

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。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(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(東京大学大学院 新領域創成科学研究科 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分子追跡法の高速度化

(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(日本大学文理学部 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(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;金川 修身(東京大学大学院 新領域創成科学研究科 特任研究員)

②研究項目

免疫系1分子計測

(5) 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

(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)

①研究分担グループ長;久保 泰(産業技術総合研究所 副部門長・研究グループリーダー)

②研究項目

膜系1分子計測

§3. 研究実施内容

(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)

今年度は各サンプル測定系において大きな進展があった。これらの進展は担当のグループから詳細に説明するが、これらの進展は、ナノ結晶の良質化、各反応系の最適化、測定画像 S/N の向上、解析ソフト大量データ対応化の実現、各サンプル系の変異体等の充実等、多くの要因が絡み合った成果であり、非常に意義ある年度であった。また、マイクロ秒測定がルーチ的に測定できることになったことは、今後、実践的な未知なる時間領域における1分子高精度分子内部運動計測がいよいよ開始できることが明確化し、より高速領域であるナノ秒レベルの計測も視野に入ってきたことは非常に価値ある基盤技術の進展と考えている。下記の上記進展が可能となった各要因について記す。

(あ) ナノ結晶作製条件

昨年度は X 線と電子線で使用できるナノ結晶の作製条件が異なるという意外な事実が明確化して、ナノ結晶の作製条件をもう一度チェックするきっかけとなった。その中で蒸着速度が非常に結晶性に重要であることが確認された。勿論、常識的に蒸着速度の最適値があることは予想できるが、真空内におけるコンタミ原子の物理吸着速度を考慮してはいなかった。通常、エピタキシャル成長は基板の清浄性に大きく左右されるので、蒸着時の真空状態も大きく左右される。通常 $1.0 \times 10^{-8} \text{Pa}$ 以上の超高真空状態であれば非常に理想的なエピタキシャル成長が可能となる。しかし、現実には $1.0 \times 10^{-6} \text{Pa}$ 程度であり、そのギャップをいかにして蒸着速度で妥協するかがポイントとなる。現在まで $0.1\text{-}1 \text{nm/s}$ 程度の蒸着速度で実験していたが、 5-nm/s 程度で膜厚を非常に厚くした場合、金色の薄膜が作製されることが初めて確認できた。通常の蒸着速度では青色の薄膜が得られるだけである。今後、この条件で粒径のそろったナノ結晶を大量に作製できるように AFM, SEM, EBSP, DLS 等の評価を総動員して行う。

(い) 高速実験においてマイクロ秒レベル分子内運動の確認

BL40XU において5マイクロ秒で少々大きめのナノ結晶(粒径 80nm 程度)の水溶液中のブラウン運動(基板固定を行っていない)を測定することに成功した。成功のポイントは、高輝度の準白色 X 線光源の照射条件、高速シャッターを利用することで必要最低限の X 線照射のみを行いサンプルダメージを最低限に抑えるシステムの確立、そして、X 線検出器の最適化を行うことで実現した。また、サンプル系からの X 線散乱を最低限する工夫にも時間を要した。この実験系が確立したことで、今まで着目タンパク質分子を基板に固定していたことが不要になったことで、*in-vivo* に近いサンプル系にも適応可能となったことは大きい進歩となった。

しかし、それ以上に今まで基板固定していた系において、マイクロ秒レベルの分子内運動をも測定できることが可能になったことに意義が出て来そうである。なぜなら、測定する前は、一般的なタンパク質分子の分子内運動は早くてもミリ秒レベルの時分解能があれば十分であり、それ以上早くしても止まって見えるだけであると思っていたからである。

実際、多くの系で測定を行ってみると、非常に特異的な運動が存在することが分かってきた。今後、この高速測定は固定しないサンプル系だけではなく、固定した系における安定的な分子内高速測定も非常に重要なターゲットとなることが確認された。これは今後の1分子計測の大きな方向性を示したことになりその意義は大きい。

(う) II型シャペロニンの意外な分子内運動

シャペロニンはミスフォールドしたタンパク質と直接相互作用し、その折れたたみ反応を促進させるタンパク質であり、複数のサブユニットから構成されるリング構造を背中合わせに2つ重ね合わせた構造をとる。シャペロニンは、ATPとの結合・解離およびATP・加水分解反応を密接に連動させ、その機能を発現していると考えられているが、その反応機構は、特に真核生物の細胞質や古細菌に存在するグループII型シャペロニンにおいて明らかになっていない。我々はII型シャペロニンのATPの結合・解離に伴う分子内運動を1分子レベルで高精度且つ実時間スケールで理解するため、近年、発展が著しいX線1分子追跡法を使って実験をした。

本実験系では、超好熱性古細菌 *Thermococcus sp. strain* KS-1 由来のII型シャペロニンの各サブユニット先端にCysを導入した変異体シャペロニンを用い、シャペロニンリング全体の分子運動を観測した。様々なATP濃度条件およびcaged-ATP存在条件における光照射前後での測定を比較した結果、シャペロニンリングはATPと結合することで約15度反時計回りにねじれることがわかった。この知見は、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析の結果とほぼ一致する(Booth et al., Nat. Struct. Mol. Biol. 15:746, 2008)。本発表では、ねじれ運動の角速度やねじれ角度分布など、ATP結合・解離に伴うシャペロニンの分子運動ダイナミクスについても詳細に議論できる再現性の良いデータが得られたので、今後、ATP分子系の非常に細かい時分割的な構造変化を解明することのできる系として確立していく。

(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過程を追跡するX線1分子計測法においては、その過程に見合った時間分解能を持つX線検出器を使用する必要がある。高速X線計測には、X線を蛍光体を用いて可視光に変換し、それを市販の高速カメラで観察するのがもっとも効率の良い方法である。近年のCMOS撮像素子を用いた高速カメラの進歩は著しく、我々はこれら新型カメラのシンクロトロンX線画像計測への応用を進めている。しかしこの方法ではX線を蛍光体を用いて可視光に変換するため、蛍光体の残光特性が時間分解能に影響を与える。低残光性の蛍光体として我々がもっとも注目しているのはP46(YAG:Ce, Yttrium Aluminum Garnet)であり、高速カメラの性能評価を行うとともに、この蛍光体の残光特性を評価した。

