

単色 X 線を用いた 1 分子動態追跡の実現とその波及性

佐々木 裕次
Sasaki Yuji

1. 量子プローブを用いた 1 分子計測の実現

1980 年代から研究が本格的にスタートした可視光を用いた 1 分子計測法や、その延長上で開発され、瞬く間に商品化され普及した超解像顕微鏡技術（2014 年ノーベル化学賞受賞）は、分子生物学における観察技術を一変させた。それまで、生体分子構造の平均値を議論してきた分子生物学を、1 分子生命科学という新領域へと躍進させた。その後、電子顕微鏡を用いた単粒子解析法（2017 年ノーベル化学賞受賞）も登場して、現在では、多くの静止画像から、今後の重要情報となる構造動態予測までできるようになった。可視光を用いた 1 分子計測の研究者たちも、細胞内の並進運動をモニターするだけでなく、分子内部の構造動態測定に挑戦するようになったが、可視域のプローブを用いた 1 分子計測技術では、その波長特性からの精度的な限界が壁となった。そんな時、1998 年に筆者らが、非常に単純な発想で「波長を短くすれば分子内部運動を高精度に測定できる！」と考え、可視 1 分子技術に比べ、革新的に高精度性で、かつ、大型放射光施設を利用することで高速性をも実現できる量子プローブによる 1 分子追跡法を提案した¹⁻⁴⁾。

原理的には極めて単純で、タンパク質分子の観察目的部位に金ナノ結晶（直径 20-40 nm）を化学標識し、この標識結晶からの X 線回折斑点の運動すべてを時分割追跡する。この X 線 1 分子追跡法（Diffracted X-ray Tracking: DXT, 図 1）は回転運動を計測するのが最大の特徴で、並進運動換算でピコメートル精度の位置決定が可能である。測定最高速度は数百ナノ秒の時分割観察が現在まで成功させている。今までに、分子動態計測は色々な系で実現して

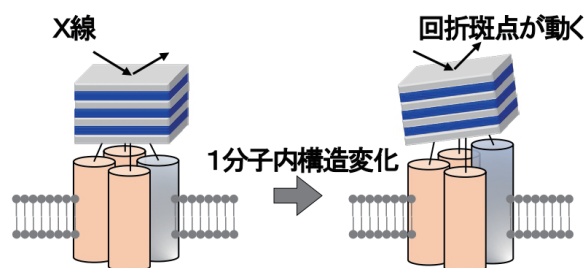


図 1 X 線 1 分子追跡法の原理図

図では生体膜上の膜タンパク質分子をターゲットとしている。ターゲット分子のモノマーとダイマーの区別も運動を通して明確に区別できることはすでに実証されている。高分子系や無機材料系にも適応できる原理である

おり、DNA や難解と言われてきた膜タンパク質分子（bR, KcsA, nAChR, α 7AChR, AChBP, GLIC, TRPV）において、多くの分子内運動計測に成功しており⁵⁻¹⁰⁾、中でも膜タンパク質のイオン透過時の開閉運動 1 分子計測は、他の方法では実現できない高速性と高精度性を兼ね備えた計測結果だった^{9,10)}。

その後、回折点追跡で 1 分子内部運動を観察する原理を電子線に適応した。電子線では、溶液中の試料を観察できる走査型電子顕微鏡 SEM を用いて、DXT 同様に生体分子に標識した金ナノ結晶の結晶方位変化を電子後方散乱回折（Electron Back-Scattered Diffraction）で高速時分割計測した。この方法を電子線 1 分子追跡法（Diffracted Electron Tracking: DET）と名付けた⁸⁾。数年前からは、中性子に利用した 1 分子計測法（Diffracted Neutron Tracking: DNT）にチャレンジし、原理実験に成功している。中性子利用によって、プローブによる生体分子の破壊性を気にしない数時間から数日という夢の長時間測定が可能となる。

