LECTURES

生理学実験法講座「1分子生理学」第二回 X線を用いて生体1分子内の構造変化を計測するには

（財）高輝度光科学研究センター　生物医学グループ
科学技術振興事業団 戦略的基礎研究推進事業　佐々木チーム代表
佐々木裕次

キーワード：X線，1分子計測，ナノ結晶，
分子内構造変化

1. なぜX線で1分子を見るのか？

可視光を用いた1分子計測の歴史は，企業分光学者T. Hirschfeld［1］によって1970年代後半に始まった．そして生体分子に蛍光分子を標識して生体分子の運動を観察する研究がその10年後の1980年に日本において始まった［2−4］．これらの研究を機に，タンパク質1分子の運動を計測することが，生体分子の機能を理解する上で非常に重要な情報源となることが認識された．現在では，可視光を用いた計測技術は，汎用装置として取り扱われるようになり，多くの研究者が1分子蛍光法を各自の研究分野に適応，応用し始めている．

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（300nm～800nm）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（2nm～0.01nm）を用いる．その利点は，より高精度に分子運動を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［5］の利用等もあって，可視光（300nm～800nm）を用いていても，数nmの精度で分子運動をモニターできる．特に，1分子蛍光共鳴エネルギー移動法（Single Molecular Fluorescence Resonance Energy Transfer Method：1分子FRET）は，蛍光分子の選択にも依存するが，1nm以下の分子内移動距離を計測できる可能性がある［6］．しかし，1分子FRETの欠点は，蛍光1分子自身が化学環境に敏感すぎるなどの理由で，信号強度が非常に不安定になる点にある．この特性は利用法によっては利点になるが，生体分子内の局部的な化学環境まで正確に理解できていない現状では問題点となる．また，生体分子内部の構造変化をモニターしようとすると，多くのタンパク質分子が10nm程度の大きさだと考えると，その十分の一である1nm動くと言うのはかなりの大きな運動となる．内部運動を精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である．そこでX線の登場となった．後述するがX線1分子計測の位置決定精度はなんと1pmである．つまり，0.001nmの測定精度が現実のものとなったのだ．

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，$\lambda/100$まで可能であると言われている［6］．可視光領域が300～800nm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（＝2～0.01nm）に置き換えて考えると，pmオーダーの位置決定精度が出ることになる．このように，可視光を利用した計測の精度限界を認識し，分子内構造変化情報の重要性を考え，X線1分子計測は登場した［7］．

2. X線1分子計測の原理

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得られる．しかし，多くの研究者は，“X線を

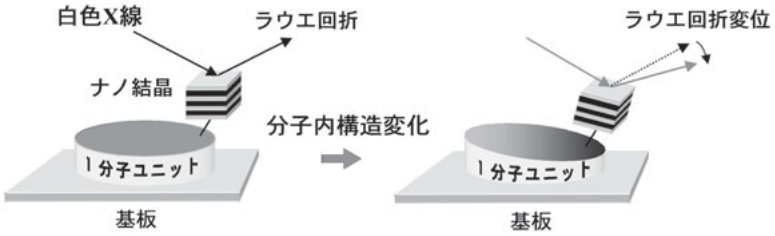


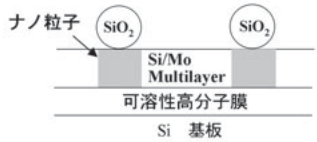
図1．X線1分子計測の原理図．1分子ユニット内に構造変化が始まると計測されていたナノ結晶からのラウエ回折斑点が運動し始める．

用いて1分子を検出できるのか？”という疑問を持つであろう．それは，物質と電磁波との断面積の大きさは，波長に比例するという常識からの当然の疑問である．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（図1）．まず，直径数nm程度の極微ナノ結晶をタンパク質分子にその機能を損なわないように標識する．そして，極微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）トレース（全計測時間～1秒）する．図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目的分子内の部位（被標識部位）が同様の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（種類）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しかない．最近，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きた．

