

「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

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

機能性生体高分子が機能発現する際に起こる分子内部の構造変化情報を高速で高精度に1分子検出することは、多くの生命現象の素過程を理解する最善策である。得られる構造情報は原子サイズ以下の精度、時分解能はマイクロ秒レベル、1分子からの情報を *in-vivo* において高感度計測する。理想的には装置規模が実験室レベルであること、それが究極的1分子計測の理想像であり本研究構想の目的はこの究極的計測システムを実現することにある。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。以上7つのテーマに6つのグループが有機的に連携し効率的に研究を進めてきた。現在までの主な成果として、T細胞系の新しい分子運動の確認、マイクロ秒オーダー高速計測の実現、電子線1分子計測手法の原理確認、注目される機能性タンパク質系及び膜たんぱく質系の運動計測等があげられる。

§ 2. 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(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

①研究分担グループ長:八木 直人(財団法人 高輝度光科学研究センター、副部門長)

②研究項目

X線1分子追跡法の高速化

(3)「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

(4)「金川」グループ

①研究分担グループ長:金川 修身(独立行政法人 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

(5)「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

(6)「久保」グループ

①研究分担グループ長:久保 泰(独立行政法人 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

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

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てきた。(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。各グループにおける今までの研究成果を要約する。

(3-1)佐々木グループ(東京大学大学院 新領域創成科学研究科)

研究実施項目:(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分子計測の7つのテーマすべてに関して並行して研究を促進した。

本研究の最大の特長は、放射光という大型施設を利用したX線 1 分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking: DXT)の最大の欠点を克服する可能性のある電子線 1 分子追跡法(Diffracted Electron Tracking: DET)の研究を併用して進めている点にある。X線と電子線の最大の違いは各エネルギーにおける Mean free path(平均自由行程)である。X線は例えば 30keV(0.4 Å)ではAuを1mm以上に渡って透過するが、電子線の場合はたった 30 Å進むと強度は半減する。この特性を利用すると、本 1 分子計測法の中心的重要技術であるAuナノ結晶の表面構造評価とバルク構造評価を区別して行う事が可能となる。結果的にDETの用いるナノ結晶作製条件とDXTのそれとはかなり違う事が明らかになった(図1)。DETの場合は、アニーリング温度400度(アニーリング時間は2時間)であるが、DXTの場合は、アニーリング温度525度(アニーリング時間は2時間)であった。注目する点は、DXT最適条件で作製されたナノ結晶の表面結晶性がアニーリング温度を上げているにも関わらず劣化している点である。常識的にナノサイズの薄膜や粒子の結晶性はアニーリング温度を上昇させればさせるほど良好になる。しかし、形状がその温度に依存して変化するために各目的の実験によって最適アニーリング温度は異なってくる。

ここで予想される NaCl 状の金ナノ結晶の結晶性向上メカニズムは図2のようになる。これは全く予想していなかった。従来のエピタキシャル成長に関する研究は通常電子顕微鏡下で行われてきた。また数 nm サイズの現象に注目され、数十 nm サイズの表面以外の現象にはそれほど注意されてこなかった。その間隙をぬった結晶成長プロセスのように思われる。より詳細な結晶成長に関する研究を電子線だけではなく、X線やAFM等の複合的な評価法を用いて行っていかねばならないことが再認識できた。

