A. 佐々木グループ

高速X線1分子追跡法の主要技術であるナノ結晶の作製技術に進展があった。ナノ結晶の粒径分布は、サンプル位置と蒸着源位置との距離に関係していると言われている。そこで使用している真空装置に工夫を凝らして、現状の最短距離 10cm という距離を 7-10cm と短くするを行い、それぞれの距離におけるナノ結晶評価を行った。その結果、単純に距離を短くすれば良質なナノ結晶が作製できるわけではないことが判明した。例えば、最短距離である7cmにおいては、各スポットの強度は比較的良質になるが、作製されたナノ結晶の大きさの分布幅が広がってしまい、目標である均一完全ナノ結晶作製は困難であることが判明した。いずれにせよ、上記距離がナノ結晶の質と分布幅を制御していることが分かり、現状よりも良いナノ結晶の作製の可能性ができたことになる。サンプル系としては、光合成系で有名で最近構造が決定された PSII を本格的にX線1分子追

跡法に適応し、光励起による運動計測を試み始めた。PSII のもう一つの特徴は、PSII が存在する生体膜であるチラコイド膜(最少膜半径約2ミクロン)をサンプルとして利用できる点にある。より *in vivo* に近い環境での1分子計測や、1分子1分子間の1分子相互作用計測も試みる予定で、話題の多いサンプル系と言える。年度内測定において予想していなかった運動も見え始めた。また計測周辺技術としては、今までX線1分子追跡法最大の欠点であった追跡データの解析に時間を要するという点の克服を目標にした自動解析ソフトの開発を行った。まだ完成していないが H19 年前半には完成し利用研究者に配付したいと考えている。

#### B. 石川グループ

本開発では直径 20nm 程度の金ナノ結晶のビデオレイトの EBSP(Electron BackScatter diffraction Pattern)動画計測を高感度高精度化することを研究目標としている。具体的にはウエットセル観察用走査電子顕微鏡(SEM, 空間分解能5nm、電子線プローブ径2nm)のEBSPを基本構成として、目的生体分子の分子内動的挙動計測にナノ結晶標識法を用いて、分子内変位決定精度Åレベル以下の究極的な動的1分子挙動解析装置を実現する。今期は本研究施設として日本電子製走査型電子顕微鏡(JSM-7000F)が設置され、同じ施設内にナノ結晶の結晶性を向上させる高圧アニーリング炉も設置完了し、効率の良い実験設備の設置が完了した。長年の主張が認められ、まさに本格的実験が開始されようとしている。短期間のうちに原理的実験をまとめ外部発表を行う予定である。

#### C. 金川グループ

免疫学の分野においてのみならず分子生物学より明らかになった様々な面で、受容体を初めとするタンパク質間相互作用を介するシグナルの伝達において、わずかな分子認識の違いによる差により、その後の生命活動の応答に大きな違いを生じることがあると考えられている。しかし、従来の手法では、測定される物理学的な分子の相互作用と生物学的な反応の関連を説明できない例が見られる。それは、存在すると予想されているわずかな分子認識の違いまでを検出しきれていないためと考えられる。そこで実際にこのような例の一つをモデルにして従来の方法では解明されない生命現象の説明を試みている。

CD4<sup>+</sup> T 細胞は、抗原提示細胞がその細胞表面上に発現している抗原ペプチドと主要組織適合遺伝子複合体(MHC)のコンプレックスを特異的に認識することで活性化される。一般的には抗原ペプチドとMHCのアフィニティーの強弱に対応してT細胞の応答が決定されていると考えられている。これは、T細胞のレセプター分子であるTCRと、抗原ペプチドとMHCのコンプレックスの間にアフィニティーの差がほとんど見られないことより説明されている。ところが、HELタンパク質由来のペプチド48-61をB10.BRマウスに免疫すると反応性の異なる2種類のT細胞が得られた。一つは3A9T細胞ハイブリドーマに代表されるもので、細胞内及び細胞外で形成されたHEL由来ペプチド-MHCコンプレックスに反応する。このT細胞の抗原反応性は抗原ペプチドとMHCのアフィニティーに非常によく相関する。もう一つはHS1細胞に代表される者で、細胞外で形成されペプチド-MHCコンプレックスには反応するが、細胞内で形成されたコンプレックスには反応性を示さない。さらにHS1はMHCへのアフィニティーがHEL48-61ペプチドと比較して5倍低下する

HEL52-61 のペプチドに対して、3A9 より 100 倍強い反応を示すことがわかった。

我々は、この現象を説明するため弱いアフィニティーを持つペプチド-MHC は不安定なコンプレックスを形成して、様々な形をとりながら運動していて、ある形を取った時に HS1 のような T 細胞を活性化させていると考えた。逆に強いアフィニティーを持つペプチド-MHC は安定したコンプレックスを形成して、特に細胞内において DM 分子の存在下に形成されたコンプレックスの場合、HS1 のような T 細胞は活性化されないのだと考えた。そこでこの仮説を証明するために、コンプレックスの運動の差(特にペプチドのコンプレックス内での動きの差を)を DXT(X線1分子追跡)法により1分子レベルで計測し 3A9 と HS1 の反応性の差を解明しようと計画した。