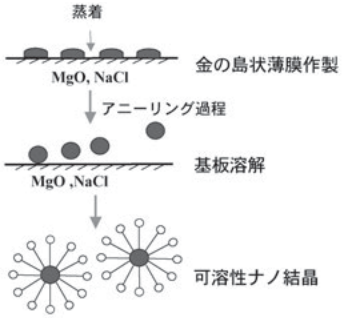
3. 生体1分子ユニットの基板固定

図1を見ても想像がつくかもしれないが，X線1分子計測を成功させるためには，3つの技術的ポイントがあった．(1) 生体1分子（ユニット）のソフトな基板固定 (2) 1分子に対して1ナノ結晶を1対1に標識する方法，及び (3) 良質ナノ結晶の作製である．順を追って説明する．

(1) については，水溶液中を拡散，ブラウン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（X線）のフラックス量ではナノ結晶からのX線回折斑点を実時間（最低ビデオレイト速度で）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石英基板（厚さ70 μm）の上に生体分子をソフトに化学固定して，意味のない（機能測定に直接関与していないという意味）ナノ結晶の拡散を抑えている．固定法はいくつかの方法が開発されている［8, 9］．典型的な例をDNA分子やミオシン分子の基板固定で説明するが，例えば，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利用される．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複数のアミノ基など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空けることである．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，保持する機能が劣化することが多く報告されているからである．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してしまうので，計測不可能となって



(a) 多層膜ナノ粒子の作製断面図。多層膜ナノ粒子はエッチングプロセスの後、Si基板から剥がさなければならないので、可溶性高分子膜を挿入しておく。



(b)エピタキシャル成長を利用した金ナノ結晶の安定水溶液の作製手順。真空蒸着は、0.001-0.01Å/sと非常に低速で蒸着する。アニーリング温度は350℃程度で行なう。島状結晶がこのアニーリング工程で拡散して隣接する結晶と融解しないように高融点層を金蒸着の後に蒸着することもある。

図2．ナノ結晶作製法

しまう．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，ここで明記しなければならないのは，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点である．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．

（2）に関しては現在のところ，完全には解決していない．理想的には目的1分子に標識されるのはナノ結晶1つでなければならない．それも目的分子中の1つのサイトを介してである．本研究で用いているナノ結晶は金ナノ結晶であり，金は密度と質量数が大きいのでX線回折の検出感度が高いばかりではなく，金表面とシステイン（SH）との共有結合が有効に利用できる．欠点としては，金表面は無数の活性サイトを持っているので，複数のシステインとの反応が進む危険性がある点である．現状は，金表面の汚れのためにそれほどの多くの活性サイトを金ナノ結晶表面に考えなくてもよいのだが，将来的には活性表面をこちらが指定した表面電荷になるように金表面の化学修飾を施して，完全に1つの反応分子のみを金ナノ結晶表面に修飾することを目指している．現段階では，安定的に水溶液中に存在するナノ結晶と基板上に固定された生体分子とを2～10時間，5～10℃でインキュベーションし，その後，バッファーでソフトにしかし何度もよく洗い流すという単純なプロトコルで1対1反応が実現している．この際注意する点は，洗い流すのであって，水溶液を基板にたたきつけるように洗浄してはならない．比較的ソフトに基板固定しているためか，簡単に剥離することが確認されている．

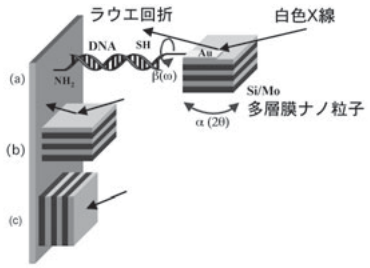
4. ナノ結晶の作製

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金コロイドであった．金コロイドは電子顕微鏡でその格子像が確認されている結晶体であるが，SPring-8で1個のナノコロイドからのラウエ像を取ると，回折斑点はほとんど得ることができなかった．これは，物質に対する電子線とX線の断面積の違いを如実に表わした結果として理解できる．従って，X線を用いる実験においては，ナノレベルの良質の結晶体を自作するしかなかった．