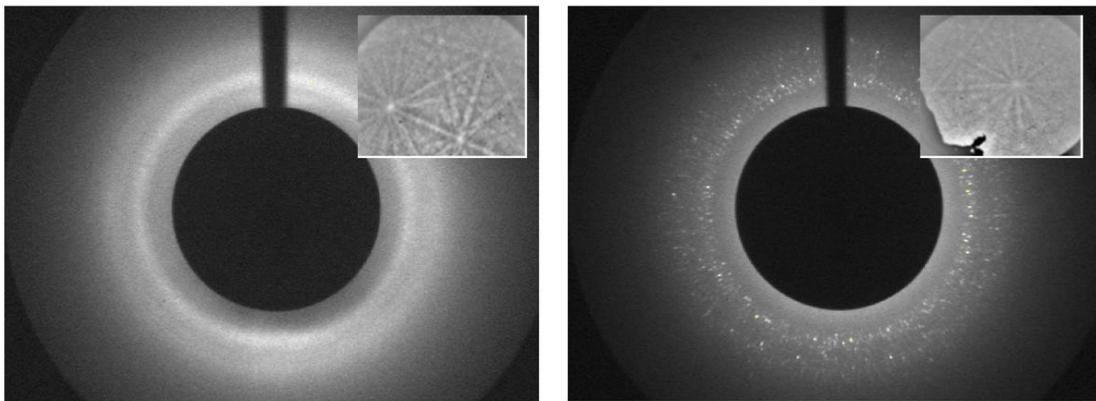


図1: 左は基板加熱温度 375 度の時の金ナノ粒子からのラウエパターン。全く回折スポットが確認できない。しかし、電子顕微鏡で確認した回折パターン(EBSP)はかなり良質の結晶がナノ粒子表面に存在することを示す。右は基板加熱温度 475 度の時のラウエパターン。かなり大量な回折スポットが確認できる。しかし、電子顕微鏡で確認した回折パターン(EBSP)はあまり良質とはいえない。ちなみに、525度程度になると NaCl 基板上的のナノ粒子はほとんど蒸発してしまう。

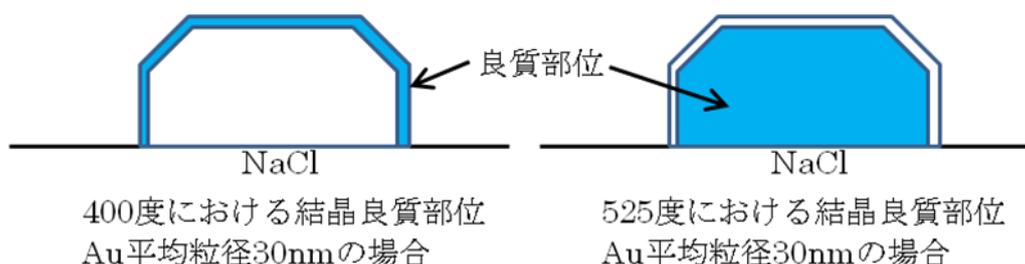


図2: 上記データから類推される NaCl 基板上で起こっている結晶成長プロセス。X線と電子線の研究を併用することで初めて明らかとなった。

(3-2) 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)

タンパク質の機能発揮のような生命現象を追跡する一分子計測法においては、時間分解能は常に重要な要素である。高速 X 線記録を可能にする方法を検討した。

これまで(株)浜松ホトニクスと協力して回折記録用 X 線イメージインテンシファイア(X-II)の開発を行い、昨年度までにその評価を終えた。従来X-IIと組み合わせてX線高速時分割実験を行う際にはCCDカメラが使用されている。しかし、CCD素子は読み出し時に電荷を隣接したレジスタに順次転送するため、読み出し速度には限度があった。そのためここ数年 CCD に換わってCMOSセンサーを使用する高速カメラが普及しつつある。CMOSはCCDの用に電荷を移動することなく直接画素をアドレスして読み出すため、高速化が可能である。そこで、フォトロン社製高速CMOSカメラFASTCAM SA1.1を購入して性能評価を行った。本カメラは毎秒5400フレームで1024x1024ピクセルの撮影が可能である。

本カメラのADコンバータは12ビットであるが、実効的なダイナミックレンジを次のようにして求めた。(1)ダーク画像を500fpsで100フレーム記録する。(2)この100フレームの平均画像を計算する。(3)平均画像を全フレームから引く。(4)引き算した画像内のいくつかの画素(実際には128ピクセル飛びの8x8=64点)について、100フレーム間での変動(標準偏差)を調べる。(5)その標準偏差を、調べた画素全部(64点)で平均して、RMSノイズとする。この結果得られたRMSノイズは4.9だった。本カメラではダーク値(オフセット)が約1500あるため、12ビットの中で実際に使えるのは2500程度であり、RMSノイズとの比を取ると268である。すなわち実効ダイナミックレンジは約8ビットであった。同様の方法でC9300-201のダイナミックレンジを求めると約9ビットとなり、CCDの方の読み出しが遅い分だけダイナミックレンジが広いことが分かった。しかしこの2倍の違いの重要性は、実験によって異なると思われる。

P43とP46の二種類の蛍光体を使用したX-IIと組み合わせて行ったテスト測定では、図3のプロットのように蛍光体の残光特性が顕著に表れた。ミリ秒以下の測定ではP46の使用は必須であり、本研究に於ける蛍光体の選択が正しいことが明らかとなった。

