

解 説

X線を用いた1分子計測法

佐々木裕次

(受取日: 2005年5月16日, 受理日: 2005年5月23日)

Single Molecular Observations Using X-rays

Yuji C. Sasaki

(Received May 16, 2005; Accepted May 23, 2005)

Recently, we succeeded *in vitro* time-resolved x-ray observations of picometer-scale slow Brownian motions of individual protein molecules in aqueous solutions. In this new single molecular detection system, which we call Diffracted X-ray Tracking (DXT), we observed the rotating motions of an individual nanocrystal, which is linked to the specific site in individual protein molecules. Therefore, DXT can monitor dynamics of the individual molecules or specific sites in individual single protein molecules. Now, we observed individual DNA molecules, myosin head molecules, denatured proteins, protein membranes.

1. はじめに

機能性生体高分子は、生体内において多くの機能を司っている。生命活動を維持するこれらの機能は、基本的には1分子及び超分子と呼ばれる局部的及び一時的1分子集合体が関与している。これらの機能発現メカニズムを詳細に解析するためには、機能性1分子の動的挙動の詳細情報が必要となる。しかしながら、今までの発現メカニズム解析のために行われてきた多くの計測手段では、実際多分子系を扱って解析を進める場合が多い。それでいて考察段階になると、1分子の振る舞いに還元した状態で解釈が進められる。一般的に、強制的に同調させることが出来る系は別にして、多分子系計測からは分子の平均化された情報以外を取得することは不可能である。機能発現を含むであろう1分子の動的挙動を1分子レベルで詳細に理解することは、1分子計測の情報からでなければ無理である。このような単純な理由から1分子計測法は現在注目されている。現状多くの計測法は、可視領域の波長帯をプローブに用いた計測手段が主な方法論となっている。

ここで紹介するX線1分子計測法は、上記のような可視光(300 nm ~ 800 nm)を用いた1分子検出法ではなく、それよりも波長が千分の1程度短いX線領域の光(2 nm ~ 0.01 nm)を用いる。その利点は極めて高精度に分子内運動を実時間モニターできる点にある。可視光で1分子の動きを見る方法は、ビデオエンハンス法¹⁾等の利用もあって、可視光の波長域を用いていても数nmの精度で分子運動がモニターできる。例えば、1分子蛍光共鳴エネルギー移動法は蛍光分子の選択にもよるが、1 nm以下の分子内移動距離を計測できる可能性がある。^{1,2)}しかし、生体分子内部の構造変化をモニターしようとなると、多くのタンパク質分子が10 nm程度の大きさがあると考え、その十分の一である1 nm動くというのはかなり大きな運動となる。内部運動を正確にモニターしようとするならば、その一桁下の精度は必要となる。そこでX線を用いた新規な計測手段が必要だと考えた。後述するがX線1分子計測の位置決定精度は1 pmレベルである。つまり、0.001 nmの測定精度が現実のものとなった。正確な理論式ではないが、波長 λ とすると1分子計測の位置決定精度は、 $\sim \lambda/100$ まで可能である。³⁾可

X 線を用いた1分子計測法

視光領域が300 ~ 800 nm とすると数nm の位置決定精度は合点がいく。これをX 線の波長 ($\lambda = 0.01 \text{ nm}$) に置き換えて考えると、論理的にもpm オーダーの位置決定精度が出る。このようにして、可視光を利用した計測方法の限界を認識し、分子内構造変化情報の重要性を考えて、X 線1分子計測は登場した。^{4,5)}