より良質の結晶を作製すべく，一次元及び三次元結晶の自作を行なった．主に2つの方法を考案した．1つ目は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（図2a）．最終的に基板から多層膜粒子を切り離さな

ければならないので，その際の工夫は厄介であるが，高反射率で直径15～25nmの多層膜粒子の作製に成功した［7, 10］．おまけの話しであるが，このナノ粒子は電顕写真を見ても分かるように（図2b），ナノ領域で比較的平坦な平面を持っている．これは，ナノ結晶の検出にX線回折だけでなく，X線反射現象も利用できることを示唆している．X線の全反射現象は今使用している硬X線領域よりも軟X線領域において有効な反射強度を得ることが期待できる．硬X線1分子計測の次に実現する軟X線1分子計測の有用なプローブとなることが期待できる．また，このような局部的な平滑表面は，水溶液中で作製する金コロイドの一種においても最近確認されている［11, 12］ので，水溶液中でのプローブ作製への研究進展を行なうことも考えている．

2つ目の方法は，結晶性の良い薄膜を作製するために無機材料において応用されている現象，エピタキシャル成長を利用した方法である．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0.001～0.01Å/s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350℃付近に保持しておく．そうすると，膜厚1nmで直径15～20nmの金ナノ結晶が完成する（図2c）．特記することは，エピタキシャル成長をこのようにナノ結晶（粒子）を作製するために積極的に利用した例は本実験が初めてという点である．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ものなので，各ナノ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，1分子への化学的標識など到底不可能であった．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（10～50mM）添加して安定なナノ結晶含有水溶液を作製した（図2d）．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．



(a)DNA 1分子の計測例。DNA分子は5‘のサイトにアミノ基とSH基を導入してそれぞれ、基板表面、ナノ粒子表面と反応固定した。ナノ粒子の運動モードは二種類ある（αとβ）。本実験配置では、αモードは主に計測される。
(b)ナノ結晶の物理吸着。測定系の安定性評価に使用される。
(c) ナノ結晶から回折斑点が検出できない場合。X線照射領域内にナノ粒子が存在しても、回折条件が合わなければ、その存在を確認できない。

図3．DNA1分子計測

5. DNA分子を用いた実験と測定限界

X線1分子計測を生体分子に適応する最初の例としてDNA分子を用いた．分子設計がしやすく，構造も既知で単純という理由で選択した．図3のように，直径10～15nm程度の多層膜ナノ粒子を計測したいDNA1分子（図では短い塩基列を持ったDNA分子）の興味ある部位（ここでは5‘末端）に化学的に標識する．その際，分子の固定とナノ結晶の標識によって計測したい分子の運動特性が変化しないように最大の注意を払う．実験は，大型放射光施設SPring-8（BL-44B2）にて行った．本実験では，ある領域内のブラック角すべてで反射が可能でなければ，回折斑点を用いた連続的運動追跡は不可能なので白色X線が必要となる．その点，本来白色特性を持つ放射光光源は理想的である．データーは，数msレベルのパルスX線光源を使用して，ビデオレイト程度で計測を繰り返した．検出系は，X線を可視蛍光に変換するX線イメージングインテンシファイヤーV5445Pを使用．可視蛍光はCCDカメラにて検出．この検出システムがビデオレイトのリアルタイムイメージングを可能にした（1秒間連続計測）．サンプルは，厚さ7μmの水溶液層を挟んで両側にX線透過フィルムで封をしている（図4）．フィルムは，耐放射性の高いポリイミドフィルムを使用した．このポリイミドフィルムは比較的薄膜の厚さ

