

令和元年6月6日現在

機関番号：12601  
研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)  
研究期間：2014～2018  
課題番号：26105005  
研究課題名(和文) バイオロジーにおける3D活性サイト科学

研究課題名(英文) 3D Active Site Science in Biology

## 研究代表者

佐々木 裕次 (Sasaki, Yuji)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：30344401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 85,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、バイオ材料に対する2つの方法論、蛍光X線ホログラフィーとX線1分子追跡法を発展させることを目的とした。X線1分子追跡法では、ジスルフィド結合(S-S)を標的にした分子標識法により金ナノ結晶標識を実現し、3次元分子動態計測をマイクロ秒時分割で成功させ、膜タンパク質分子の新規動態計測に成功した。また、無標識による全く新しい動態計測法を提案した。蛍光X線ホログラフィーでは、ヘモグロビンやミオグロビンを通してタンパク質分子の重元素周囲3Dサイト構造決定に、世界で初めて蛍光X線ホログラフィーを適用し実測した。最終目標である光合成主要蛋白質群 PSIIの基礎データもすべて測定できた。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

生命科学の分野に日本発の2つの新しい計測手法を確立させることができた。それらの新計測方法で、今まで得られなかった注目元素の価数評価や3次元レベルの分子内部動態評価が可能になった。これらを軸に新しいタンパク質科学を発展させていく。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop two methodologies for biomaterials, fluorescent x-ray holography and x-ray single molecule tracking. In X-ray single molecule tracking method, gold nanocrystal labeling is realized by molecular labeling method targeting disulfide bond (SS), three-dimensional molecular dynamics measurement is succeeded by microsecond time division, and new kinetic measurement of membrane protein molecules succeeded in. We also proposed a completely new dynamic measurements without labeling. In fluorescence X-ray holography, we applied and measured fluorescence X-ray holography for the first time in the world for determining the 3D site around heavy elements of protein molecules through hemoglobin and myoglobin. The basic data of the main target photosynthetic protein group PSII, which is the final goal, could also be measured.

研究分野：生物物理学

キーワード：蛍光X線ホログラフィー X線1分子追跡法 標識・無標識法

## 1. 研究開始当初の背景

現代の生命科学は、その主要機能素子であるタンパク質分子の構造自身を基盤情報として飛躍的な進展を遂げている。しかし、利用されている構造解析手法は極めて限られている。現在、巨大バイオ系分子構造を非結晶状態でかつ高分解能で決定する計測手法は存在しない。本研究では、全体構造を決定するのではなく、「3D 活性サイト」を注視して構造決定を行う戦略をとる。この発想の大転換で、多くの方法論での可能性が広がる。

## 2. 研究の目的

本研究では、2つの方法論を中心に、着目するサイトの周辺構造や構造動態情報を Å 精度で決定し、その時分割的構造変化を追跡できる手法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では3つの課題を定義して、その解決を主軸に研究を進めることとした。

### 【課題1】分子標識法を用いた重元素周囲3D サイト構造決定法確立

ジスルフィド結合(S-S)を持つ低分子タンパク質分子において、イオウ S 元素に重金属を特異的に分子標識して重元素位置を3D 構造決定する。

### 【課題2】マイクロ抗体等低分子における S 元素周囲3D サイト構造決定法確立

水溶液中測定技術を進展させ、無標識系としてイオウ S 元素周囲の「3D 活性サイト」構造決定をマイクロ抗体やナノボディー等の比較的小さい分子系で実現する。

### 【課題3】PSII 等巨大分子における重元素周囲3D サイト構造決定法確立

巨大分子である Mn クラスター活性中心を持つ光合成主要蛋白質群 PSII を中心試料とし、光励起前後における Mn 周囲3D イメージングを実現し時分割法も確立する。

また、本研究で研究開発する方法論は、2つであり、蛍光X線ホログラフィーとX線1分子追跡法である。【課題1】【課題2】は、X線1分子追跡法関連の開発課題であり、【課題3】は、蛍光X線ホログラフィーに関する課題である。

## 4. 研究成果

【課題1】【課題2】は、X線1分子追跡法の開発課題であり、【課題3】は蛍光X線ホログラフィーに関する課題である。【課題1】ジスルフィド結合(S-S)を標的にした分子標識法により金ナノ結晶標識を実現し、3次元分子動態計測をマイクロ秒時分割で成功させ、生命科学の最先端分野で注目される膜タンパク質分子の新規動態特性を提案した。【課題2】マイクロ抗体やナノボディー等の小さい分子による標識技術を発展させ、無標識による全く新しい3次元分子動態計測法を提案することができた。今後、この新しい時分割回折X線明滅法の爆発的な利用が期待される。【課題3】ヘモグロビンやミオグロビンを通してタンパク質分子の重元素周囲3D サイト構造決定に、世界で初めて蛍光X線ホログラフィーを適応させ実現した。最終目標である Mn クラスター活性中心を持つ光合成主要蛋白質群 PSII の基礎データもすべて測定できた。3D サイト構造決定の最終段階に来ている。各方法論において、代表的な成果を1つずつ報告する。

