

「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

財団法人 高輝度光科学研究センター利用促進部門 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

本研究は以下の7つのテーマに集中して研究が遂行される。(1) X線1分子追跡法の高速化、(2) ナノ結晶完全結晶化、(3) 電子線1分子追跡法の開発、(4) 走査型X線放射圧顕微鏡の基礎検討、(5) 免疫系1分子計測、(6) 膜系1分子計測、(7) マイクロ秒1分子計測。本年度は、高速化のための予備実験(該当テーマ(1))、ナノ結晶作製既存技術のバージョンアップ(該当テーマ(2))、走査電子顕微鏡の設置と関連装置の整備(該当テーマ(3))、サンプル系の整備/調整(該当テーマ(5))に目標を定め、各グループにおいて効率的に研究を進めた。また、初期年度ということもあって、本研究チーム内の意識を統一するためにも、会合を持ち意見交換を積極的に進めた。

2. 研究実施内容

H19 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

今年度、装置関連の進展としては、電子線1分子追跡法関連の装置設置及び、基本特性評価、放射光関係では、高速シャッターの設置(10 μ s レベル)と高感度X線イメージングインテンシファイアー設計と作製を完了した(一部未納)。X線放射圧顕微鏡に関しては、そのプローブの試作を行っている。サンプル系では、膜たんぱく質分子である PSII 系の1分子内高速運動計測を始め、高エネルギープローブを用いた際の基本的な問題点として認識されている破壊メカニズムをこの1分子計測技術で評価できるのではないかと考え、10-20 秒の長時間計測におけるスカベンジャー効果を定量計測する実験も開始した。ナノ結晶作製技術に関しては大きな進展があった。以前より問題になっていた金蒸着基板である NaCl(100)単結晶基板の表面清浄性についてである。蒸着

装置の挿入する直前に(100)にて壁開する作業を導入したが、これによって最適アニーリング温度の低温化がかなり大きいことが石川グループの評価によって明らかになった。以前は375度でアニーリングしていたが、現状200度以下においてもその効果がありより低温化できる可能性があることが分かった。このことは金以外の高融点金属(白金等)においても同様のシステムが利用できる可能性を示唆しており、ナノ結晶の材質的な広がり期待できる成果と考えている。また本CRESTで初めて実現した石川グループとの連携が功を奏したと言える。

サンプル系であるPSII系の実験進捗状況を報告する。PSIIはbRと同様に膜たんぱく質分子を基板固定して実験を行う初期的なDXTサンプル法において、bRで紫膜本体を用いて膜配向技術を用いて基板吸着させたのと同様に、チラコイド膜を基板吸着させて、その中に含有される機能性タンパク質分子群の1分子解析が可能になる。PSIIの特徴は、短パルス(10 μ s程度)の1-4回連続照射によって測定できる中間体をほぼ区別できる点である。この照射法によってどの構造変化がどの中間体の関与するものかを同定しやすくする。また、PSIIは14種以上の膜貫通サブユニットと3種の膜表在性(親水性)サブユニットを含む分子量320,000 Daの超分子複合体なので、変異体を用いなくても、色々な部位特有の運動計測が可能になる点は研究を進める上で有利である。最近のデータでは、水分解時に発生する電荷をPSII自身に蓄積していくと分子の運動特性が急に変化するという結果も得られてきた。今後の測定結果が楽しみである。

B. 石川グループ

機能性1分子の分子内構造変化を計測する手段として、佐々木が開発した白色X線を用いたX線1分子追跡法DXTは、分子に標識したナノ結晶からのX線回折斑点の動きを連続的にトレースする方法であり、X線源として大型放射光施設を必要とする。そこで石川GではDXTの原理を応用して、X線に換えてコンパクトな電子線装置を用いる1分子追跡法の開発を目指している。基本装置として高輝度走査型電子顕微鏡(SEM)を用い、溶液中の試料を観察できるSEM用の環境試料室(wet cell)を開発し、生体分子に標識したナノ結晶の結晶方位の変化を電子後方散乱回折装置(EBSP)で高速時分割計測できるコンパクトな電子線装置開発を始めた。本装置に必要な要素として、(1)高輝度SEM装置、(2)SEM用極薄隔膜のwet cell、(3)高感度EBSP装置(wet状態の試料に標識した金の完全ナノ結晶の計測)(4)ダメージレスの電子線照射技術(標識金粒子のみへの照射を目指す)が挙げられる。