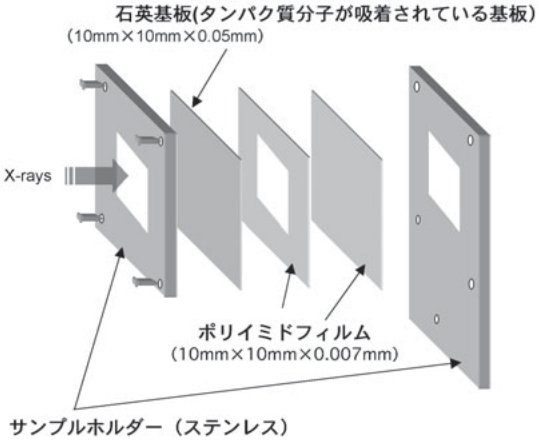


図4．サンプルホルダーの構造．水溶液の厚さは，真ん中に穴のあいたポリイミドフィルムの厚さ（5～10 μm）で調整する．

が均一でフィルム表面を清浄化しやすく，よくX線実験で利用されている．サンプルは，温度制御可能でDNA分子の実験では5℃設定下で行なわれた．1秒間の照射実験を何度も繰り返し，各運動を統計処理して既知のブラウン運動と比較検討した［13, 14］．

図3aはDNA分子をアミノ基で固定して，多層膜ナノ粒子の一部分に蒸着した金をSHで修飾した図である．分子の運動は大まかに2種類ある（αとβ）．現在の透過型ラウエ斑点計測だと，α型の運動に対してのみ非常に感度良く計測できる．図3bでは，もし多層膜ナノ粒子にDNA分子が修飾されずに直接，基板に物理吸着した場合を表わした．また，図3cでは図3b同様，物理吸着している場合でも，回折条件が満たされずに回折X線が得られない例を示した．つまり，X線1分子計測法では，X線照射内にナノ結晶（粒子）があっても回折条件が満たされない場合はナノ結晶（粒子）の存在を確認することはできない．

新しい計測法の測定限界を実験的に決定することは，これから計測対象になるサンプル系を明確化できるだけでなく，解析上も重要な因子の決定となる．X線1分子計測法の測定限界は，図3bの例を利用して決定される．確認された回折斑点の安定性を観察する．50点程度の回折斑点を観察した結果，1秒間に$2\theta = 1.5$mrad以内の安定性が確認され，この数値をもし長さ6nmのDNA分子の最小運動値として表わすのであれば，4.5 pmという数値を得ることができる．この数値はなんと原子の1/100の長さに相当する．注意しておきたいが，この数値は，X線1分子計測によって測定された回転運動の変位をある点（この場合，基板の固定端）を支点に並進運動に変換した場合の数値である．かなり，実測地に近い値となるであろうが，直接測定したわけではない．

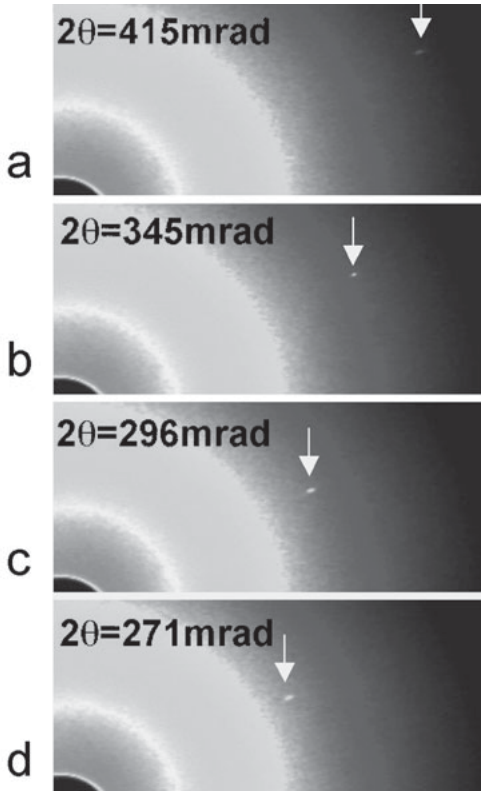


図5．X線回折斑点の実時間検出（DNA 1分子（18 mer）の場合）．回折斑点は，2θ方向に移動した．この方向は実空間では運動αに対応する運動である．

図5はDNA1分子を計測した際のラウエ回折斑点の運動の追跡画像である．各フレーム間は0.25秒．1秒間の観察結果を示した．2θ方向に回折斑点が運動しているのが分かる．いままで，回折像が動画として認識された例はほとんどなく，X線

