

「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 主幹研究員
(東京大学大学院 新領域創成科学研究科 教授)

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分子追跡法の高速度化、(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、高速化のための実験装置設置(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))、走査電子顕微鏡基礎検討(該当テーマ(3))、免疫系1分子実験(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ていきたい。

2. 研究実施内容

(1)佐々木グループ(東京大学大学院 新領域創成科学研究科)

佐々木グループの本年度の目標は、(1)ナノ結晶作製技術の改良(2)電子線1分子追跡法の本格データ取得(3)免疫系データのまとめと(4)解析ソフトの完成である。(1)に関しては、現在プレアニーリングとして 300 度付近でエピタキシャル成長させていたナノ結晶作製条件を塩化ナトリウム単結晶の清浄化をより厳密に行った結果、200 度においてもエピタキシャル成長が確認できた。これはより粒径の揃ったナノ結晶の作製を目指す上では非常に大きな進展となった。また、通常プレアニーリング後に高圧下アフターアニーリングをし、より結晶性の良いものを作製するが、ナノ結晶の粒径がかなり広がってしまうのと、結晶の質にもばらつきが出てしまうことが問題となっていた。しかし、このナノ結晶を電子線系においてプローブにする場合は、このアフターアニーリング行程が必要ないことが今年度の電子線実験で明らかになった。これは、X線と電子線の透過能の違いにより理解できる。金元素 30keV において電子線の平均自由行程は 3nm だがX線は 20 μ m もある。20-40nm の平均粒径を持つ金ナノ結晶はX線では粒子全体の結晶性がプローブとして利用されるが、電子線の場合はナノ結晶表面部分のみ

プローブ利用していることになり、最適直径3nm レベルでも結晶性がよければ検出可能になる。今回の実験結果で作製しているナノ結晶表面(深さ 3nm 程度)がプレアニーリング行程ですでにかなり良質な結晶状態を持っていることがわかった。X線実験において利用するプローブとしてより良質なナノ結晶作製の可能性もまだ残されている。また、最近ではAg(意外と良質な結晶ができる)やPbの良質結晶の作製、中性子スーパーミラーで実現している複数の格子定数を持つ低次元多層膜から作製可能なナノ粒子作製や、ゾーンプレート型層状粒子の作製も開始し、金ナノ結晶以外のプローブの可能性が大いに期待できるようになったのは非常に大きい。これらの成果が今の段階で出てくるのを不思議に思うかもしれないが、電子線プローブとX線プローブの計測研究を平衡して行って初めて実現できる成果なのである。

(2) 八木グループ((財)高輝度光科学研究センター 利用研究促進部門)

(2-1) 高速 X 線シャッターの評価: SPring-8 の強力な X 線により、生体試料が損傷を受けることはよく知られている。高速時分割実験の場合、短時間に非常に強い試料を X 線に照射することになるので、不要な X 線照射を避けるための高速 X 線シャッターの使用は必須である。X 線用シャッターとして購入した UNIBLITZ 社製シャッター(XRS6S2P0-100)のテストを SPring-8 のビームライン BL40XU で行った。XRS6S2P0-100 を二つタンデムに置き、X 線ビーム(15keV)を通した。透過 X 線強度は、PIN ダイオード(浜松ホトニクス社製)とカレントアンプを用いて測定した。このシャッターの最小開時間はカタログ値で 3.2 ミリ秒であり、それより短い露光時間を得るには、一方のシャッターを閉めつつ他方を開けるという操作を行う必要がある。これはシャッターコントローラで遅延時間を設定することで実現可能である。適当な遅延時間を設定することにより、500 マイクロ秒程度の開時間を得ることが可能であった。X 線用ではないが、同じく UNIBLITZ 社製の高速シャッター LS2T2-100 を用いると、100 マイクロ秒の開時間が得られた。この場合には、10%程度の X 線が閉状態でもシャッターを透過するので、X 線シャッターと組み合わせて使用することが必要である。

(2-2) X 線イメージンシファイアの残光特性の評価: 浜松ホトニクス社から新たに納入された超高感度 X 線イメージンシファイア(X-II)のテストを行った。この X-II は、4 インチのベリリウム窓を持つ低エネルギー X 線用(V7739P/MOD46/P-II)で、入力面の蛍光体は CsI である。出力面はレスポンスが速く残光の少ない P46(YAG)を使用しており、本機はさらにその後段(出口窓の後ろ)に近接型 II を置くことで、更なる感度の上昇を実現している。