さらに金ナノ結晶からの反射を10マイクロ秒程度の時間分解能でも捉えることが可能であることが確認され、P46を使用したX-IIとCMOSカメラの組み合わせが、研究目的に適合したシステム

構成となっていると判断された。

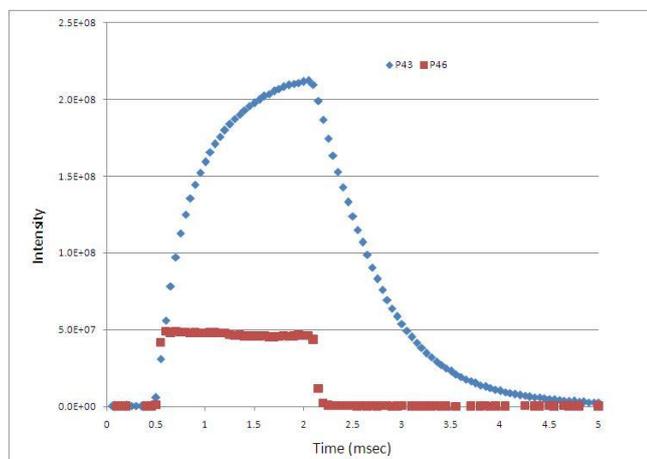


図3 蛍光体の残光特性

(3-3) 石川グループ(日本大学文理学部物理学科)

DXTの原理を応用して、X線よりも試料との相互作用の大きい電子線を用いた、実験室規模で常時使用できる、汎用性の高い「分子運動の追跡装置」を開発する。さらに、分子計測においては、X線などの放射線照射による試料ダメージが大きな問題点であるが、電子後方散乱回折装置(以下、EBSPと記す)を装備した走査電子顕微鏡(以下、SEMと記す)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、原理的に生体分子へのダメージなしに高速時分割計測できる技術を開発する。

(1)当初は隔膜下の水層中でカーボン膜に固定した金ナノ単結晶粒子について、EBSPを計測可能とする条件(照射電子流値、EBSP検出・記録用のCCDカメラの信号増幅度、撮影速度など)を検討し、最適条件を確立した。EBSP検出用の蛍光板の蛍光体の厚さを、加速電圧 30kVに対して最適化し、さらに撮影用のCCDカメラの前段にイメージインテンシファイヤーを組み込んで高感度化することにより、低電子照射量でのEBSP計測を可能とした。現在は、ビデオレートでの動画撮影用として、シャッター速度 0.03 秒、照射電流値 0.1nA での計測が可能となっている。この条件では、スポット照射時の隔膜の穿孔なしに 5 秒間程度のEBSP計測が可能であり、金粒子の動きを動的に解析するのに十分である。

図4 に、カーボン膜に固定した金粒子について、カーボン膜の移動によって生じた金粒子のEBSPパターンの変化を動画撮影した最初の 1 画像と、動画の解析から得られた結晶方位のシフトを表す逆極点図(入射面の法線方向を平面に投影した図)を示す。1 画像当たりの電子ドーズ量が極めて小さいため、EBSP画像の画質は良くないが、十分解析可能である。極点図の各点の位置が各連続画像から求めた結晶方位を表しており、結晶の回転によって方位がシフトしていく様子が示されている。