Photron社の高速CMOSカメラSA5は、1024x1000ピクセルのフルフレームで每秒7500コマの高速撮影が可能である。さらに64x8ピクセルまで画素数を減らせば、每秒1,302,000コマ(1コマ768ns)の超高速撮影も可能となる。これに低残光性シンチレータP46(YAG:Ce)

を組み合わせ、SPring-8のBL40XUにおいてX線ダイレクトビームを観察した。シンチレータは浜松ホトニクス社製で、粉末のP46を石英基板上に20ミクロンの厚さで塗布したものである。これを同社製ビームモニター2に装着し、タンデムレンズを用いてSA5で観察した。ダイレクトビームは64x8ピクセルの視野にほぼ収まって観察された。X線ビーム強度としては、64x8ピクセルの積分値（暗電流分を除く）を使用した。

高時間分解能で測定したフレームごとの放射光強度変化は、蓄積リングのバンチモードによって異なる。図1に使用したSPring-8の運転モードを示す。

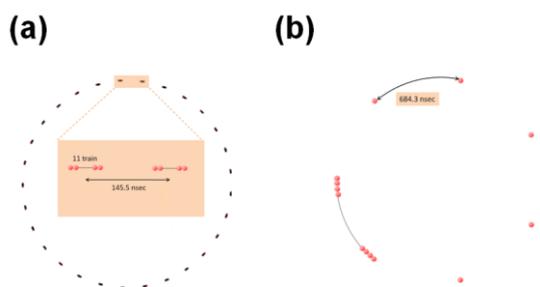


図1 SPring-8の蓄積リングにおける電子の分布(バンチモード)。電子はバンチと呼ばれる単位に分離して蓄えられた状態で蓄積リングを周回している。どちらの場合も、電子の総量は蓄積電流が100mAとなるように調節されている。(a)は2010A期のCモードで、これは連続した11のバンチ(trainと呼ぶ)が、29個均等に周回している。(b)は2010A期のDモードで、蓄積リングの1/7周に電子が等間隔に詰め込まれており、それ以外では5つの孤立バンチとなっている。孤立バンチには各3mAの電流が蓄えられており、85mAが連続部分に蓄えられている。

2010A期Cモードにおいては、ほぼ周期的なX線ビーム強度変動が観察された(図2a)。この周期は、カメラのフレームレートとSPring-8を周回するバンチのエイリアシングによると解釈される(図2b)。すなわち、SPring-8における電子ビームの周回周期は4.8マイクロ秒であり、29のtrainの周期は145.5ナノ秒である。カメラの各フレーム(768ns)には、trainが5または6個入ることになり、これがフレームごとの強度の違いを生み出していると考えられる。じっさい、カメラの各フレームに210ナノ秒程度の読み出しに伴うデッドタイムがあると仮定すれば、図2aのように観測データをかなり良く説明できることが分かった。ここで仮定する蛍光体(P46)の減衰時間は60ナノ秒である。

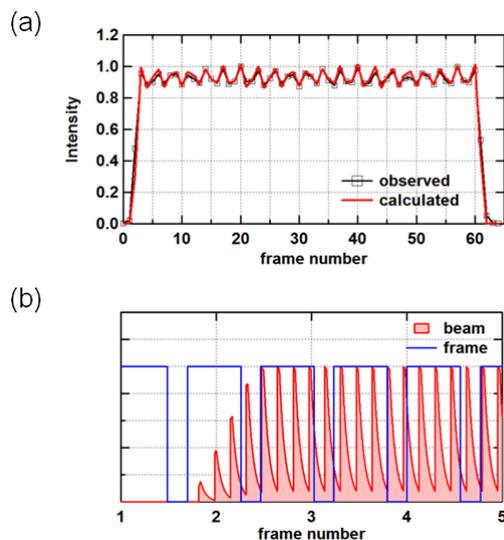


図2 2010ACモードに観察された X 線強度。(a)の黒線は実測したビーム強度を示す。赤線は蛍光体の減衰時間を60ナノ秒、カメラのデッドタイムを210ナノ秒として得られた計算値である。(b)では、青い線がカメラのフレームを示している。実際に画像を記録しているのは768ナノ秒からデッドタイム210ナノ秒を差し引いた558ナノ秒で、主としてこの間に入ったtrainの光が記録されるが、蛍光体の減衰に60ナノ秒かかるため、デッドタイムの間に入ったtrainの光も一緒に記録されている。なお、記録開始の部分ではX線シャッターが完全に開ききるまでに1マイクロ秒近い時間が掛かるため、強度は徐々に増加する。

さらにDモードにおいては、電子が連続して蓄積されている部分を記録しているフレームと、孤立バンチを記録しているフレームとで大きな強度差が見られた。

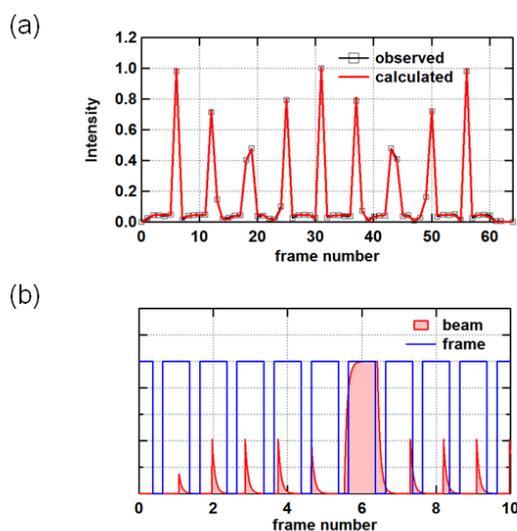


図3 2010A 期DモードにおけるX線ビーム強度。(a)は実測したビーム強度と、計算による予想値。(b)はシミュレーションにおけるX線強度の各フレームへの配分の様子を示す。6フレーム目は、電子が連続的に詰め込まれている1/7周の部分(図1b)に相当し、強いX線が観察される。