まず18年度末に高輝度SEM装置として日本電子(株)製JSM7000Fを設置し、これまでにTEM用に開発したガス雰囲気試料室を応用して、液層を保持できるSEM用の極薄隔膜wet cellを作製した。Wet cellの構成は、SEM用標準試料台に合わせて、直径12mm、高さ8mmの真鍮円柱にOリング(内径2.0mm太さ0.45mm)を固定し、隔膜を張ったりん青銅製特殊グリッド(直径3.5mm、厚さ0.2mm)でOリングを押さえて密閉する方式とした。隔膜には、高耐圧性(1.3気圧以上)の厚さ20nm程度のカーボン蒸着膜を用いている。EBSP観察時には試料を約70°傾けるため、グリッドの孔は幅0.1mm、長さ0.3mmとし、長さ方向に70度傾斜したときに0.1 \times 0.1mmの視野を確保できるようにした。傾斜時には隔膜内の電子通過距離が膜厚の3倍と大きくなるが、加速電圧15から30kV

で、隔膜下の直径数十nmの金粒子が、十分に観察可能である。図1に、wet cell の構成模式図を、図2に厚さ約20nmカーボン隔膜下の金粒子のSEM像を示す。隔膜下の金粒子からのEBSP計測が可能なのも確認しているが、試料と隔膜の電子線照射損傷を抑えて高速計測を実現するために、さらに検出系の高感度化を計画している。

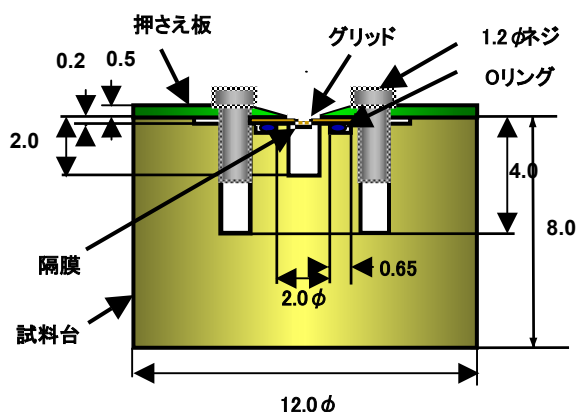


図1 SEM用Wet Cellの構成模式図

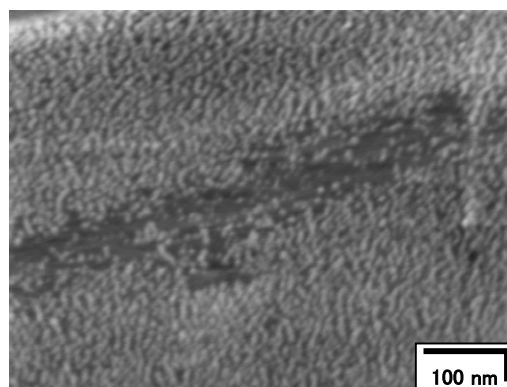


図2 カーボン隔膜（約20nm厚）下の金粒子像:加速電圧30kV,傾斜角70度

C. 金川グループ

サンプル系の主要部分であるMHC系の担当は金川Gと小園Gである。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知られている。しかし、従来の手法では、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。そこで金川Gと小園Gでは、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X線1分子追跡法DXT計測によって試みている。

CD4⁺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)の複合体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の複合体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3A9 T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複合体に反応する。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細胞に代表されるもので、細胞外で形成されたペプチド-MHC複合体には反応するが、細胞内で形成された複合体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。

金川Gで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 は不安定な複合体を形成して、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 は安定した複合体を形成して、特に細胞内において DM 分子の存在下に形成された複合体の場合、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、複合体の運動の差を DXT 法により一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。