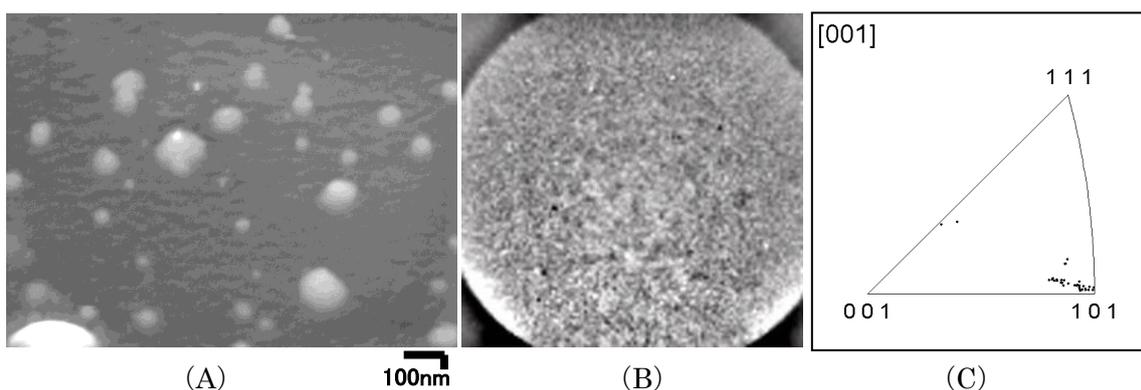


図4. (A)wet cell 内水層中の金粒子,(B)E B S P 像,(C)金粒子方位の逆極点図

(2) wet cell 内での生体分子とその標識

金ナノ粒子の支持方式について、当初は隔膜に直接固定する方式を用いたが、この方式では、
 ① 分子をカーボン膜に固定するためには、まずカーボン膜にクロムとさらに金を蒸着する必要があり、これらの膜が隔膜に加えて電子線の通過を妨げることになる。

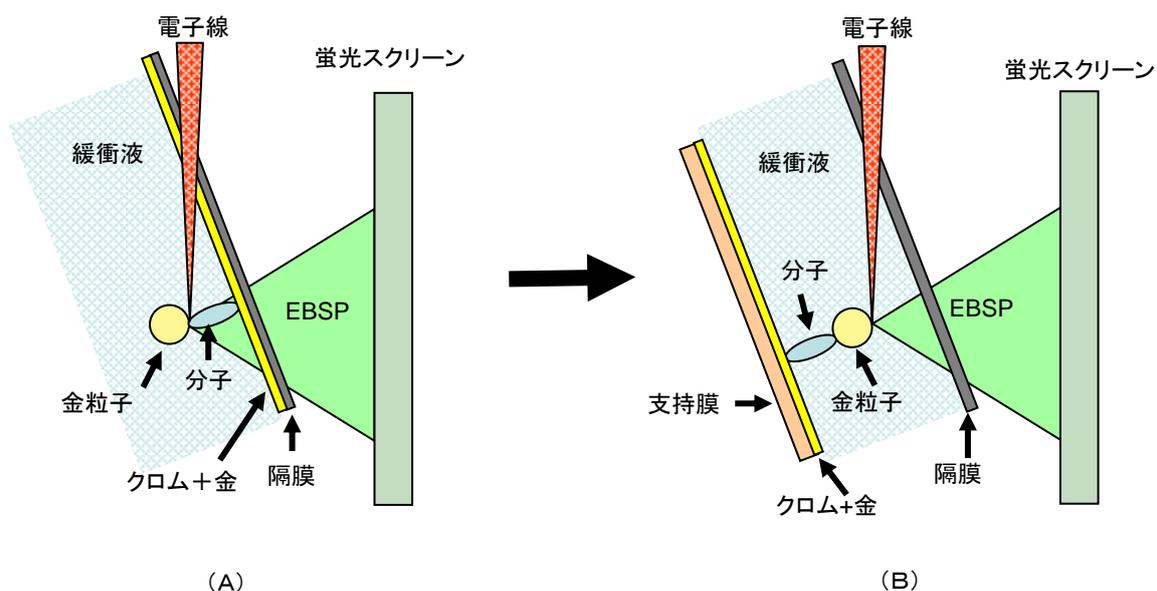


図5. (A) 隔膜保持方式、(B) 支持膜保持方式

② EBSP計測には、標識金粒子で検出器に相対する位置に電子線を照射する必要があるが、隔膜に固定した場合はこの位置は生体分子に接近しており、分子に対するダメージを生起する可能性が高い。

という2つの問題点が判明した。そこで、現在は図5に示すように、隔膜とは別に分子支持用の膜を隔膜に相対させる方式を採用している。この方式では、分子支持用の膜自体が動きやすいものであると、金粒子の動きが分子の動きによるものか支持膜の動きによるものかの区別が困難となる

ので、最適な支持膜を作製する必要があり、現在はTAC薄膜を使用して実験を行い、その可否を検討している。

(3)タンパク分子に標識した金ナノ結晶からのEBSP計測

現在は、タンパク分子としてBSAを用い、これに金ナノ粒子を標識したものを支持膜に固定して緩衝液とともに wet cell に密閉した試料について、金粒子からのEBSPの動画記録が可能となっている。電子線照射による隔膜の損傷で制限されるため、一点あたりの記録時間は数秒間にとどめているが、金粒子の回転によるEBSPパターンの変化を捉えることが可能となっている。しかし、金粒子の位置が隔膜から遠くなると解像度およびEBSP信号強度が急激に低下するので、金粒子を wet cell 内の緩衝液層中で隔膜の直下にセットする技術を確立することが当面の課題である。これが解決できれば、本格的な分子運動の計測が可能となる。