1分子計測法の発想がいかに意外性のある方法か理解できるだろう．

6. ミオシン分子のブラウン運動計測

次に筋肉の主成分であるミオシン分子のATP加水分解に関係する構造変化計測を試みた．石英基板上に取りはずし可能な化学法で固定したミオシン分子（図6）に直径20 nmの金ナノ結晶をラベルし，溶液内にATP分子，ADP分子，及び核酸非存在下の各条件下でpm（nm/1000）レベルの1分子内ブラウン運動のリアルタイム計測を行った．一般の1分子計測において，1分子全体が（1粒子として）溶媒中をブラウン運動しながら拡散して行く現象は数多く確認されている．しかし，分子内のある特定の部位，この場合は筋肉力発生メカニズム解明の中心的存在であるレバーアーム部位において，各溶液条件下での1分子内ブラウン運動の差異の計測に成功した例は今まで全くなかった．測定温度は5℃，基準水溶液成分はTris/HCl（pH = 8.0，50mM），150mM KCl下で行った．ミオシンS1分子は，C末端を基板側に固定し，N末端を結晶クラスターの標識サイトに使用した．これによりレバーアーム部位のみの構造変化を詳細に計測することが可能となる．

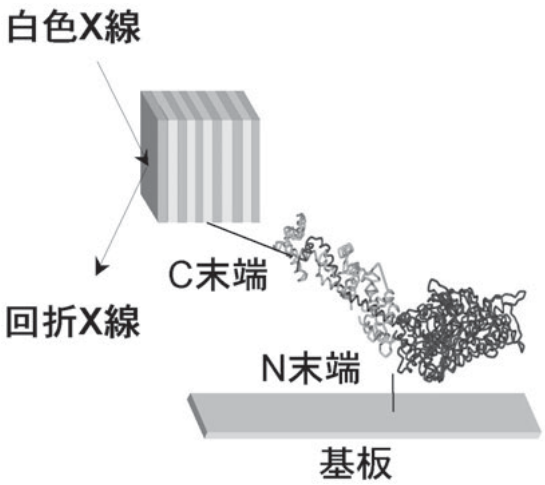


図6．ミオシン分子のサンプル配置．ミオシンS1分子に遺伝子操作してC末端に金ナノ結晶と反応させるためにSH基，そして，N末端に基板とソフトに固定するためにアミノ基を導入した．

実験結果は，核酸非存在下，及びMg-ADP分子存在下では，全く自由な拘束されないブラウン運動をしていたが，Mg-ATP存在下では，推定拘束面積1.1 nm^2程度の拘束されたブラウン運動をすることが確認された．

一般に，ブラウン運動を解析するためには，分子の運動に関わる測定値のMSD（Mean Square Displacement）曲線を表示することで議論される．MSD曲線において，直線的な関係が成立する場合（本実験では核酸分子が存在しない場合，図7a）は，なんの外力も存在しない全く自由なブラウン運動と帰属される．しかし，図7bでは，ある値で飽和する曲線が得られた．これは明らかに外力の存在を示しており，その外力により分子はその飽和値の面積内に拘束された運動をしていることになる．従って，ミオシン分子のレバーア