カメラのフレーム周期と孤立バンチのずれによって、フレームによっては全くバンチを含まないことがあるが、蛍光体の残光によってデッドタイムの間に入った孤立バンチの強度が尾を引いて記録されるために、強度がゼロとなるフレームは観察されなかった。この解析によって、P46 蛍光体の残光減衰時間が 60 ナノ秒であることが確定的となった。

このように P46 蛍光体の残光時間は 100 ナノ秒以下であり、しかも指数関数的に素直に減衰しており、この蛍光体が高速 X 線強度測定に適していることを示している。これは、P46 が一分子計測法のような高速に回折スポットを追跡する実験や、電場による結晶歪みを回折スポットの微小な動きで検出する場合に有用であることを示している。XFEL のように X 線が強力な繰り返しパルスとして得られる場合にも、残光の蓄積がなく、各パルスで得られた回折像をはっきりと時間的に分離して観察することが可能である。

(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(EBSP)装置を装備した走査電子顕微鏡(SEM)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(DET)を開発する。

Wet Cell 水層中の金ナノ粒子からの EBSP 計測による、金ナノ粒子の「ブラウン運動」の解析
これまでに、SEM 用の“Wet Cell”を開発し、EBSP を利用してカーボン薄膜に固定した金粒子について、カーボン薄膜の移動によって生じた金粒子の EBSP パターンの変化を連続撮影したデータから、結晶方位の変化を計測できることを実証している。最終的なターゲットは生体分子に標識した金粒子の微小運動の EBSP 計測であるが、まず微小運動の計測法を確立するために、水中での水分子の衝突による金粒子の「ブラウン運動」の計測・解析を行った。

Wet Cell の隔膜に分散して付着させ、水と共に密閉した金ナノ単結晶粒子について、加速電圧 30kV、照射ビーム電流値 0.087nA で、ビデオレートでの動的計測用として、シャッター速度 0.03~0.06 秒でのパターン連続撮影による、EBSP 計測を可能としている。隔膜を透過して金粒子に入射した電子線による EBSP パターンの時系列変化から結晶方位の変化を求め、時間間隔に対する方位のずれの大きさの MSD 解析(ブラウン運動の通常解析手法)を行なった。隔膜への金粒子の付着法によって運動の大きさが異なることが予想されるので、カーボン隔膜に直接付着させた場合と、カーボン隔膜にシランカップリング処理を施したうえで付着させた場合について計測した。EBSP による方位の測定精度は 10^{-1} rad である。シランカップリング処理したカーボン膜に付着させた、粒径サイズが 50nm 程度の金粒子について、水中(データ数 149)および真空中(データ数 212)で粒子の動きの大きさを、時系列計測した。NaCl 単結晶上に製作した金粒子を隔膜上に単分散させる方法として、NaCl 単結晶を数mm角に劈開し、隔膜上に滴下した溶解液の上に、金粒子側をのせて表面を溶かし、金粒子を沈ませる方法を用いた。

図 1 に、金粒子の動きの大きさとして、最初の試料法線方向軸からの、各時点での方向軸の回

転角の大きさ ω (rad) を求め、一定の時間間隔に対する $\text{MSD}(\omega^2)$ をプロットした MSD 曲線を示す。EBSP 計測条件は、加速電圧 30kV, 照射ビーム電流値 0.087 nA, シャッター速度 60 ms での、1 粒子あたり 25 ステップの連続撮影である。真空中での MSD の大きさは測定精度である $1 \times 10^{-4}(\text{rad}^2)$ 以下であり、実際には動いていないものと考えられる。一方、水中での MSD 曲線は Directed Diffusion の形であるが、さらにこの曲線を詳細に見ると、動きの大きさにより 2 種類に分類されることが分かった。図 2 に、Time Lag 15 step (0.9 秒後) の MSD の大きさが $5.0 \times 10^{-4} \text{rad}^2$ 以下を“Small”、それ以上を“Large”として分類した動きの MSD 曲線を示す。図 2 から、“Small”は水分子のランダムな衝突によって金粒子が軸の回りにランダムな運動をする“Simple Diffusion”の動きであり、“Large”は金粒子が一方向に傾きながら軸の回りにランダムな運動をする“Directed Diffusion”の動きであることが分かり、金粒子のブラウン運動の計測が可能であることが実証された。さらに、個々の金粒子の運動の大きさは、粒子サイズやシラン層との結合力によっても異なると考えられるので、Time Lag 15 step (0.9 秒後) の MSD の大きさに対するヒストグラムを求めた。図 3 に真空中での運動の大きさ、図 4 に水中での運動の大きさのヒストグラムを示す。真空中では金粒子の動きが無いことから、電子線の衝撃だけでは金粒子は動かないことは明らかであり、水中では水分子の衝突による動きが生じるが、小さな動きと大きな動きが混在していることが明らかである。以上の結果から、SEM で Wet Cell を用いた EBSP 計測により、水中における金ナノ結晶粒子の微小運動を動的に計測することが可能であることを実証した。

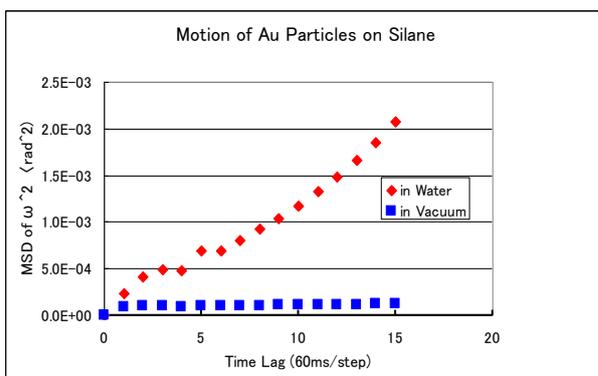


図 1. シランカップリング処理カーボン隔膜に付着させた金ナノ結晶粒子の、水中(データ数 149)および真空中の分類。(データ数 212)における運動の大きさの MSD 曲線。