現在までに、この仮説をより強く実証する準備として、さらに詳細な 3A9 と HS1 の反応性の違いについて変異を入れたペプチドを用いて調べた。まず、HEL48-61 ペプチドの 52 番目の D のアミノ酸を A に置換したペプチドを作成した。過去の実験から 52 番目の D が、抗原-MHC コンプレックスの形成に非常に重要であることがわかっている。この変異ペプチドの MHC に対するアフィニティーを測定すると HEL52-61 とほぼ同じで、HEL48-61 と比較してそれぞれ 4 倍から 5 倍低いことが分かった。またこの変異ペプチドを抗原としたとき、3A9 はアフィニティーに対応した反応性を示したが、HS1 はアフィニティーがほぼ同じであるはずの HEL52-61 と比較して大きく反応性が低下した。このことから、HS1 はただ単にアフィニティーの低い不安定なコンプレックスに対して強く反応するのではなく不安定な中にもある法則をもって運動しているコンプレックスに対して強く反応していると考えた。今後、アフィニティーの高い安定したコンプレックスだけでなく、アフィニティーの低い不安定なコンプレックス同士においても種類により分子運動に差異があり、それが分子認識に差をもたらしていることを一分子計測により証明する予定である。また、この研究を通じてタンパク質間相互作用を介するシグナルの伝達の解明に大きなブレイクスルーをもたらす事を期待する。

#### D. 小園グループ

組織適合性抗原(MHC)は細胞内の抗原を T 細胞受容体(TCR)に提示するという機能を持つ。TCR の認識とエフェクター機能の発現は獲得免疫における最重要反応である。故に免疫学に於いては TCR の反応機構の詳細な解析がさまざまな方向から進行中である。我々は TCR の動的構造解析が自己免疫疾患などの認識の破綻の解決に役立つと考えている。インスリン依存性糖尿病(IDDM)を引き起こす要因は、遺伝的に雑多であるが、MHC の関与が最も大きいと考えられている。人及びマウスにおいて IDDM の原因となる MHC 遺伝子座は同定されている。他の MHC と比べ、疾患感受性 MHC である I-Ag7/DQ8 では  $\beta$  鎖の 57 番目の残基が Asp 以外の Ser、Ala 等の中性残基に置換されている。この疾患と関連した MHCII 分子の X 線結晶解析がなされた結果、他の MHC 分子で顕著な  $\beta$  57- $\alpha$  76 間の水素結合が無く、そのため p9 ポケットの入り口がやや広がっていることや、p9 ポケットが塩基性であるということが解ったが、それ以外はペプチドの構造を含め、他の I-A 分子とほとんど変わっていなかった。一方、EAE や IDDM を引き起こす MHC/ペプチドは、単一のペプチドが、複数のランダムな取り合わせの V  $\alpha$  及び V  $\beta$  配列を持つ T 細胞クローンを活性化することが知られている。そこで、我々は MHC の中で一つのペプチドが自由に動き、いくつかの構造をとりうるのではないかという仮説を立てた。その仮説を証明するため 1 分子動画解析を中

心に解析した。今年度は、免疫系分子の測定が DXT で可能かどうか検定した。その結果、我々の期待した結果が出てきている。しかしながら、DXT 自体の信用性が未だ確立されたわけではなく、いくつかの手法により DXT で得られたデータが妥当かどうか検証する必要がある。現在 Biacore を用いた kinetics 解析により、DXT のデータをサポートしたものが出てくるか検証している。結果の最後に述べたがペプチド交換反応が、DXT で検証できる可能性が出てきた。次年度は、他の MHC タンパク質を含めた解析でより一般的な MHC の特徴が描写できるのではないかと考えている。

### 3. 研究実施体制

- (1)「佐々木」グループ((財)高輝度光科学研究センター利用研究促進部門構造物性 III)
  - ①研究分担グループ長：佐々木 裕次((財)高輝度光科学研究センター 主幹研究員)
  - ②研究項目
    - ・X線1分子追跡法の高速化と1分子計測周辺技術の開発
  
- (2)「石川」グループ(日本大学文理学部物理学科)
  - ①研究分担グループ長：石川 晃(日本大学文理学部 教授)
  - ②研究項目
    - ・電子線1分子追跡法の開発
  
- (3.1)「金川」グループ((独)理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター)
  - ①研究分担グループ長：金川 修身(理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター グループディレクター)
  - ②研究項目
    - ・免疫系1分子計測
  
- (3.2)「小園」グループ(東京理科大学 生命科学研究所)
  - ①研究分担グループ長：小園 晴生(東京理科大学生命科学研究所 助教授)
  - ②研究項目
    - ・免疫系分子認識プロセスの1分子動画計測