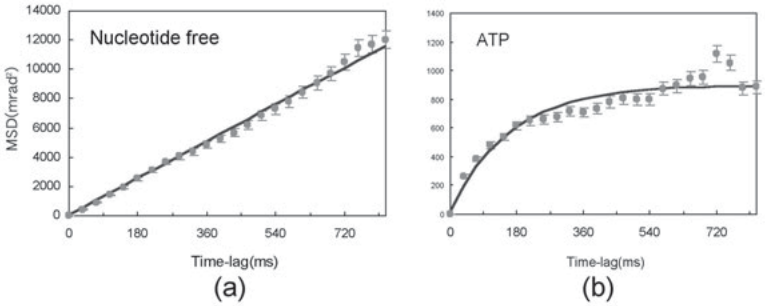


図7．ブラウン運動特性を評価するために用いられるMSD曲線（a）は測定時に水溶液に核酸分子が全く存在しない場合．（b）はATP分子が共存している対照実験．

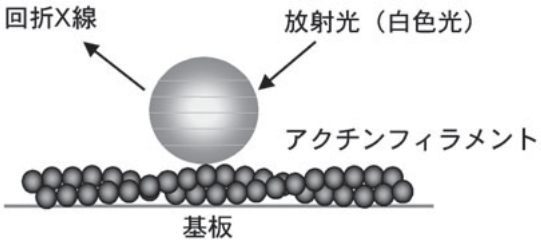


図8．アクチンフィラメントの運動計測

ーム部位は，ATP分子などが存在しない場合は，全く自由にふらふらとブラウン運動を好き勝手に運動しているが，ATP分子がそのレバーアーム部位の根元部分に反応（ATP分子の反応部位はすでに知られている）及び挿入すると，アーム部位の運動は拘束運動に変化することが分かった．極端に解釈すると，ATP分子が反応部位に侵入するとレバーアーム部位の運動は，ある方向には成分を持たなくなるとも表現できる．これが力発生にどのように関わっているかを解明するには，もう少し多くの因子を変化させてみなければ分からないが，この実験方向で各溶液条件によって，分子内運動を明確に区別することができる方針がたったことは大いなる進展であった．

7．アクチン繊維内の分子揺らぎ

ミオシン分子の場合，分子内の構造変化を計測することが最終的な目標である．しかし，生体分子の中には，特異的な構造変化よりも分子の硬さや揺らぎなどの運動が非常に重要である場合もある．ここでは，ミオシン分子の相手役であり，分子（繊維）の分子内揺らぎが最近注目されてきたアクチン分子の分子内揺らぎを計測した例を紹介する．アクチンの基板固定，及びナノ結晶固定には，特別な変異体を使用しないで行なった．アクチンはシステイン基を介して金基板表面に吸着させて，金ナノ結晶は反対側のシステイン基を介して図8にあるように標識した．溶液条件は水溶液内にファロイジンを含む場合，含まない場合，それにCa系，Mg系での実験を試みた．

測定温度は5℃，基準水溶液成分はTris/HCl（pH = 8.0，50mM），1.0mM ATP，100mM KCl下で行った．実験結果としては，MSD曲線より比較的拘束されたブラウン運動が検出された．これは明らかにアクチン繊維の基板固定法に問題があると思われる．なぜならば，本実験のあらゆる溶液条件（Mg，Ca及びファロイジン共存下）において拘束運動が確認されたからである．しかし，同じ拘束運動でも，Mgイオン共存条件よりもCaイオン共存条件の方が，またファロイジン共存下よりも非存在下の方が繊維内の分子揺らぎが大きい（柔らかい）という特徴はアクチンの既知の特長と合致しており，アクチン自身の柔らかさを評価することができたことになる．また，2．の原理説明の際に触れたが，X線1分子計測の大前提である，ナノ結晶の運動と計測したい生体分子の被標識部位の運動が一致しているという点に関しても，従来のアクチンの柔らかさに関するデーターと一致した結果が得られたことは，この前提が成立していることを示している．