テストは、BL40XU 常設の回転シャッターとソレノイドシャッターを用いて 5 マイクロ秒の X 線パルスを作り出して行った。試料にはニワトリ腱コラーゲンを用いた。X 線カメラは、ORCA-II-ER(C4742-98-24A)を使用した。近接型 II の感度を 0 にして、5 マイクロ秒の露光で記録したコラーゲンの回折パターンには数次の反射が見られ、すでに単一フォトンが観察可能であった。近接型 II を使用しないイメージンシファイアと比べると約 10 倍の明るさである。

次に近接型 II のゲインを 8 にしてみると、単一フォトンの積分強度はゲイン 0 と比べると 60 倍程度となった。増幅による感度の上昇は明らかであるが、近接型 II に流れる電流の制限によって、直線性が失われていると思われるデータも得られた。ここで行った性能評価では、強い X 線を使用しているため、近接型 II が飽和気味である。しかし、強度の定量の必要ないスポ

ットの位置を測定するような計測には、十分な性能を有していると考えられる。

(3) 高速 CMOS カメラの評価： フォトロン社製高速 CMOS カメラ FASTCAM SA1.1 の性能評価を行った。テスト実験では X 線イメージインテンシファイアとの接続に難があったが、毎秒 5400 フレームで 1024x1024 ピクセルの撮影が可能であり、BL40XU では金ナノ結晶からの反射を十分に捉えることが可能であった。本格的な性能評価と利用実験は、来年度に予定している。

(3) 石川グループ(日本大学文理学部物理学科)

研究目的： 電子後方散乱回折装置(EBSP)を装備した走査電子顕微鏡を用いて、生体分子に標識したナノ結晶の結晶方位の変化を、生体分子へのダメージなしに高速時分割計測する技術を開発する。

方法的には以下の4つに分けられる。(1) 走査電子顕微鏡を用いたEBSP計測用のWet Cellの開発： 走査電子顕微鏡用の極薄隔膜Wet Cellを開発し、厚さ約20nmのカーボン隔膜下に金ナノ粒子を水とともに密閉し、EBSP観察を可能とする。(2) Wet Cell隔膜用の極薄高耐圧性カーボン膜の開発： EBSP計測時には、試料を70度傾斜させるため、Wet Cellの密閉用隔膜を通過する電子線経路長はカーボン膜厚の3倍となり、入射電子線だけでなく信号となる後方散乱電子の強度の低下が問題となるので、隔膜厚さを従来用いていた20nm程度よりもさらに薄くするための、隔膜作製法を開発する。(3) EBSP計測用ビデオカメラシステムの高感度化： 試料の電子線照射損傷を極力低減するためには電子線照射量を減らす他ないが、その結果EBSP信号が減少して、十分な信号体雑音比での計測が困難となる。そこで、従来の計測システムにおけるEBSP検出用蛍光版の蛍光体厚さの最適化を図るのと併せて、イメージ・インテンシファイヤーを組み込んだCCDカメラを開発する。(4) 生体分子標識用の金単結晶ナノ粒子の作製： ビデオレートでの高速計測を可能とする良好なEBSPを得るためには、生体分子に数十nm程度の大きさのそろった金の単結晶粒子を標識する必要がある。そこで、種々の作製条件により作製した金粒子のサイズ、形状、結晶性を走査電子顕微鏡で計測し、最適な作製条件を明らかにする。

結論としては、走査電子顕微鏡でのEBSP計測用のWet Cellは水を入れて密閉した状態で、安定に操作できることを実証している。この隔膜については、厚さ10nmで1.3気圧の耐圧性能をもつカーボン隔膜の作製に成功しているが、現段階ではその歩留まりが10%程度と低いため、なお作製法の改善を目指している。また、Wet Cellに水を入れて密閉した状態では、電子線照射時に水と反応して隔膜に孔が空いてしまう現象が生じたので、何らかの保護膜を付けて膜の損傷を低減する方策を検討する必要がある。

EBSP計測用のビデオカメラについては、計測に用いる電子線加速電圧30kVで最高の強度が得られるよう、EBSP検出用の蛍光版の蛍光塗料の厚さを最適化した。これと併せて、CCDカメラの前段にイメージ・インテンシファイヤーを装着することにより、従来システムの約10倍の高感度化に成功した。これによって、サイズ約70nmの金粒子から、最小の照射電子線電流値0.048nAでEBSPを計測できることを確かめた。さらに、穴径を小さくした対物絞りを装着し、電流値を減らせるようにして、EBSP計測可能な限界電流値を明らかにする必要がある。なお、金粒子の結晶方位変化の計測のシミュレーションとして、金の双晶結晶の境界の両側