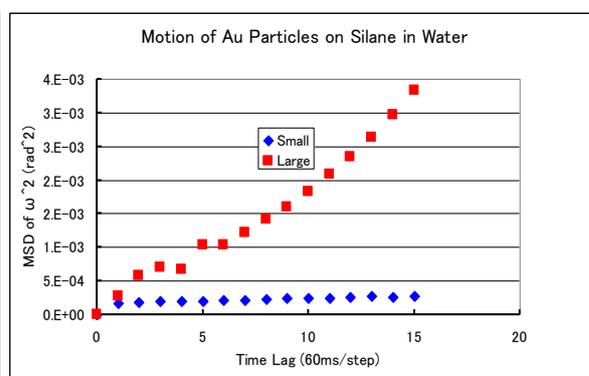


図 2. シランカップリング処理カーボン隔膜に付着させた金ナノ結晶粒子の水中における運動の大きさの分類。

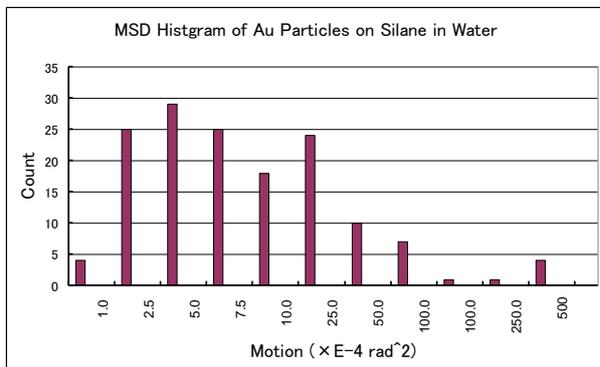


図 3. シランカップリング処理カーボン隔膜に付着させた金ナノ結晶粒子の、真空中における運動の大きさの時間間隔に対するヒストグラム。

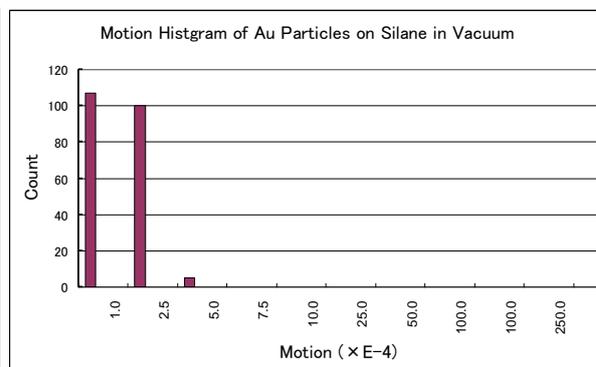


図 4. シランカップリング処理カーボン隔膜に付着させた金ナノ結晶粒子の、水中における運動の大きさの時間間隔に対するヒストグラム。

今後の課題として以下の3点があげられる。

① Wet Cell 内での生体分子への金ナノ粒子の標識方法

生体分子への金ナノ粒子の標識方法について、今回用いた金粒子の標識法では、NaCl の溶液が生体分子にダメージを与える可能性があるため、金粒子が凝集せずに個々の分子を標識できる方法を検討する。また、分子の支持膜と Wet Cell 隔膜との距離を許容範囲内に抑える方法について検討する。

② EBSP 用画像処理の高速化

最終ターゲットである生体分子運動の EBSP 計測では、細く絞った電子線を生体分子には当てず、標識金粒子のみに照射する、原理的に分子への照射ダメージなしに計測する技術を目指している。しかし、金粒子からの散乱電子が分子にダメージを与える可能性があり、電子線照射量を極力減少させる必要がある。これによって生じる EBSP 信号の減少と、ビデオレート高速計測におけるフレームあたり信号量の減少によって生じる EBSP パターンの劣化を補償するため、パターン認識用画像処理の高速化を図る。

(3-4) 金川グループ(東京大学大学院 新領域創成科学研究科)

DXT のデータ解析がまとまった (現在論文投稿中)。ここでは、MHC に結合したペプチドの動きにより影響される T 細胞の活性化の生物学的/医学的重要性に記述する。

細胞性免疫反応の担い手である T 細胞が外来抗原を認識するためには、宿主の主要組織的合抗原 (MHC) が重要な役割を担っているという ZINKERNAGEL AND DOHERTY の発見以来、過去三十年にわたって、多くの免疫学者が莫大な労力と研究費を使ってこの現象の解明を行って来た。それによって、外来抗原は、抗原提示細胞に取り込まれ、この細胞群に特異的な蛋白分解経路を経て抗原由来ペプチドが作製され、其のペプチドが MHC 分子に結合し、ペプチド/MHC 複合体として細胞表面に発現されることが明らかになった。そしてこの複

合体を T 細胞抗原受容体 (TCR) が認識することによって免疫反応が惹起されることも明らかに成り、この反応系に必要な分子もすべて同定され其の結晶構造も明らかに成っている。しかし、生体内で外来の病原体に対して免疫反応が引き起こされるときに、其の反応の強度、持続性、さらには質 (T 細胞の反応がじっさいに病原体の排除につながるのかどうか) がどのように決められているかは、未だに明らかに成っていない。又、T 細胞が自己の抗原に対して反応して自己免疫疾患を起こす時に、自己抗原由来のペプチド/MHC 複合体がどのような機構で T 細胞を活性化するように成るのかも未だに解決されていない。

人の自己免疫性の一型糖尿病の発生において、又マウス、ラットの一型糖尿病モデルにおいても、MHC が最も重要な遺伝因子であることが知られている。我々は、この疾患感受性を決める MHC (人では DQ 2 と DQ 8、マウスでは I-Ag7) が他の MHC に比較して其のペプチド結合性が非常に弱いことを見だし、ペプチド低結合性と糖尿病発症との関係を示唆して来た。又他の自己免疫疾患でも同様の MHC 低結合性ペプチドが疾患の発症に重要であることが示されている。