8．X線1分子計測の将来

X線1分子計測の課題は3つある．一つ目は放射光により生体分子損傷効果の評価．現状は損傷が最小限になるように実験を行なっているが，現状よりも長時間の連続実験が必要になる場合や，より小さいナノ結晶を検出すべく高強度のX線を利用する場合，損傷効果は無視できなくなる．定量的な評価が必要となるであろう．二つ目は装置の規模．他の1分子計測はLabレベルの規模だが，X線1分子計測は現状，大型放射光施設が必要である．現在実験室レベルの小型放射光装置の開発が進んでいるので，小型光源の利用も検討している．また，硬X線よりも軟X線の光源施設の方が規模が小さくなるので軟X線利用の検討も開始した．最後の第三番目は，やはりナノ結晶の大きさをより小さくすることである．よりin-vivo計測に近いことを始めると，ナノ結晶が大きいと他の分子との相互作用がより問題となる．直径5nm程度が目標である．

参考文献

1．T. Hirschfeld : Optical microscopic observation of sin-

gle small molecules. Appl. Opt. 15 : 2965−2966 (1976).
2. H. Nagashima and S. Asakura : Darkfield light microscopic study of the flexibility of F-action complexs. J. Mol. Biol. 136, 169−182 (1980).
3. S. Matsumoto, K. Morikawa and M. Yanagida : light microscopic structure of DNA in solution studied by the 4'-diamidino-2-phenylindole staining method : J. Mol. Biol. 152, 501−516 (1981).
4. T. Yanagida, M. Nakase, K. Nishiyama and F. Oosawa: Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin : Nature 307, 58−60 (1984).
5. B.J. Schnapp, R.D. Vale, M.P. Sheetz and T.S. Reese: Single microtubules from squid axoplasm support bidirectional movement of organelles. Cell 40, 455−462 (1985).
6. S. Weiss : Fluorescence spectroscopy of single biomolecules, Science 283, 1676−1683 (1999).
7. Y.C. Sasaki, Y. Suzuki, N. Yagi, S. Adachi, M. Ishibashi, H. Suda, K. Toyota and M. Yanagihara. Tracking of Individual nanocrystals using diffracted x-rays. Phys. Rev. E. 62, 3843−3847 (2000).
8. Y.C. Sasaki, Y. Suzuki and T. Ishibashi: Fluorescent x-ray interference from protein monolayer. Science 263, 62−64 (1994).
9. Y.C. Sasaki, K. Yasuda, Y.Suzuki, T. Ishibashi, I. Satoh, Y. Fujiki and S. Ishiwata: Two-dimensional arrangement of a functional protein by cyctein-gold interaction: Enzyme activity and characterization of a protein monolayer on a gold substrate. Biophys. J. 72, 1842−1848 (1997).
10. Y. Okumura, Y. Taniguchi and Y.C. Sasaki: Dispersive one-dimensional (Mo/Si) nanocrystals for single molecular detection systems using x-rays. J. Appl. Phys. 92, 7469−7474 (2002).
11. R Jin, Y.W. Cao, C.A. Mirkin, K.L. Kelly, G.C. Schatz and J.G. Zheng. Science 294, 19011903 (2001).
12. Y. Sun and Y. Xia : Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. Science 298, 2176−2178 (2002).
13. Y.C. Sasaki, Y. Okumura, S. Adachi, Y. Suzuki and N. Yagi: Diffracted x-ray tracking : new system for single molecular detection with x-rays. Nucl. Instrum. Methods. A467-468, 1049−1052 (2001).
14. Y.C. Sasaki, Y. Okumura, S. Adachi, H. Suda, Y. Taniguchi and N. Yagi. Phys. Rev. Lett. 87, 248102−1−248102−4 (2001).

佐々木裕次（ささきゆうじ，Yuji C. Sasaki）
SPring-8大型放射光施設（財）高輝度光科学研究センター 放射光研究所 生物医学G 主幹研究員．科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業（JST/CREST）“蛋白質の構造・機能と発現メカニズム”佐々木チーム研究代表者．略歴：1991年東北大学大学院工学研究科博士課程修了（工学博士）．Tel：0791−58−0802（03931）Fax：0791−58−2512　ycsasaki@spring8.or.jp