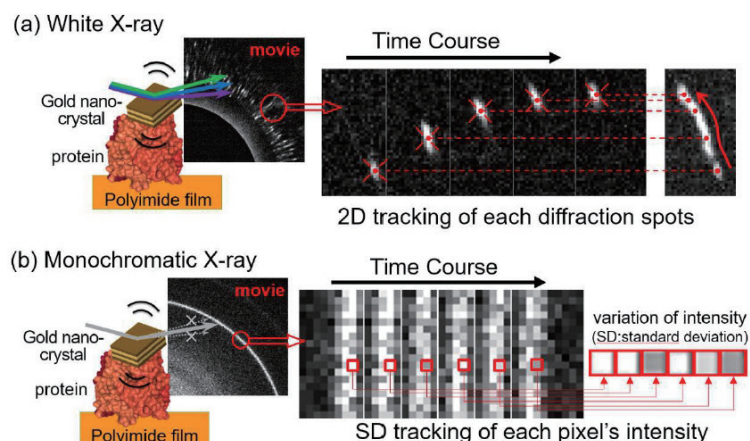


図2 (a) Diffracted X-ray Tracking 標識したナノ結晶からの回折スポットの重心位置を追跡するために白色X線が必要
(b) Diffracted X-ray Blinking 単色X線を用いて、検出された回折リング内の各ピクセルの強度変化を追跡することで動態情報を取得する

2. 白色X線から単色X線利用へ

DXTは、目的のタンパク質分子を直径20-60 nmの金ナノ結晶で標識し、そのナノ結晶からのX線回折斑点(ラウエ法)の角度変化を2次元的に観測し、マイクロ秒の高時間分解能でかつナノメートル以下の位置決定精度で多くのタンパク質分子の1分子内部運動計測を実現してきた。しかし、現在までDXT法は期待するほど世界中に普及はしていない。普及しない1つの理由に、白色X線を用いた計測であることが挙げられる。

通常の放射光施設は9割以上のユーザーが単色X線を利用する。近年では、ビームライン設計段階で白色X線の利用は検討されることが少なくなってきた。そこで筆者らはDXTを改良し、多くのユーザーに使われることを目的に、単色X線を用いた回折強度の変化量を自己相関関数を通して抽出・測定することで回折スポットの運動特性評価の可能性を提案し、実験的に確認することに成功した¹¹⁾。

この単色X線を使用した1分子計測法では、得られる回折スポットのすべての動きを追跡することはできないが、回折X線強度の明確な点滅(Blinking X-ray: X線ブリンキング, 図2)を検出することができる。筆者らは、これをX線ブリンキング現象と名付けた。X線ブリンキングにおける回折スポットの自己相関関数は1分子の運動速度と高い相関を示し、また時間情報を含まない回折スポットの強度揺らぎ幅からも1分子の運動速度を評価できることが分かった。更に、相互相関解析を行うことで、回転

スポットの運動方向の情報を得ることができることも分かった。これらの実験はSPRING-8 BL40XU放射光施設での実現だけではなく、実験室X線光源(Rigaku FR-D)を利用しても行われ、100ミリ秒の時分割性で実測することに成功した。

3. 細胞を用いた*in vivo* X線1分子計測への展開

DXTの1つの特徴であった白色X線の利用が単色化できたことで、1番最初に頭に浮かんだ進展は「非破壊計測の実現」である。放射光の強度が数桁下がるので、より放射光による非破壊計測が期待される。そこでトライしたのが細胞内1分子計測である。もちろん、可視領域をプローブとした1分子計測では、細胞内の色々な散乱によって、通常の1分子計測よりはS/Nが下がるが日常的に行われている。DXTが最初の測定に選んだタンパク質分子はGPCR(G protein-coupled receptor)である。膜タンパク質の1種であるGPCR(Gタンパク質共役受容体)には、細胞外の神経伝達物質やホルモンと結合し、Gタンパク質を介してシグナルを細胞内に伝えるという機能があり、細胞の興奮状態や生理機能の調整を行っている。そのため、創薬の約半数は、直接的若しくは間接的にGPCRをターゲットとしており、生命にとって非常に重要なタンパク質分子群と言える。しかし、GPCRの活性や構造の研究は、世界中で盛んに行われている一方で、シグナル伝達時の分子内部動態については全く研究が進んでいない。本研究では、細胞上にあるGPCR1分子の運動を、