これらの現象を解明するための研究の過程で、我々は、ある種の T 細胞は、MHC に高親和性のペプチドよりも低親和性のペプチドに $10 - 100$ 倍以上の反応性を示すことを発見した。このことは、低親和性ペプチド/MHC 複合体に特異的な現象があり、それを認識する T 細胞が存在することを示唆していた。

この低親和性ペプチド/MHC 特異的現象を解明するため、我々は、DXT を用いることにより、ペプチドの結合性の差による MHC に結合したペプチドそのもの並びにペプチド/MHC 複合の分子の揺らぎを測定した。これは、T 細胞の抗原認識がペプチド/MHC 複合体の分子の揺らぎにより大きな影響を受けることをしめしている。さらには、低親和性のペプチドほどこの揺らぎが大きく成ることによって、揺らぎのちいさい高親和性のペプチドよりも T 細胞の活性化能力が高まるという従来の概念を一新し、免疫反応の理解を一步進めることになる発見であるといえる。

今後は、自己免疫疾患 (糖尿病並びに多発性硬化症) を惹起する MHC に低親和性の抗原が、自己反応性 T 細胞を活性化するのも分子の揺らぎが関与しているかということ解析する計画である。さらには、病原体 (細菌、ウイルス) 由来の抗原ペプチド/MHC 複合体の揺らぎと、それに対する免疫反応を生体の外来抗原に体する防御反応の見地からも解析する予定である。これらの実験を通じて、低親和性ペプチドと其の MHC 複合体における揺らぎがどのように免疫反応に関与しているかが明らかに成り、それを通じて、自己免疫疾患の病因の解明/感染症のコントロールという臨床的に重要な知見が得られるもの期待している。

ここでは、TCR によるペプチド/MHC 複合体の認識の研究を通じて、分子の揺らぎが免疫反応における蛋白相互作用に重要であるということが明らかに成って来た。他の生物学的な蛋白相互作用においても分子の揺らぎが重要な働きを持っていることは十分考えられることであり、DXT を用いた計測法を導入することにより、今までの構造解析のみでは

説明できなかった現象が理解出来るであろう。

(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)とペプチドの動きが如何に機能と関連してくるか 1 分子反応解析を通して理解することが目的である。MHC は細胞内に存在する抗原のペプチド断片をMHC 分子自体のフォールディングの一部として固く結合し、細胞表面で提示するという役割を持つ。T 細胞はその表面上にある T 細胞受容体(TCR)でそのペプチド/MHC 複合体を認識し、獲得免疫応答を開始する。TCRとペプチド/MHC 複合体の相互作用は、抗体-抗原反応に比較すると非常に弱い、抗原特異的であることも解っている。この相互作用の有無により異物であるウイルスや細菌が排除される。MHC 分子は自己のタンパク質由来のペプチドも結合するため自己免疫疾患も起こしうる。故にその制御はがん細胞の排除や免疫疾患の予防等に欠かせないものである。MHC 分子の生物学的重要性またタンパク質としての面白さ故に物理化学的解析の対象でもある。しかしながら、結晶解析や Biacore による解析で解明できない現象が多々ある。我々がこの研究で取り組んでいる問題の一つは、MHC に弱く結合するペプチドが如何に特定の T 細胞を活性化するかということであり、一つは MHC が如何にペプチドを獲得するかということである。

ここ数年の金川グループとの共同研究により①ペプチドと MHC が独立に運動することを見出した。上に述べたように、ペプチドは MHC のフォールディングの一部であるとそれまで考えられていたため、驚愕すべき発見であるといえる。また、②小さいペプチドが MHC の動き自体も規定していることが解った。③MHC の SDS-stability の獲得という現象がペプチド/MHC の動きの大きさと関連することが解った。これは、MHC が安定にペプチドを獲得した時の指標として簡便性ゆえに広く用いられている方法であるがその原理は明らかでなかった。この測定がその理解を大きく進めたと言って過言ではない。④ペプチドの収容溝内での回転する動きが特定の T 細胞群の活性化の要因であることが推察できた。⑤また、ペプチドの違いによって収容溝内で拘束された運動を示すものと、自由な運動をするものに分けられることが解った。

本年度は、これらの結果をもとに、ペプチド運動の経時変化を追った。通常、ペプチドの交換反応は pH を低くして 16 時間程度インキュベートした後、pH を中性に戻すことによって行う。その後の時間経過は、あまり関係ないと考えられていた。しかしながら、最近 typeB T 細胞という比較的弱く結合したペプチド/MHC 複合体を認識する T 細胞の一部は経時的にその反応性を失っていくという報告が出た。つまり、その T 細胞の認識するリガンドの形が変化していくことを意味するものである。そこで DXT でその変化を追うと、短いペプチドを結合した HEL52-61/I-A^k 複合体でも長いペプチドを結合した HEL48-61D52A/I-A^k 複合体でも経時的にペプチドの運動が小さくなっていくことが解った。特に長いペプチドを結合した HEL48-61D52A/I-A^k 複合体でその傾向が顕著であった。このことは T 細胞活性化という生物学的特性が DXT によるペプチドの動きの測定結果と一致しうることを意味する。

次に、自己免疫に深くかかわる MHC である I-A^{g7} でペプチドの動きを追った。今年になって初

めて1型糖尿病の原因ペプチドが報告されたからである。我々はそれらのペプチドの特性が上に述べたものとどのように連関するか解析を試みた。その結果、インキュベーション時間が1日のものではすべてのペプチドが非常によく動いており、顕著な違いは見られなかった。しかしながら7日間インキュベートするとその動きが少なくなり、 χ 方向の動きが大きいもの