蛍光X線ホログラフィーは、原子分解能を持つX線を利用した構造決定法の中で、その散乱波の強度情報だけでなく位相情報をも同時に計測できるユニークな撮像技術である。我々は、世界で初めて、蛍光X線ホログラフ

ィー測定をタンパク質分子に適用するため、装置の改良を行い、世界で初めて血液中の酸素運搬タンパク質であるヘモグ

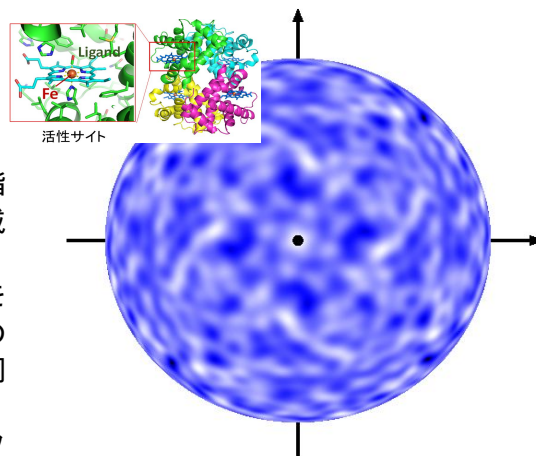


図 世界で初めて計測に成功したタンパク質分子からの蛍光X線ホログラムパターン。

ロビンの蛍光 X 線ホログラムの観測に成功した<sup>1</sup>。この測定系を用いて、酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビンの蛍光 X 線ホログラフィー測定を SPring-8 BL39XU 及び Photon Factory BL6C にて複数回行い、信頼できるデータを今年度は蓄積することにも成功した。一般にタンパク質結晶では単位胞内に異なる配向の複数の分子が存在し、それぞれの活性サイトからの信号が重なって観測されるため、解析には困難を伴うことが多い。この問題を解決する一つの方法として、ヘモグロビンやミオグロビンなどが活性サイトに持つヘム（鉄 - ポルフィリン錯体）の分子対称性を利用する解析法を試みた。ヘモグロビン（16 サイト）と比べて、結晶中に含まれる異なる配向の分子が少ないミオグロビン（2 サイト）においては、原子像再生時にヘムの D<sub>4h</sub> 対称性を利用することが有効であることが示された。

X 線 1 分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking: DXT)は、佐々木らによって 1998 年に考案され、困難と言われてきた巨大膜たんぱく質分子の 1 分子動態を実現してきた。DXT は目的のタンパク質をナノ結晶で標識し、ナノ結晶からの X 線回折スポット（ラウエ法）の角度変化を観測し、マイクロ秒の高時間分解能でかつナノメートルの高空間分解能で、タンパク質 1 分子の内部運動計測を実現した。しかし、現在まで DXT 法はそれほど普及していない。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。そこで我々は、DXT を改良して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自己相関を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。この単色 X 線を使用した回折 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）を検出することができる。我々は、この X 線ブリンキングから生体内の局所的な環境に依存した単一分子動態を評価した。X 線ブリンキングにおける回折スポットの自己相関は 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からも 1 分子の運動速度を評価できることがわかった。さらに、相互相関解析を行なうことで、回折スポットの運動方向の情報を得ることができることを示した。これらの実験は

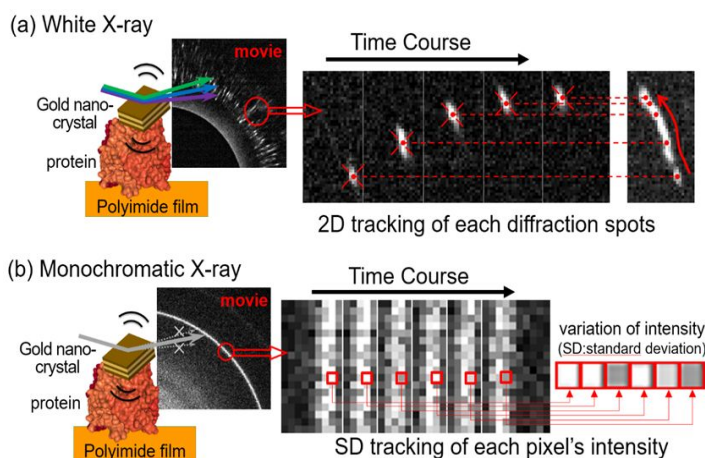


図 世界で初めて実験室 X 線光源で実現した X 線 1 分子動態計測 (a)従来の Diffracted X-ray Tracking(DXT) (b)新しい Diffracted X-ray Blinking(DXB)。

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 を利用して行われ 100 ミリ秒の時分割性で実測することに成功した。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 15 件 )

A. K. R. Ang, T. Matsushita, Y. Hashimoto, N. Happo, Y. Yamamoto, M. Mizuguchi, A. S.-Tomita, N. Shibayama, Y. C. Sasaki, K. Kimura, M. Taguchi, H. Daimon, and K. Hayashi, Direct imaging of valence-sensitive X-ray fluorescence holograms of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Phys. Stat. Sol. B 1800100 1-8 (2018) 査読あり