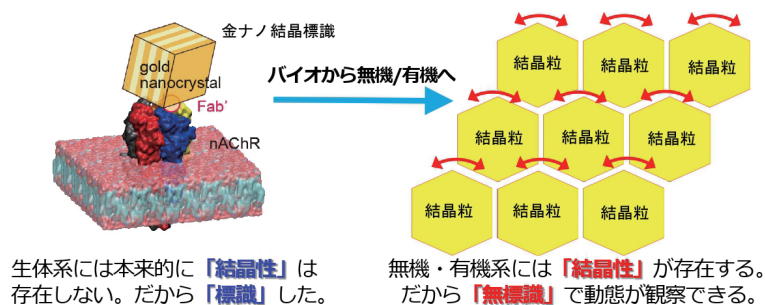


図3 バイオ動態から無機/有機物質動態計測への展開

ミリ（マイクロ）秒でX線回折動態を測ると、多くの無機/有機材料系でオンGSTローム以下の振動が検出された。これら動態測定は物性評価に利用できる（例えば、構造体強度、不純物、偏析、耐久性等）

DXB（Diffracted X-ray Blinking）を用いて計測した。DXBとは、金ナノ結晶を結合させたタンパク質分子に単色X線を照射し、金ナノ結晶からの回折点の輝度の揺らぎから分子内部運動を評価する1分子計測法ということになる。測定にはKEK及び実験室X線光源（Rigaku FR-D）を利用し、異なる溶液条件下で、1分子動態の違いをモニターすることに成功した。近々に発表する予定である。

4. 生物物理から材料科学への適応

単色X線利用が実現したことで、もう1つ重要な進展があった。今まで金のX線回折リング、特に(111)(200)のみを解析対象にしてきたが、その時でさえ、この回折点はどちらの面からのモノだろうか悩む時が多かった。準白色X線を用いていたからだ。幸い非常に良質の金ナノ結晶は、ほぼ(111)面が中心だったので、問題とはならなかった。しかし、白色ではなく単色X線での測定なら、この2面は明確に別物として解析できる。この延長上で考えると、マルチ標識が可能であることが簡単に思いつく。これは今後大きな利点となるだろう。可視光1分子計測でも、波長の異なる蛍光強度をモニターすることで、多色1分子動態計測を実現している。

加えて、この単色X線利用を、もう一步進めるならば、最初から結晶性が存在する系でDXBを用いるならば、今までのように金ナノ結晶をわざわざ標識しなくても動態測定できることになる（図3）。もちろん、ここで注意する点は、1分子計測の意義である。生体分子系では、結晶性を機能発現の必要条件としていない。タンパク質分子は、その1分子で十分に本来の機能を果たしていた。その動態挙動

を見ることがDXT/DXBの目的であった。だから、多分子を規則的に並べるという結晶性という発想はありえないので、金ナノ結晶を標識するという技術が必須となった。しかし、無機材料、有機材料、そして、高分子材料において、その機能発現において、結晶性を利用した系は極めて非常に多い。つまり、そのような系へDXT/DXBを利用する場合は、無標識で、その1つ結晶粒子に関する全く新しい動態評価技術が誕生することを意味する。

早速、金ナノ結晶の標識なしでの無機材料系における動態計測を試みた。DXTの1つの問題点であった金ナノ結晶標識を回避できる結晶性のあるサンプル系を選んでDXBの時分割測定を行った。その結果、多くの結晶性無機材料において、非常に僅かな微小運動を検出することに成功した。

例えば、その中の1つの例を示す。測定サンプルは、X線フィルムの主要材料であるAgCl、AgI、AgBrの各薄膜で、X線照射後の結晶動態を5ミリ秒の時間軸で比較し定量評価した。予想以上に明確な動態特性の違いを検出した。また、純度や粒径の異なる黒鉛に関しても、温度を変化させてDXBを測定すると、明確な差異を確認できた。これらの結果より、結晶性無機材料においても、その材料の機能性や純度、そして耐久性評価が無標識で高感度の実測できることが分かった。今後、無機・有機・高分子、そして、タンパク質分子の微結晶に適応できる広域な1分子・単粒子・ナノ領域物質動態計測技術として拡大利用されることが期待される。

5. 標識技術を使わない単粒子動態計測への展開

以上のように、非常に強力な量子ビーム唯一の

X線1分子追跡法DXTは、期待したほど成果中で多くの研究者が使用されてこなかった大きな2つの原因である白色X線利用と金ナノ結晶標識技術利用という難解な技術を、単色化利用と無標識化測定することによって、新たな単粒子動態計測法としてDXBは、広範囲の結晶機能物性に対して、比較的容易に時分割動態情報を得ることができる方法論へと変貌することができた。無機材料、有機材料、そして、複合材料においても、極めて多くの利用が今後期待される。材料科学において、今まで動態情報をナノレベルで評価する計測手段は、私が知る限り存在しない。次世代材料科学の最重要計測技術になる素地をもっている。