(3-4)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)

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。免疫学において非常に詳細に研究されているT細胞レセプターのリガンドである、MHC-抗原ペプチド複合体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DXT計測によって試みている。

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3A9 T細胞ハイブリドーマに代表されるものと、HS1細胞に代表されるものの差を解明するために、抗原ペプチドと主要組織適合遺伝子複合体(MHC)の複合体の運動の差をX線1分子追跡法(DXT法)により一分子レベルで計測した。現在までに、HEL48-61、HEL52-61およびHEL48-61D52Aの各ペプチドと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1分子計測し、詳細に解析した。MSD解析(ブラウン運動の通常解析手法)を行なった結果、すべての複合体でペプチド自身の運動とI-A^k本体の運動が相関していた。このことからMHCに比べてはるかに小さい分子であるペプチドが複合体全体の分子運動を決定付けていることが分かった。我々は当初、ペプチドのみの運動が大きく異なっても複合体全体の運動は大きく変わらないと考えていたのでこの結果はとても意外なものであり、大きな分子の運動が非常に小さな分子の影響を受け得るという現象を発見した。さらに、各種複合体の運動を比較すると予想通り不安定な複合体と考えられるHEL52-61/I-A^k複合体およびHEL48-61D52A/I-A^k複合体でより大きな運動をしていることが確かめられた。しかし、これらは分子の柔軟さに由来すると考えられる運動モーメントの違いが存在した。

また、この結果は従来からペプチド-MHC複合体の性質を解析する一つの手法として用いられていたSDS stability assayの結果と比較することで興味深いことが見えてきた。これはペプチド-MHC複合体がSDS存在下で複合体の状態を維持できるか否かを調べるものであるが、アフィニティーの強い複合体に関わらずSDS耐性の低い複合体がみられ、アフィニティーの強弱からSDS耐性の強弱を説明することができなかった。現在のところSDS耐性の有無がどのような性質による

のか明らかになっていないが、我々は分子運動の大きさに関与しているのではないかと考えている。すなわち、分子運動が大きいと SDS 分子が複合体間に入り込み易く SDS 化が進み最終的に複合体が分解する。現在のところこの考え方で、DXT による運動の大きさと SDS stability の有無の結果が良く一致している。これは DXT による一分子計測が、マスとしての分子動態を説明するという点で非常に注目している。

更に DXT のデータを基に運動の詳細な解析を進めた。まず、図6に示すように回折点の動きは中心からの放射状方向(半径方向)と、円周方向の二通りに分けることができる(a)。これを実際の分子の状態と、回折の起こり方を考えると、半径方向の運動はナノ結晶の回折面の向きによって、異なる角度での傾き運動であっても同じ回折点の運動を示すことがある。ところが、円周方向の運動はナノ結晶の回折面の向きに関わらず、同じ量の分子全体の回転運動を示すことがわかった(b)。