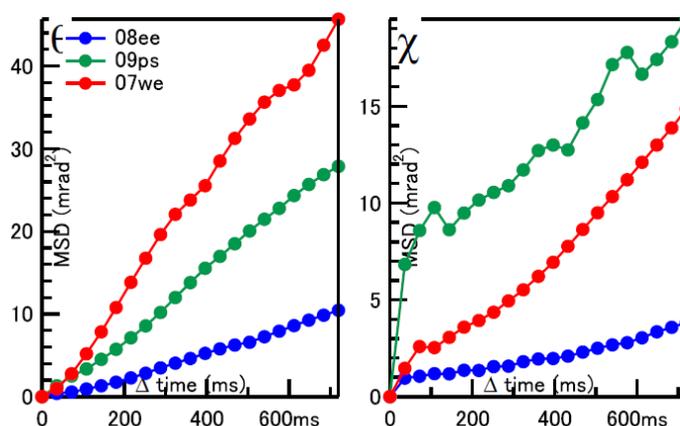


図1. I-Ag7に結合した糖尿病誘起性のペプチドとコントロールペプチドのMSD曲線 7日後はT細胞を活性化できないペプチド(08ee)の動きが小さくなった。

がよく活性化するという上記 I-A^kと同じ結果が出てきた(図1)。また、動きのヒストグラムをとってみると。 θ 方向では720msでセンターから外れてピークが現れた(図2)。このことは、ペプチド構造に準安定状態があることを示唆している。また、ペプチドとMHCのインキュベーション時間でペプチドの動きが大きく変化することは、上記 I-A^kでの発見が普遍的であることを示唆している。

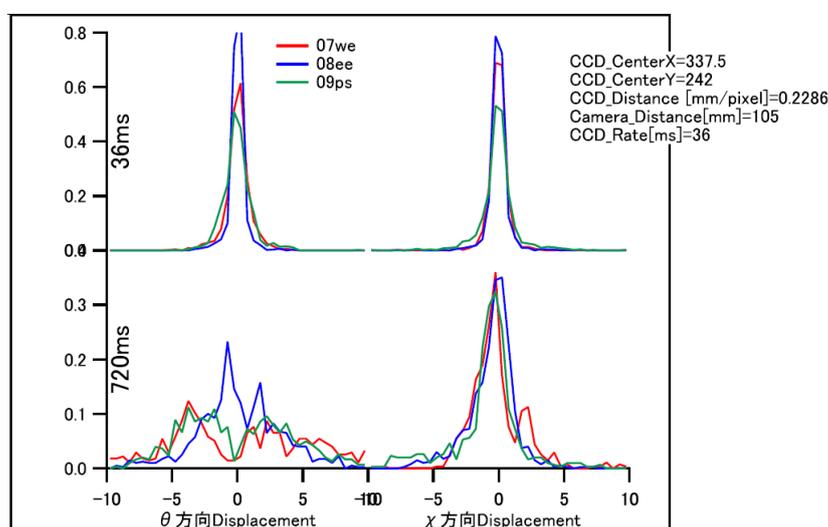


図2. I-Ag7に結合したペプチドの動きのタイムヒストグラム T細胞を活性化するペプチドのみが θ 方向で起点以外にピークがみられる。

(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Na⁺やK⁺のカチオンを細胞内に透過して細胞の電気的興奮性を変える。nAChRは神経における情報伝達の中心的な役割を担い、またシビレエイ発電器官に局在発現しているため、タンパク質レベルでの特性解析や生理生化学的・薬理学的研究が膜受容体の中では先行している。一方、膜受容体とリガンドの相互作用に関する分子動態については、解離・会合過程の速度論的解析や熱力学的解析はあるものの、構造の動的変化については既存の技術で捉えることは困難であるため未だ解明が進んでいない。そこで本研究では、研究代表者である佐々木が長年培ってきた放射光由来のX線を利用した1分子計測技術(DXT)を利用して、nAChR

とアセチルコリンなどのリガンドとの相互作用に伴う受容体の分子動態を明らかにする。最終的にはこの分子挙動の変化と機能変化との関連性を解明することを目的としている。

nAChR は 4 回膜貫通型のイオンチャネル受容体で、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アセチルコリンなどのリガンドとの結合に関与する。我々は、海産軟体動物アメフラシ (*Aplysia kurodai*) 中枢神経系より nAChR のこの細胞外ドメインと相同性のあるタンパク質を同定した (投稿準備中)。Sigma からは独立にヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) から同定し、それをアセチルコリン結合タンパク質 (Acetylcholine Binding Protein, AChBP) と命名した。AChBP は神経系 nAChR (alpha 7) とアミノ酸配列の相同性が高く、両者は同様のリガンド選択性を示す。また nAChR と同様にサブユニットが 5 個会合して機能することを確認している (図 1)。そのため、AChBP にリガンドが結合したときに起こる構造変化は、受容体 nAChR にリガンドが結合しイオンチャネルが開くまでの分子動態を解析する上で、細胞外領域での変化を解析するモデルシステムになると考えられる。

そこで、本研究ではまず AChBP の N 末端および C 末端をそれぞれ 6 x His tag (H_6) あるいは Strep tag (St) で修飾した H_6 -AChBP-St と St-AChBP- H_6 の 2 種類のコンストラクトのタンパク質を調製した。AChBP は H_6 を介して基板に固定し、Strep tag を介して金ナノ結晶を AChBP に固定した (図 2)。この試料に X 線を照射して得られる回折点の動きを計測することにより AChBP の