2. X 線を用いた1分子内運動計測

実時間計測が可能な高速1分子計測法で位置決定精度pmレベルが実現すれば、タンパク質分子の分子内運動が正確にモニターでき、機能発現に伴う微小な構造変化情報が実時間で得られる。しかし、多くの研究者は、X 線を用いて1分子を検出できるのかという疑問を持つ。物質と電磁波との散乱断面積の大きさは、波長に比例するという常識からの疑問である。無論、X 線の発光、吸収、散乱現象を用いて1分子を直接的に検出することは第三世代大型放射光施設を用いて数時間の積算をしたとしても難しい。私は、X 線の物理現象で一番高感度な現象、つまりX 線回折を利用した、時分割回折X 線追跡法 (Diffracted X-ray Tracking: DXT) が1分子検出の可能性があると考えた。X 線1分子計測法のアイデアは単純である (Fig.1)。直径数十nm 程度のナノ結晶をタンパク質分子に分子機能を損なわないように標識する。そして、ナノ結晶からのラウエ斑点を指標に、着目したタンパク質分子の動きを時分割 (ms 程度) 的に追跡する。Fig.1には、目的1分子ユニットの一部に構造変化があると、その部位に標識されているナノ結晶がその構造変化と同期して変位し、ナノ結晶からのラウエ回折斑点の方向を変化させるという例を示している。ここで注意しなければならないのは、検出しているのは標識されたナノ結晶の方位であり、分子自身の方位や並進運動ではない。従って、ここでは、ナノ結晶の運動とナノ結晶が標識された分子内部 (被標識部位) が同期した運動をしているということが大前提となる。これは、ナノ結晶と被標識部位の距離、結合状態に依存すると予想される。この前提の検証は各条件下で計測して行なう。現在までの実験結果から、比較的広い条件下でこの前提は成立していることが分かっている。

Fig.1のようなX 線1分子計測を成功させるためには、三つの技術的躍進があった。一つめは生体1分子ユニットのソフトな基板固定、次に1分子に対して1ナノ結晶を1対1に標識する方法、そして最後に標識に用いる良質ナノ結晶の作製法の確立である。ここでは固定法と良質ナノ結晶の作製法について述べる。

基板への固定法については、自由に水溶液中を拡散運動している分子にナノ結晶を標識しても、現在の放射光のフラックス量ではナノ結晶からのX 線回折斑点を効率良く実

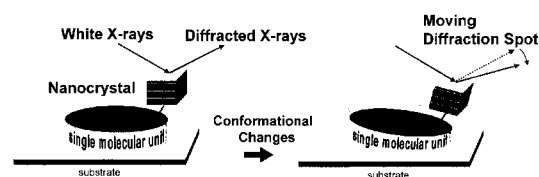


Fig.1 Schematic drawing of the single molecular detection system using x-rays (not to scale). Diffracted X-ray Tracking (DXT) monitors the behavior of a single special domain with the guidance of diffraction spots from the nanocrystal which is tightly coupled to the special domain. In DXT, we directly monitor the rotating motions of the labeled nanocrystal.

時間測定することはできない。従って、X 線を非常に良く透過する厚さ70 μm の石英基板上に生体分子をソフトに化学固定している。固定法はいくつかの方法が開発されている。^{6,7)} 典型的な例としては、末端部分 (N末端やC末端) に活性なSH基やHis-tag基などを遺伝子導入することなどがある。正確な配向性を必要としない系の場合は、二価性試薬を用いて生体分子内のアミノ基などの非特異的固定残基を介して基板固定する場合もある。基板固定で注意する点は、目的分子と基板表面の間を直接接触させない程度に基板修飾分子で空間を開ける事である。直接結合させることでタンパク質分子自身の構造に歪みが入り、分子機能が劣化することが多く報告されている。しかし、空けすぎると極端な言い方をすれば、水溶液中に存在している時の自由運動と同様の運動をすることになるので、計測不可能となる。上記空間は目的分子や固定する残基位置に依存して異なる。また、ここで注意する点は、この固定法がX 線1分子計測法の必須条件ではないと言う事である。検出されるX 線回折斑点の感度が向上すれば、より高速の計測が可能となり、水溶液中を浮遊している分子の分子内運動も計測できる。実際に、非常に粘性の高い有機溶媒中でかつ低温状態にした場合、その溶媒に分散された全く自由なナノ結晶のブラウン運動が計測できることは確認されている。

次に良質ナノ結晶の作製法について説明する。最初にX 線1分子計測の実験に用いたナノ結晶は、サイズが非常に揃っている市販された金コロイドであった。金コロイドは免疫電子顕微鏡等でかなり利用されているナノ結晶で、ナノ結晶自身の格子像も確認されており、比較的結晶性が良いと考えられていた。しかし実際にSPring-8を用いてラウエ回折を計測してみると、金コロイドから回折斑点はほとんど得ることができなかった。従って、ナノレベルの良質結晶体を作製するしかなかった。