最後にもう1点。頭が混乱するかもしれないが、これをもう1度、生物物理の学術領域に戻してみると意外な利用法となる。つまり、筆者が1998年に考案したDXTとは、タンパク質分子の1分子動態情報の取得が最終目標であった。その動態評価においては、構造生物学によって得られた情報を基にして、タンパク質分子のどの部位の動態を評価しているかを同定してきた。その構造生物学で活躍したサンプルは結晶解析に他ならない。このサンプル系を積極的に、加えて少々異なった使い方が可能となる。

通常の構造生物学で測定に利用される結晶サイズは0.1 mm程度である。それ以下のあまり結晶成長しなかった結晶サンプルは「ゴミ結晶」と言われてきた。また、1度決定された結晶は、その後の利用は通常はない。無標識DXBは、それらのサンプルをリサイクルすることになる。DXB計測は、結晶を使用するが、決して高分解能の構造決定することが目的ではなく、動態情報を取得することが目的だ。結晶における動態情報は、デバイ・ワラー因子Debye-Waller factor (B因子)として評価されてきた。B因子は、温度と結晶性で決定する。数は少ないが、タンパク質分子の単結晶からのB因子を定量的に評価して、分子揺らぎがどの部位に集中している等の評価に成功しているタンパク質分子もある。しかし、通常は再現性がほとんどない。結晶によって、あまりにも違うB因子が導出されてしまう場合は多々あった。無標識DXBは、これを粉末回折的なデータで克服するというのが発想の1番のポイントである。つまり、ある程度の数で統計的な評価を加える。1分子計測において、1分子ではありながら、

情報は1,000分子から1万分子以上の揺らぎを考慮した統計処理技術を長年培ってきたことが功を奏したことになる。

結晶を利用して1番の問題点は、リガンド等の反応系において、結晶という空間的にある程度抑制されている、いわゆる結晶場なるものが、反応の邪魔をして反応が進まないことが容易に想像できる。これをどこまで回避できるかが、この方法が今後利用されるかどうかの決定要因になるであろう。筆者は100 nmサイズの超微結晶か、または、リガンド等の反応物を挿入できる結晶作製技術がその可能性を残していると考えている。

筆者自身、動態計測マニアと自負している。運動するタンパク質分子は、時間軸によって、この動態特性自身が全く異なるという極めて魅力的な特徴を持っていることが、私たちの今まですべての測定に統一している点と言える。この動態特性の魅力である運動自身が大きく動けば動くほど結晶化が難しいという多くの実験結果が知られており、最近の電子顕微鏡による単粒子解析ですら、高分解能を得ることができないという。結晶技術において、今後期待するのは、動態特性を持ちながら、よりソフトな結晶場をいかに現実的に作製するかである。タンパク質分子の超微結晶を用いた時分割無標識DXBによって、どれだけ多くの動態特性を明らかにできるか？更なる技術的な課題が明確化できたとも言える。今後が非常に楽しみである。

参考文献

- 1) Y. C. Sasaki, *et al.*, *Phys. Rev. E.*, **62**, 3843-3847 (2000)
- 2) Y. C. Sasaki, *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, **87**, 248102-248105 (2001)
- 3) Y. C. Sasaki, *et al.*, *Nucl. Instrum. Methods A.*, 467-468, 1049-1052 (2001)
- 4) Y. Okumura, *et al.*, *Phys. Rev. E.*, **70**, 021917 (2004)
- 5) T. Sagawa, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **335**, 770-775 (2007)
- 6) H. Sekiguchi, *et al.*, *PLoS ONE.*, **8** (5), e64176 (2013)
- 7) K. Ichiyanagi, *et al.*, *Review of Scientific Instruments.*, **84**, 103701-6 (2013)
- 8) N. Ogawa, *et al.*, *Scientific Reports*, **3**, 2201 (2013)
- 9) H. Shimizu, *et al.*, *Cell*, **132**, 67-78 (2008)
- 10) H. Sekiguchi, *et al.*, *Scientific Reports*, **4**, 6384, 1-9 (2014)
- 11) H. Sekiguchi, *et al.*, *Scientific Reports*, **8**, 17090 (2018)

(東京大学大学院新領域創成科学研究科)