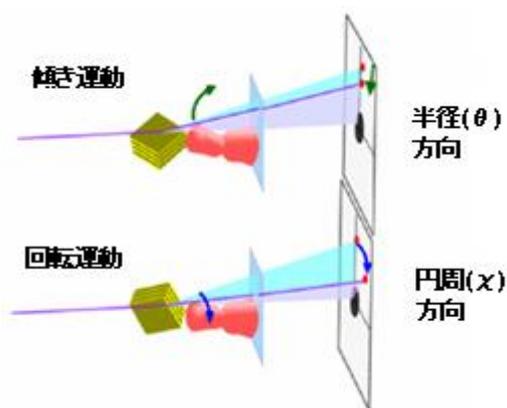


図6a . 回折点の運動から二種類の運動について解析ができる。

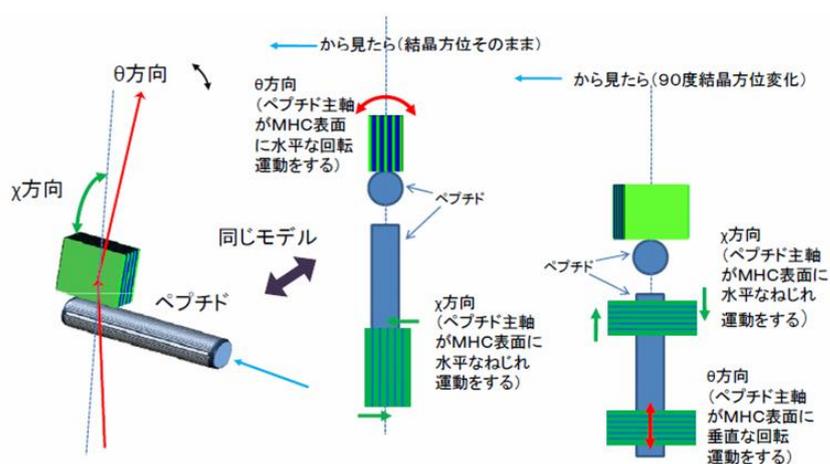


図 6b . 回転方向の運動は結晶の結合方向といったランダムに起こりうる要因に影響を受けにくく、異なる複合体間の運動の比較に適していると考えられる。このモデルでは結晶方向がそれぞれ 90 度異なる場合を想定している。この場合全く同じに見える半径 (θ) 方向の回折点の運動でも、結晶の結合方向によりペプチド-MHC 複合体の異なる方向への運動が起きている可能性を考慮しなくてはならない。ところが、円周 (χ) 方向の回折点の運動は結晶方向に関わらず、常にペプチド-MHC 複合体の回転方向への運動を示す。このことから、各ペプチド-MHC 複合体のより正確な比較がしやすいと考えられる。

そこで、円周方向の運動に注目しそれぞれの複合体の運動を比較した。ただし、ペプチド-MHC 複合体は以前 DXT で解析された KcsA イオンチャンネルのような回転運動のための構造を持ったタンパク質でないため、この回転方向の運動は分子の柔軟性に由来する振動の一部だと考えられる。実際この運動は 0.1 Å 以下レベルの非常に小さいものと考えられるが、DXT の最大の特徴である高分解能により、回折点の運動の中から円周方向の運動を抽出することに成功した。

その結果、HEL52-61/I-A^k 複合体では回転方向に対して速く大きな繰り返し運動が見られた。これはこの複合体で顕著に見られる現象で、分子運動の小さな HEL48-61/I-A^k 複合体はもちろんのこと、HEL52-61/I-A^k 複合体と同じく大きな分子運動をしている HEL48-61D52A/I-A^k 複合体では見られなかった。すなわち HS1 が非常に良く反応する複合体のみに特徴的な運動であった。これらのことから 3A9 はエネルギー状態の安定した複合体を認識し、HS1 は安定状態から円周方向にずれた複合体を認識していると考えられる。

今後、人為的に変異を入れた複合体で 3A9 にしか反応しない複合体を用いて DXT による一分子計測を計画している。いままでの考え方が正しければ回転運動がほとんど見られないと予想している。

(3-5)「小園」グループ(東京理科大学 生命科学研究所)

組織適合性抗原(MHC)は、免疫系において自己と非自己の識別にかかわる分子である。MHC 分子のペプチド交換反応と糖尿病誘起性の MHC の認識では MHC タンパク質のゆらぎの量及び質が何らかの役割を果たし故に、機構解明には動的構造を知ることが必要であると考え DXT を使って、これらの解析を行う。

可溶性の MHC 分子を複数作製し、DXT により 1 分子測定を行った。ペプチド交換反応の計測では、pH を変えて測定すると交換条件下の pH5 のほうが pH7 より分子の動きが大きいことがわかった。しかしながらそれは、ペプチドがゆるく結合している時のみで、強く結合している時は動きに差が見られなかった。このことはペプチド交換反応が弱く結合するものから強く結合する者への交換反応であることを示唆する。また、MHC の α 鎖と β 鎖の C 末をロイシンジッパーで固定化してやると、動きが小さくなることも分かった。ペプチド交換反応を C 末固定化したものと自由な状態のもので比較すると C 末固定化したものは交換反応が進まなかった。すなわち分子全体の動きの大きさと交換反応が相関することが解った。実際、ペプチド交換反応は C 末固定化したものではほとんど起こらず分子揺らぎが重要であることが解った。一方、糖尿病誘起性のペプチドとそうでないペプチドの比較では、糖尿病誘起性のペプチドのほうの動きが大きいことがわかった。このことは糖尿病誘起性のペプチド/IAg7 複合体がより多くのコンフォーマーを取れることを示唆する。