を電子ビームで交互に走査したときのEBSPの変化をビデオレートの速さで観察可能であることを確認している。金ナノ粒子の最適作製条件については、なお詳細な検討が必要であり、走査電子顕微鏡による計測を継続している。

(4. 1) 金川グループ(独立行政法人理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター)

研究目的: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。そこで次に示すモデルを用いて分子認識の詳細な機構の解明を試みた。

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(I-A^k)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、細胞外で形成されペプチド-I-A^k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しない。さらにHS1はI-A^k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。また、HEL48-61の52番目のAspをAlaに置換したペプチド(HEL48-61D52A)では、HEL48-61と比較してI-A^kへのアフィニティーが4倍程度低下し、HS1の反応は30倍程度低下した。すなわち、I-A^kへのアフィニティーがほぼ変わらないHEL52-61とHEL48-61D52AでHS1の反応は1000倍以上もの差が生じた。これらのことから、HS1の活性はアフィニティーの強弱により支配されていないこと、ただ単にアフィニティーの弱い複合体に強く反応するわけではないことが示された。

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-I-A^k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、しかしながら不安定な複合体の運動はその種類により異なっていて、活性化できる形を形成しにくい場合もあると考えた。逆に強いアフィニティーを持つペプチド-I-A^k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、その証明を試みた。

方法:HEL48-61、HEL52-61及びHEL48-61D52AとI-A^kそれぞれの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。

結論:今回HEL52-61/I-A^k複合体及びHEL48-61/I-A^k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。また予備的ながらHEL48-61D52A/I-A^k複合体の運動も解析した。各々の複合体の一瞬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/I-A^k複合体及びHEL48-61D52A/I-A^k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3種類の間で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

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考えた。

また、3A9は運動量の小さな複合体によく反応することも分かった。ところがHS1は、両方とも大きな運動が見られたHEL52-61/I-A^k、HEL48-61D52A/I-A^kで大きく反応が異なっており運動量からその反応性を説明できなかった。そこで、HS1は運動量ではなく運動の質の差を認識していると考え現在詳細な解析を行っている。予備的ではあるが、両複合体の間には分子運動の拘束性と回転方向の運動にわずかに差が存在することが判明している。

(4.2) 小園グループ(東京理科大学 生命科学研究所)

1型糖尿病は、様々な遺伝的背景、および環境要因によって起こる自己免疫疾患である。その関連遺伝子座は15以上あるが、免疫に関わるものと膵臓の炎症感受性に関わるものとの分けられる。中でもMHC遺伝子座は密接に疾病発症に関わることが知られている。それらの遺伝子はヒトではDQ8、マウスではIAg7と呼ばれる。その構造的特徴としてβ鎖の57番目は通常MHCはアスパラギン酸であるのに対してセリンやアラニンを持ちα鎖との間の水素結合が一つ少なくなっていることが解っている。我々は、この構造ゆえに分子の柔軟性が増し、一つのペプチド/MHC複合体が複数の構造を取り得ると考えた。ここでの複数の構造というのは異なるTCRが認識し得るということを意味する。通常今まで解かれたTCR-ペプチド/MHC複合体構造におけるinduced fitはTCR側に起こっているものばかりであった。我々は、T1Dにおいては認識におけるinduced fitがMHC側で起こる、つまり一つのペプチド/MHC複合体が複数の活性型を持つと考え、それを明らかにし、自己免疫疾患発症のメカニズム研究に結び付けたいと考えている。また最近胸腺におけるネガティブセレクションが糖尿病誘起性のMHC/ペプチドでは起こらない可能性が示唆された。しかしながら、そのようなリガンドが何故抹消ではT細胞活性化を起こせるのかはわからない。TCRの結合が如何にリガンド自体を安定化させるのか、DXT計測が解明の一助になると考える。

我々は既にDXT計測において、糖尿病誘起性のペプチド/MHC複合体の動きは、コントロールペプチド/MHC複合体に比べ大きいことを実証している。しかしながら、一つのペプチド/MHC複合体が複数の活性型を持つことを証明するためにはTCRと結合した時のMHCの状態を調べる必要がある。そこで糖尿病誘起性ペプチド/MHC複合体に応答するT細胞由来のTCRを作製することを試みた。実際には以前にもいくつかの異なる方法で試みたがうまくいっていなかったのが現状である。今回は disulfide-bondを人為的にα鎖とβ鎖の間にかける方法を試みたところ、3つのTCRの作製に成功した。さらに、ナチュラルなTCRは結合親和性が弱く、結合によるペプチド/MHC複合体の複数の構造決定に困難が伴うことも予測される。そこで、酵母表面ディスプレイによりTCRを酵母表面に発現させ、高親和性のものに進化させる試みを行っている。実際、2つのTCRの発現は既に成功している。今後、人為的にCDR部分に変異を入れたライブラリを作ることにより、より安定な複合体を作れるTCRを選択する予定である。