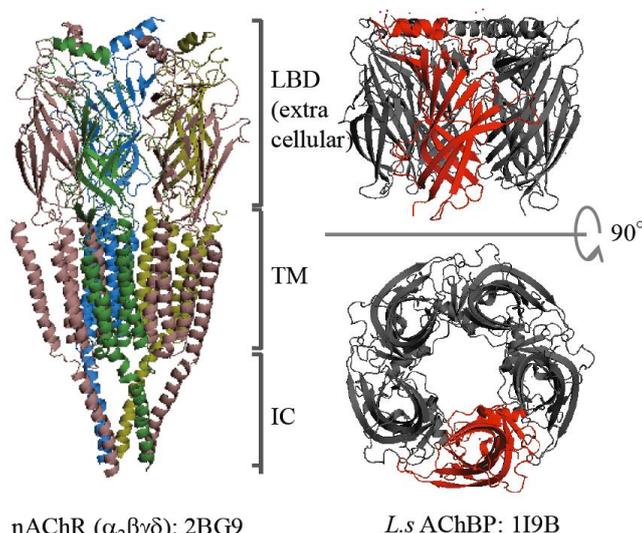


図1. ニコチン性アセチルコリン受容体とアセチルコリン結合タンパク質の構造モデル

水溶液中での数秒間の分子運動をサブ ms 時分解で計測する。これをリガンドの有無によって分子挙動がどのように変化するかを計測した。さらに今年度は、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いてアセチルコリン ACh の存在・非存在に依存した AChBP の剛性に関する計測を行っ

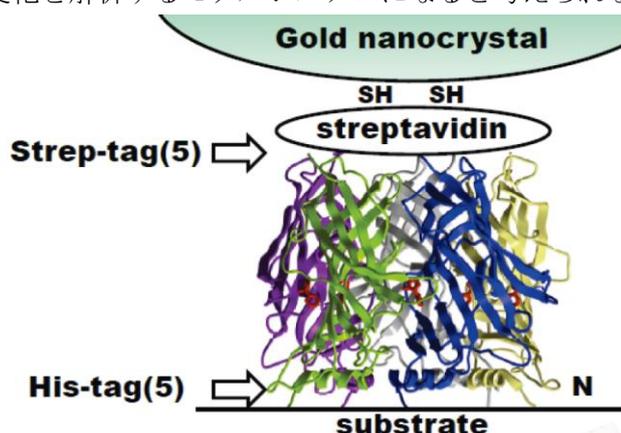


図2. 金ナノ結晶標識したAChBP試料のガラス基板上の結合模式図 (N末端)His tag-AChBP-Strep tag(C末端)の例を示す

た。

結果は以下の通りである。(1) 高輝度 X 線による回折点の動きを解析した結果、アセチルコリン存在下で半径 (θ) 方向および円周 (χ) 方向への運動が有意に増加していることが判明した (図 3、赤点)。一方、nAChR のブロッカーとして知られる α -bungarotoxin (α -BgTx) 存在下では、 θ 方向の運動の増加が認められるが χ 方向の運動はフリー状態とあまり変わらないことが判明した (図 3、緑点)。

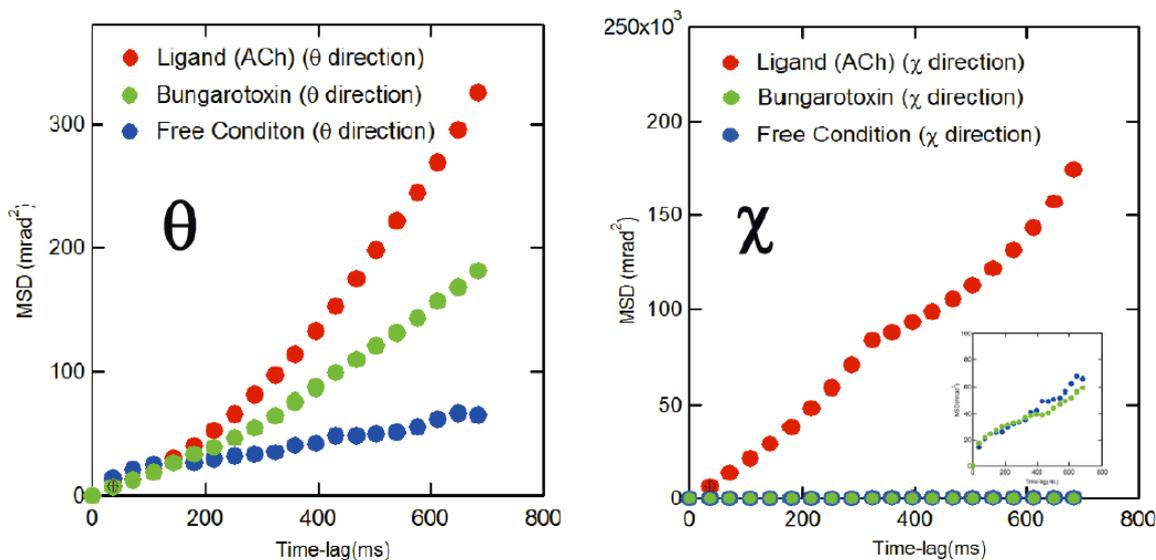


図3. X線回折点の半径(θ)方向および円周(χ)方向運動の解析
リガンド無し(青点)あるいはアセチルコリン(赤点)やブンガロトキシン(緑点)存在下での輝点運動解析

(2) 劈開したマイカ表面に AChBP を吸着させ、アセチルコリンの存在/非存在下での AFM 画像を解析した。その結果、アセチルコリン非存在下で AChBP の高さが 5.0 ± 1.2 nm に対して、1 mM アセチルコリン存在下ではそれが 4.5 ± 1.1 nm に変化した。また、マイカ基板に播いた AChBP に対して AFM 探針による押し込み応力測定を行った結果、AChBP はアセチルコリン存在下では非存在下に比べてヤング率が低くなることが判明した。

(1) の結果から、AChBP はアセチルコリンとの結合によって分子摂動が半径及び円周両方向ともに激しくなったことが示唆される。この結果は、AFM で直接 AChBP の形状及び弾性を計測した (2) の結果とも呼応する。即ち、分子の摂動が激しくなることにより AChBP 分子の統計的な容量の減少とタンパク質分子が柔らかくなる現象が観察されたと解釈される。従来、受容体にリガンドが結合するとその強固な相互作用により分子運動がむしろ制限されることが知られているが、今回 AChBP で見られたような相互作用形態は今までに報告は無い。

nAChR では、この細胞外ドメインでの摂動が膜貫通領域を構築する分子構造にも連動することが想定される。即ち、リガンドが無い状態では、主に 2 番目の膜貫通領域 (M2) で構