ペプチド交換反応は DXT 測定によりゆらぎの大きさと交換速度が関係することが証明できた。今後 DM 分子を作製導入して DXT を行えば完成する。現在 DM 分子を試行錯誤で作製中である。糖尿病誘起性の MHC とペプチドの動きに関しては、まずは I-A^k による B-type MHC にのみ見られた χ 方向の動きと同様の動きが見られるか検討する。さらに TCR との反応を見ることによりどの

ような相違が通常のMHCと糖尿病誘起性のMHC間にみられるか、熱力学的計測と1分子計測で検証したい。現在TCRを作製し相互作用を検証中である。

(3-6)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)

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ネル型受容体で、神経伝達物質アセチルコリン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。構造の動的変化は既存の技術で捉えることは困難で、未だ解明が進んでいない。本研究では、金ナノ結晶を用いた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明らかにすることを目的とする。

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。まず、ヒスチジンタグ(H6)をAChBPのN末端側に持つコンストラクトを基本型として作製し、これを大腸菌 XL1Blue MRF' にトランスフォーメーション、IPTG による誘導、AChBP の発現及び精製を行った。さらに精製タンパク質の保存条件を確認した。精製した AChBP のゲル電気泳動パターンから、立体構造を保持しながら十分に精製されたことが示唆される。次に、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。AChBP の N 末端に His タグを、C 末端に Streptavidin と親和性のあるアミノ酸配列”StrepTag II”を持つコンストラクトと、それとは逆のタグ配置をしたコンストラクトを作製した。

これらのコンストラクトは、AChBP の C-末端もしくは N-末端に配した StrepTagII 配列が Streptavidin を介してガラス基板に固定されると想定される。即ち、チャネル分子の入口がガラス基板と反対側、あるいはガラス基板側に向いた形で配向するようにデザインした。AChBP には化学的に金ナノ結晶を結合させる。本研究代表者により確立された測定法により、リガンドが AChBP にアクセスした際に起こるタンパク質分子の動きを、金ナノ結晶に高輝度白色 X 線を照射して発生する回折点の動きから解析する。

調製した AChBP が本来の活性を持つことを検証するために、3 種類のコンストラクトについて alpha-bungarotoxin との結合活性を表面プラズモン共鳴法 (SPR) もしくは蛍光相関分光法 (FCS) を用いて解析した。この時の $K_d = 29 \text{ nM}$ と計算され、類縁の AChBP が示す K_d 値 1.8 nM (*Lymnea*), 250 nM (*Aplysia carifornica*)と比較できる値と見なすことができる。FCS 法では測定原理が SPR 法とは異なるため、見かけの K_d 値として算出されるが、表1のように、3種類のコンストラクトともに同程度の親和性を示した。これらのことから、今回調製した3種類の AChBP コンストラクトは、生理活性を持つタンパク質として精製されたことが示唆される。

これらのタンパク質を用いて、リガンドの有無によるAChBPの分子動態変化が既に計測された。現在データ解析が進行中である。

表1. 調製した3種類のAChBPと α -bungarotoxinとのKd (M)

Const.	#1	#2	#3
SPR 法	2.9×10^{-8}	-	-
FCS 法	2.7×10^{-6}	3.9×10^{-6}	3.9×10^{-6}

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Tsuji M, Komatsu N, Kawamoto S, Suzuki K, Kanagawa O, Honjo T, Hori S, Fagarasan S. Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science*. 2009 Mar 13;323(5920):1488-92.

2. Miletic AV, Graham DB, Sakata-Sogawa K, Hiroshima M, Hamann MJ, Cemerski S, Kloeppe T, Billadeau DD, Kanagawa O, Tokunaga M, Swat W., Vav links the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton and T cell activation independently of intrinsic Guanine nucleotide exchange activity. *PLoS One*. 2009 Aug 12;4(8):e6599.

3. Nakajima, Y., Okamoto, H., & Kubo, T. "Expression cloning of *Xenopus* zygote arrest 2 (Xzar2) as a novel epidermalization-promoting factor in early embryos of *Xenopus laevis*." *Genes to Cells* 14: 583-595 (2009)

4. Yamaguchi J, Naimuddin M, Biyani M, Sasaki T, Machida M, Kubo T, Funatsu T, Husimi Y, & Nemoto N. "cDNA display: a novel screening methods for functional disulfide-rich peptides by solid-phase synthesis and stabilization of mRNA-protein fusions." *Nucleic Acids Res.* in press (2009) ; doi: 10.1093/nar/gkp514