今回 HEL52-61/MHC 複合体及び HEL48-61/MHC 複合体の溶液中での分子運動を一分子レベルで DXT 法により解析した。各々の複合体の一秒間での運動量の平均を求めると、予想通り不安定な複合体と考えられる HEL52-61/MHC 複合体がより大きな運動をしていることが確かめられた。しかし、予想外なことに、ペプチドの複体内での動きの差に注目してみると、大差が見られないことが分かった。このことから T 細胞は、ペプチド自体の運動よりむしろペプチドの種類の違いにより生じる複合体のコンフォメーションの差異に由来する複合体自体の運動の違いにより反応が支配されていると予想した。今後はさらに異なる種類の複合体分子の運動を解析してゆくことにより 3A9 と HS1 の反応性の差を解明しようと考えている。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している。

D. 小園グループ

獲得免疫応答において、抗原提示細胞(APC)は外来抗原をペプチドとして MHC class II 分子 (MHC II)の上に乗せ、T細胞への提示を行う。In vivoにおいてはHLA-DM(DM)分子は、MHC IIに抗原ペプチドを結合させる過程で不可欠なものであるということは判っているが作用機構は明らかにできていない。DMはMHC II遺伝子座に存在するMHC IIホモログで、構造は類似しているがMHC IIとしてのペプチドの提示自体は行わない。そのDMの触媒機構の解明が小園Gの当面の目的である。

小園Gは本CRESTより、MHC IIの生化学的・物理化学研究に着手した。その結果、可溶性のMHC IIは可溶性DMを共存させただけではペプチド交換反応を促進しないことが解った。しかしながら、ペプチド交換が起こる場所であるMHC IIなどの小胞と同じpH下に置くと問題なくペプチド交換が起こることを発見した。つまり、MHC II自体が基本的にはペプチド交換を起こす性質を持っており、DMはその補助をするということが示唆された。さらに、pH依存性のペプチド交換反応の解析によりpHを低くするとMHC IIが構造変化は伴わないが分子運動が大きくなる、という結論を導きつつある。今回はX線1分子計測法DXTを中心に、分子の運動性とペプチド交換反応の相関をみた。実験結果は以下に示す通りである。(1)材料として、可溶性のMHC IIを2種類準備した。ひとつは、C末がleucine-zipperで固定されているもの、もう一つはleucine-zipperはついていないものの一方のzipperをthrombinにより切断し、動きの制限がないものである。(2)DXTを用いたI-Ag7或いはそれに結合したペプチドの動きのリアルタイム測定をおこなった。C末Leucine-zipperで α -鎖 β -鎖を固着したものはgold nano-crystalの動きが小さく、C末freeのものは動きが大きかった。(3)Biacoreで抗MHC II α -helices抗体への結合のキネティクスを見た。C末固定のものはon

rate, off rate が早く、C 末 free のものは遅いことが解った。(4)蛍光標識したペプチドの結合、つまりペプチド交換反応を見たところ、アイソタイプによっては C 末固定のものでは、C 末 free のものに較べ著しく結合が阻害された。

図らずも、MHC II の C 末を固定化するとその影響が N 末側のペプチド結合部位に影響することがわかった。C 末を固定化で DXT では動きが制限されることがわかり、Biacore の結果はそれをサポートするものであった。また、実際のペプチド交換反応も C 末固定の影響が出ていた。つまり、分子運動が大きくなることがペプチド交換の主因であるという我々の仮説と合致する結果を得たわけである。しかしながら本来の目的は DM の働きをみることである。そこで、今後は DM を効果的に MHC II に近接させることにより、MHC/ペプチドの動きが抑制されることの検証を DXT 及び Biacore 等を使って行う予定である。

3. 研究実施体制

(1) 佐々木グループ

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

① 研究分担グループ長: 石川 晃 (日本大学、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

① 研究分担グループ長: 金川 修身 (理化学研究所、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

① 研究分担グループ長: 小園 晴生 (東京理科大学、准教授)

② 研究項目

- ・ 免疫系分子認識プロセスの1分子動画計測