より良質の結晶を作製すべく、一次元及び三次元結晶の

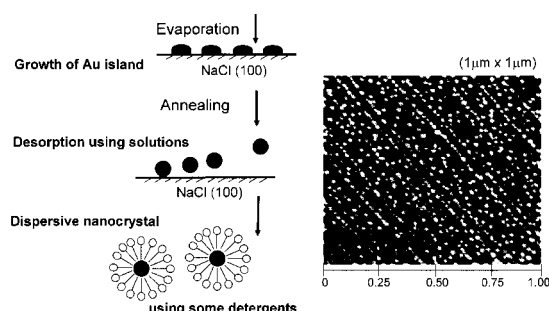


Fig.2 We used gold nanocrystals (thickness = 10nm) fabricated by vacuum-evaporation on NaCl (100) surface at 800 °C for 5 min. The gold nanocrystals were separated from a NaCl substrate (10 × 10 × 1 mm) by the solution (50 mM Tris/HCl, pH = 8.0) containing some detergents. We confirmed that the diameter of a gold nanocrystal is 20 ~ 30 nm by Scanning Electron Microscope, Atomic Force Microscope, and Dynamic Light Scattering. The AFM image of the annealed gold nanocrystals is shown.

自作を行なった。主に二つの方法を考案した。一つめはX線の反射鏡に使用されている多層膜 (Mo/Si 系) をナノレベルのドライエッチングにより切り出した多層膜ナノ粒子である。最終的に基板から多層膜粒子を切り離さなければならぬ。結果的に高反射率な直径 30 nm の多層膜粒子の作製に成功した。⁸⁾

二つめの方法は、結晶性良質薄膜作製において利用されている現象、エピタキシャル成長を用いた方法である。⁹⁾ 単結晶 NaCl (100) 基板面上に連続膜になる前段階の状態まで金を 0.01 Å/s 程度でゆっくり真空蒸着する。そうすると金は不連続膜 (アイランド) 状態でエピタキシャル成長する。金結晶が成長している間、基板の温度は 375 °C 付近に保持しておく。膜厚 10 nm で直径 20 ~ 30 nm の金ナノ結晶が完成する。

しかし問題点があった。この金ナノ結晶や先の多層膜ナノ粒子はいずれも真空中で作製したので、これらの結晶を水溶液で使用するために基板から剥離させると、一瞬にして凝集が開始し、その後の 1 分子への標識反応などは不可能であった。そこで、その凝集の原因であるナノ結晶表面の疎水性を親水性に変えるために界面活性剤を比較的高濃度 (10 ~ 50 mM) 添加して安定なナノ結晶含有水溶液とした (Fig.2)。この界面活性剤自身がこの後の生体分子との反応効率に影響しないことは確認済みである。

この NaCl 基板上でのエピタキシャル成長工程において重要な因子は、今までの実験結果より以下の 4 点が明確に

なっている。蒸着時の蒸着速度、蒸着時の基板温度、アニーリング温度、アニーリング時の圧力である。

は無機材料的な発想からすぐに理解できるが、は予想できなかった。当初は、蒸着した後すぐに 800 °C 前後のアニーリング温度へ昇温させた。そうすると蒸着したはずの金薄膜 (紫色) が全く基板上に存在しなかった。NaCl が真空中で高温にさらされたために昇華されたのだ。基板表面の NaCl が昇華してしまえば、その上に存在していた Au は剥がれてしまう。それで、一度真空状態から出して、別のアニーリング装置内で再加熱を行うことにした。現状は数 MPa 程度にしか加圧できないが、アニーリング温度と加圧は明らかに正の関係があり、アニーリング後のナノ結晶の粒径は、それほどこの圧力の影響を大きく受けないことが分かってきた。これらの実験結果より、より小さな粒径でかつ完全な良質ナノ結晶を作製するためには、最初の蒸着時に、より小さいアイランド状態を形成させ、再加熱アニーリング時には、高压状態で NaCl の昇華をできるだけ減らした状態で高温処理することが重要であると分かってきた。ナノ結晶の作製法は、本 1 分子計測の心臓部と言えるので、今後も新しい作製法を検討していく予定である。

3. 機能性膜タンパク質分子の 1 分子実測例

本計測方法の最終的な目標は、細胞内で実際に機能している状態のままで構造変化をモニターする *in vivo* 計測である。そこで、より *in vivo* に近い状態で機能性タンパク質分子の機能発現に伴う 1 分子動的挙動計測を試みた。¹⁰⁾ 今回のサンプルは光反応系の代表的な膜タンパク質分子、Bacteriorhodopsin (bR) である。bR は分子内に有するレチナール分子が特定波長 (568 nm) を吸収し異性化することで、プロトンポンプとしての機能を発現する。本実験では、bR1 分子の特定部位 (アミノ酸 35 残基目) に SH を導入した変異体を用いて、アミノ酸 35 残基が存在する A-B ループ部位に、そこから少し距離のある部位に位置するレチナール分子の光励起に伴う構造変化がどのように伝達されるかを計測した (Fig.3)。