本年度は、測定用の試薬の作製系の開発を行った。今後は試薬の調製とともに測定を進めていく予定である。それらは、Biacore T100による相互作用の測定による熱力学定数の算

出、Diffracted X-ray Tracking によるTCR結合時のペプチド/MHCの分子運動の変化の解析である。

(5)久保グループ(独立行政法人 産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門)

研究目的: ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)は、神経-筋接合部位や中枢神経系シナプスに局在するイオンチャンネル型受容体で、神経伝達物質アセチルコリンなどのリガンドが結合するとイオンを透過して細胞の電気的興奮性を変える。nAChR は神経情報伝達において中心的な役割を担うため、多くの生理学的、薬理的な研究蓄積がある。特にシビレエイ発電器官において極めて高い濃度で発現するため、タンパク質精製と再構築実験による受容体の特性解析やX線による構造の解明が、膜受容体の中では異例の早さで行われた。一方、膜受容体とリガンドの相互作用の分子動態に関して、解離・会合過程の速度論的解析はあるものの、構造の動的変化は既存の技術で捉えることは難しく、未だ解明が進んでいない。本研究では、研究代表者により確立されたナノ金結晶を用いた1分子計測法を用いて、膜受容体とリガンドの動的相互作用を可視化して解析することを目的とする。

方法: nAChR は4回膜貫通型の受容体で、そのN末端から第1膜貫通領域までの約230アミノ酸は細胞外領域にあってリガンド結合に関与する。我々は、海産軟体動物アメフラシ(*Aplysia kurodai*)中枢神経系よりnAChRの細胞外ドメインと相同性のあるタンパク質を同定し、それをアセチルコリン結合タンパク質(Acetylcholine Binding Protein, AChBP)と銘々した。AChBPは、神経系nAChR($\alpha 7$)と同じリガンド選択性を示し、またnAChRと同様のサブユニット構成であることを確認している。そのため本研究では、AChBPを膜受容体nAChRのモデルシステムとして利用し、そのcDNAに所定の変異を導入して、基板やナノ金結晶の固定位置の異なるAChBP変異体を遺伝子工学的に調製して1分子計測を行う。

結果: 大腸菌による遺伝子組換えタンパク質発現によりAChBPを調製するために、その手順の確立と条件の最適化を行った。ヒスチジンタグ(H_6)をAChBPのN末端側に導入するcDNAコンストラクトを作製し、大腸菌XL1Blue MRF'のトランスフォーメーション、IPTGによる誘導、AChBPの発現及び精製、保存条件を検討した。3回の精製により、約1mgのAChBPを調製することができた。基板に固定化するAChBPの配向性やナノ金結晶の固定化位置を変えるため、タグの種類や位置、アミノ酸置換の異なる種々のコンストラクトについて検討したタンパク質調製の準備を行った。

3. 研究実施体制

(1)佐々木グループ(東京大学大学院 新領域創成科学研究科)

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)
(東京大学大学院、教授)

②研究項目

高エネルギー1分子追跡法確立と1分子計測周辺基礎研究

(2)八木グループ((財)高輝度光科学研究センター 利用研究促進部門)

①研究分担グループ長:八木 直人((財)高輝度光科学研究センター、主席研究員)

②研究項目

X線1分子追跡法の高速化

(3)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、教授)

②研究項目

電子線1分子追跡法の開発

(4. 1)金川グループ(独立行政法人 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((独)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

(4. 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、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

(5)久保グループ(独立行政法人 産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門)

①研究分担グループ長:久保 泰((独)産業技術総合研究所、副部門長)

②研究項目

膜系1分子計測

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Yamasaki S, Takase-Utsugi M, Ishikawa E, Sakuma M, Nishida K, Saito T, Kanagawa O. Selective impairment of FcεRI-mediated allergic reaction in Gads-deficient mice. *Int Immunol.* 20(10):1289-97(2008). Epub(2008)
2. Tomura M, Yoshida N, Tanaka J, Karasawa S, Miwa Y, Miyawaki A, Kanagawa O. Monitoring cellular movement in vivo with photoconvertible fluorescence protein "Kaede" transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5;105(31):10871-6(2008) Epub (2008)
3. Mori Y, Kato T, Kodaka T, Kanagawa EM, Hori S, Kanagawa O. Protection of IFN-gamma signaling-deficient NOD mice from diabetes by cyclophosphamide. *Int Immunol.* 20(9):1231-7(2008). Epub (2008)

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)