成される疎水性フィルターにより水和イオンが透過しにくい状態にあるが、agonist の結合により分子内運動が惹起されて疎水性フィルターが緩み、チャンネルの開口確率を高めていることが考えられる。今後は、nAChR のリガンド結合領域でのこの激しい摂動が、膜貫通領域に伝搬してチャンネルポアを確率的に広げるという作業仮説の検証を進める。

さらに、AChBP に替えて nAChR を用いて同様に計測を行う。そのためには、シビレエイ発電器官からの精製や変異を導入した nAChR を適宜 *in vitro* 系で発現したものを調製する。リガンド結合部位を含む細胞外ドメインに加えて膜貫通領域と細胞内ドメインを持つ nAChR の全体を用いた計測により、リガンド結合に伴う細胞外ドメイン構造の変化とそれに伴うチャンネル構成領域の構造変化も観察する。

期待される成果としては、神経伝達物質とその受容体との相互作用に関する研究は、物理化学的な手法により古くから多くの研究者により研究されてきた。しかしながらリガンドと結合もしくは結合過程にある膜受容体の構造が解明されていないため、本課題は従来の研究とは大きく異なる。nAChR におけるこの分子動態の解明は、nAChR と類似性の高いセロトニン受容体、グリシン受容体、GABA 受容体、等のイオンチャンネル型受容体全般に演繹できると考えられる。またこれらの受容体は神経系疾患などを対象とする創薬の標的分子となっており、低分子薬デザインのための重要な構造知見を提供することが期待される。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

(1) C. Lesoil, T. Nonaka, H. Sekiguchi, T. Osada, M. Miyata, R. Afrin, and A. Ikai, "Molecular shape and binding force of Mycoplasma mobile's leg protein Gli349 revealed by an AFM study ", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391:1312-1317 (2010).

(2) Matsuo, T., H. Iwamoto and N. Yagi. "Monitoring The Structural Behavior of Troponin and The Myoplasmic Free Ca²⁺ Concentration During Twitch of Frog Skeletal Muscle." *Biophys. J.* 99, 193-200, 2010 (doi: 10.1016/j.bpj.2010.04.021).

(3) Ota N, Takase M, Uchiyama H, Olsen SK, Kanagawa O. No requirement of trans presentations of IL-15 for human CD8 T cell proliferation. *J Immunol.* 2010 Nov 15;185(10):6041-8.

(4) Aiba Y, Kometani K, Hamadate M, Moriyama S, Sakaue-Sawano A, Tomura M, Luche H, Fehling HJ, Casellas R, Kanagawa O, Miyawaki A, Kurosaki T. Preferential localization of IgG memory B cells adjacent to contracted germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jul 6;107(27):12192-7.

(5) Tomura M, Itoh K, Kanagawa O. Naive CD4⁺ T lymphocytes circulate through lymphoid organs to interact with endogenous antigens and upregulate their function.

J Immunol. 2010 May 1;184(9):4646-53.

(6) Fagarasan S, Kawamoto S, Kanagawa O, Suzuki K. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu Rev Immunol.* 2010 Mar;28:243-73.

(7) Shimura E, Hozumi N, Kanagawa O, Metzger D, Chambon P, Radtke F, Hirose S, Nakano N. Epidermal gammadelta T cells sense precancerous cellular dysregulation and initiate immune responses. *Int Immunol.* 2010 Apr;22(4):329-40.

(8) Tomura M, Honda T, Tanizaki H, Otsuka A, Egawa G, Tokura Y, Waldmann H, Hori S, Cyster JG, Watanabe T, Miyachi Y, Kanagawa O, Kabashima K. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest.* 2010 Mar 1;120(3):883-93.

(9) Yassaka, R.T., Inagaki, H., Fujino, T., Nakatani, K., & Kubo, T. "Enhanced activation of the transient receptor potential channel TRPA1 by ajoene, an allicin derivative." *Neuroscience Research* 66: 99-105 (2010)

(10) Hirabayashi, M., Ohashi, H., & Kubo, T. "Design of bio-inspired multi-stage regulations for diagnostic molecular automata." *J. Computational and Theoretical Nanoscience* 7: 831-839 (2010)

(11) Inagaki, H., Yamauchi, Y., Toriba, M., & Kubo, T. "Regional divergence of phospholipase A2-like protein cDNAs between New Guinean and Australian *Pseudechis australis*." *Toxicon* 56: 637-639 (2010)

(12) H. Ichikawa, S. Nozawa, T. Sato, A. Tomita, K. Ichiyonagi, M. Chollet, L. Guerin, N. Dean, A. Cavalleri, S. Adachi, T. Arima, H. Sawa, Y. Ogimoto, M. Nakamura, R. Tamaki, K. Miyano, and S. Koshihara, "Transient photoinduced 'hidden' phase in a manganite", *Nature Materials* (in press).

(13) N. Yagi. Mechanism Of Latency Relaxation In Frog Skeletal Muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* (in press)

(14) N. Yagi. A Scanning SAXS/WAXS Study of Rat Brain. *J. Physics: Conference Series* (in press)

(15) N. Ogawa, H. Kozono, M. Takase, N. Ohta, H. Sekiguchi, Y. C. Sasaki, O. Kanagawa: (2010) Role of dynamic motion of peptide/MHC complex for T cell activation. Submitted.

(16) Naimuddin, M., Kobayashi, S., Tsutsui, C., Machida, M., Nemoto, N., Sakai, T., & Kubo, T. "Directed evolution of a three-finger neurotoxin by using cDNA display yields antagonists as well as agonists of interleukin-6 receptor signaling." *Molecular Brain*, in press

(4-2) 知財出願

① 平成22年度特許出願件数(国内 0件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 0件)