従来の bR の構造変化計測は、レチナール部位が赤外及び可視域の吸収帯を持っているために、分光学的な考察から構造変化を推測してきた。その後、多くの状態における bR 立体構造解析が行われ、その構造比較より、分子全体に渡る構造変化がかなり詳細に分かってきた。しかし、立体構造を決定している場合は、3 次元結晶構造状態であり、bR が生理条件下で存在する紫膜内での構造変化とは異なるのではないかという疑問は残る。ここでの実験は、その疑問に回答を与えるサンプル条件に近いかもしれない。

Fig.3 のようにこの bR 実験では、立体構造を正常な状態に維持して実験を行えるように、2 次元配向した天然の生

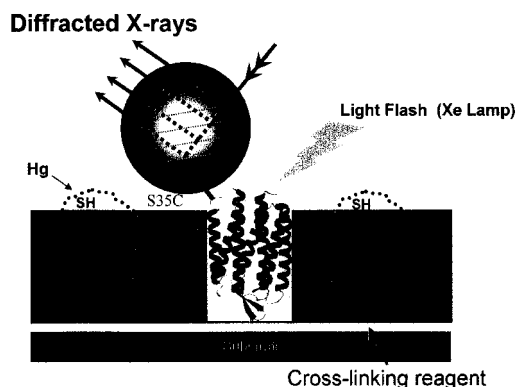


Fig.3 Schematic drawing of the cross-sectional view of DXT in the case of BR S35C. DXT monitors the spots of diffracted x-rays from individual nanocrystals that are tightly labeled with individual BR S35C. Samples containing the immobilized BR S35C were filled with the oxygen scavenger system (25 mM glucose, 14 mM 2-mercaptoethanol, 10 nM catalase and 2.5 μ M glucose oxidase) in 50 mM MOPS (pH 7.0). The ratio of BR molecules to nanocrystals to be one to one is able to be realized because Hg compound (PCMB) first labelled with excess sulfhydryl groups in BR S35C.

体膜、つまり紫膜自身を基板に一方から固定し、SH基を導入した変異体を使用して、金ナノ結晶をそのSH部位に標識した。Fig.3でわかるように最密充填状態のbRとナノ結晶を1対1の比で標識するために、余分なSH基を水銀化合物でつづした。水銀化合物の反応時間は、1～3時間の間でナノ結晶からの回折斑点数を計測することで決定した。反応時間3時間では、全く回折斑点が検出されなかったことより、2.5時間程度の反応時間とした。確認のために水銀化合物を反応させない条件でも実験を行った。

Fig.4に示すように、水銀化合物を2時間反応させた結果では、560 nmの可視光を数 μ s照射した場合、回折斑点は 14.6 ± 9.7 mrad (70点の回折斑点からの平均値)のジャンプを示すことが分かった。これは標識されているA-Bループが剛体として運動したとすると、 0.73 ± 0.48 の変換に換算できる。つまりこの数値は、統計処理した結果においてもX線1分子計測によって1以下の構造変化が測定できたことになる。換算過程において剛体的運動は仮定しているが、X線1分子計測の驚異的な運動検出精度を示すことはできた。確認実験として、560 nmの可視光以外の波長(例えば、400 nmや700 nm)では、このジャンプを示すことがないことも確認することができた。

このように、膜タンパク質分子の運動計測にX線1分子計測法が有効であることを示すことができた。今後、レチ

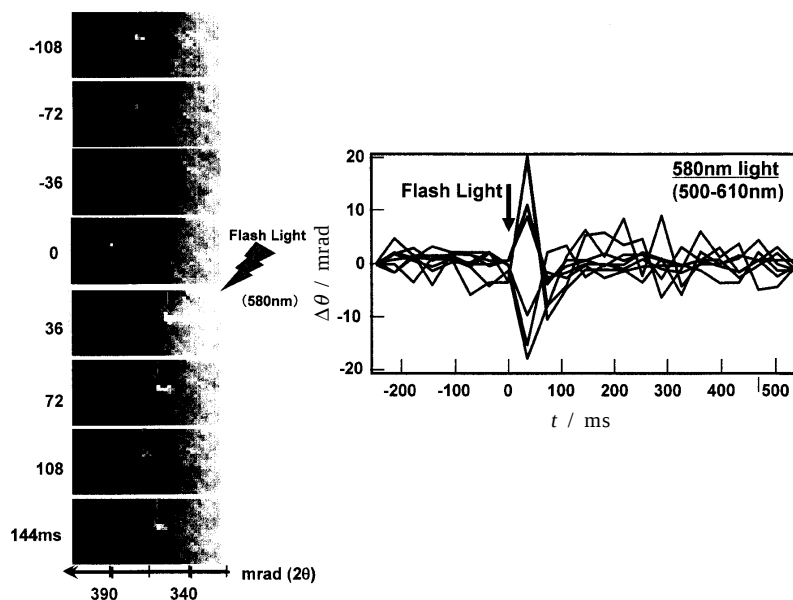


Fig.4 Examples of the diffracted spots from the single Si/Mo nanocrystal which is linked to the adsorbed DNA molecules in aqueous solutions appeared as brightly shining dots (white-blue). Frames are spaced at 180-ms intervals. The total observation time was 1 s. Displacement of θ ($\Delta\theta_{570}$ and $\Delta\theta_{400}$) of observed diffracted spots with ~ 570 -nm and ~ 400 -nm lights.

ナールタンパク質,つまりGタンパク質共役型レセプターや,Kチャンネル,Caチャンネル等の重要なチャンネルタンパク質系の運動情報を実際に計測し, *in vivo* でもそれらの運動を以下精度で実時間高速計測できることを示し,機能性生体高分子の発現メカニズム解析に貢献していきたい。

文 献

- 1) A. Ishijima, H. Kojima, T. Funatsu, M. Tokunaga, H. Higuchi, H. Tanaka, and T. Yanagida, *Cell* **92**[2], 161 (1998).
- 2) B. J. Schnapp, R. D. Vale, M. P. Sheetz, and T. S. Reese, *Cell* **40**, 455-462 (1985).
- 3) S. Weiss, *Science* **283**, 1676 (1999).
- 4) Y. C. Sasaki, Y. Suzuki, N. Yagi, S. Adachi, M. Ishibashi, H. Suda, K. Toyota, and M. Yanagihara, *Phys. Rev. E* **62**, 3843 (2000).
- 5) Y. C. Sasaki, Y. Okumura, S. Adachi, H. Suda, Y. Taniguchi, and N. Yagi, *Phys. Rev. Lett.* **87**, 248102/1 (2001).
- 6) Y. C. Sasaki, Y. Suzuki, and T. Ishibashi, *Science* **263**, 62 (1994).
- 7) Y. C. Sasaki, K. Yasuda, Y. Suzuki, T. Ishibashi, I. Satoh, Y. Fujiki, and S. Ishiwata, *Biophys. J.* **72**, 1842 (1997).
- 8) Y. Okumura, Y. Taniguchi, and Y. C. Sasaki, *J. Appl. Phys.* **92**, 7469 (2002).
- 9) Y. Okumura, T. Miyazaki, Y. Taniguchi, Y. C. Sasaki, *Thin Solid Films* **471**, 91 (2005).

- 10) Y. Okumura, T. Oka, M. Kataoka, Y. Taniguchi, Y. C. Sasaki, *Phys. Rev. E*, **70**, 021917/1 (2004).

要 旨

ナノメートルの千分の一のスケールであるピコメートルのレベルでの動的1分子観察に時分割的X線計測を用いて成功した。この全く新しいX線1分子計測法, Diffracted X-ray Tracking (DXT, 回折X線追跡法)は, 計測目的の生体1分子の特定部位に標識されたナノ結晶の回転運動を計測する。そのナノ結晶は, 生体1分子の特定部位に1個だけ標識できるので, 一つのナノ結晶の回転運動を通して, 生体1分子の動的情報を得ることができる。これまで, DNA分子, ミオシン系分子, 変性状態の生体分子, そして膜タンパク質分子の計測に成功した。

佐々木裕次 Yuji C. Sasaki
 (財)高輝度光科学研究センター & 科学技術振興機構 戦略的基礎研究推進事業
 佐々木チーム, SPring-8/JASRI & JST/CREST (Sasaki-Team)
 e-mail: ycsasaki@spring8.or.jp
 研究テーマ: 全く新しい計測方法論の考案及び実証
 趣味: 投稿魔(科学啓蒙, 私小説, 社会問題)