H. Sekiguchi, M. Kuramochi, K. Ikezaki, Y. Okamura, K. Yoshimura, K. Matsubara, Jae-won Chang, N. Ohta, T. Kubo, K. Mio, Y. Suzuki, L. Chavas, Y. C. Sasaki, Diffracted X-ray Blinking Tracks Single Protein Motions, Scientific Reports (Nature Publishing Group), 8, 17090 (2018). 査読あり

Jae-won Chang, M. Nishijima, H. Sekiguchi, K. Ichiyanagi, M. Kuramochi, Y. Inoue, Y. C. Sasaki, X-ray observations of single bio-supramolecular photochirogenesis, Biophysical Chemistry, 242, 1-5 (2018). 査読あり

Y. Hosoe, S. Inaba, H. Sekiguchi, Y. C. Sasaki, M. Oda, DNA-binding induced conformational change of c-Myb R2R3 analyzed using diffracted X-ray tracking, Biochem Biophys Res Commun. 503(1), 338-343 (2018). 査読あり

A. Sato-Tomita, H. Sekiguchi, Y. C. Sasaki, Progression of 3D Protein Structure and Dynamics Measurements, J. Physical Society of Japan, 87, 6, 061015 (2018). 査読あり

N. Ogawa, Y. Yamamoto, K. Abe, H. Sekiguchi, Y. C. Sasaki, A. Ishikawa, J. Frydman, M. Yohda, Time-Resolved Measurement of the ATP-Dependent Motion of the Group II Chaperonin by Diffracted Electron Tracking, International J. Molecular Science, 19(4), 950 (2018). 査読あり

N. Ogawa, Y. Yamamoto, K. Abe, H. Sekiguchi, Y. C. Sasaki, A. Ishikawa, J. Frydman, M. Yohda: Time-Resolved Measurement of the ATP-Dependent Motion of the Group II Chaperonin by Diffracted Electron Tracking, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, 9, 4, 950 (2018). 査読あり

Y. Matsushita, H. Sekiguchi, J. W. Chang, M. Nishijima, K. Ikezaki, D. Hamada, Y. Goto, Y. C. Sasaki, Nanoscale Dynamics of Protein Assembly Networks in Supersaturated Solutions, Scientific Reports (Nature Publishing Group) 7, 13883 1-8, (2017). This paper is Collection 2017 Top 100 in Chemistry in Scientific reports (第 26 位) 査読あり

D. Usui, S. Inaba, H. Sekiguchi, Y. C. Sasaki, T. Tanaka, M. Oda, First observation of metal ion-induced structural fluctuations of  $\alpha$ -helical peptides by using diffracted X-ray tracking, Biophysical Chemistry, 228, 81 (2017). 査読あり

Y. Yamamoto, Y. Uno, E. Esha, K. Ikegami, N. Ishii, N. Dohmae, H. Sekiguchi, Y. C. Sasaki, M. Yohda, Asymmetry in the function and dynamics of the cytosolic group II chaperonin CCT/TRiC, PLoS One 2, e0176054 (2017). 査読あり

A. S.-Tomita, N. Shibayama, N. Happo, K. Kimura, T. Okabe, T. Matsushita, S.-Y. Park, Y. C. Sasaki, and K. Hayashi, Development of an X-ray fluorescence holographic measurement systems for protein crystal, Rev. Sci. Instrum. 87, 063707 (2016). 査読あり

Y. Sato, Y. Tanaka, S. Inaba, H. Sekiguchi, T. Maruno, Y. C. Sasaki, H. Fukada, Y. Kobayashi, T. Azuma, M. Oda; Structural dynamics of a single-chain Fv antibody against (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl, International J. Biological Macro Molecules, 91, 151-157 (2016). 査読あり

Y. Matsushita, H. Sekiguchi, K. Ichiyanagi, N. Ohta, K. Ikezaki, Y. Goto, Y. C. Sasaki, Time-resolved X-ray Tracking of Expansion and Compression Dynamics in Supersaturating Ion-Networks, Scientific Reports (Nature Publishing Group) 5, 17647, 1-8, (2015). 査読あり

Haruo Kozono, Yufuku Matsushita, Naoki Ogawa, Yuko Kozono, Toshihiro Miyabe, Hiroshi Sekiguchi, Kouhei Ichiyanagi, Noriaki Okimoto Makoto Taiji, Osami Kanagawa, Y.C. Sasaki, "Single Molecular Motions of MHC Class II Rely on Bound Peptides", *Biophysical Journal*, 108 (2), 350–359 (2015). 査読あり

H. Sekiguchi, Y. Suzuki, Y. Nishino, S. Kobayashi, Y. Shimoyama, W. Cai, K. Nagata, M. Okada, K. Ichiyanagi, N. Ohta, N. Yagi, A. Miyazawa, T. Kubo, Y. C. Sasaki, Real Time Ligand-Induced Motion Mappings of AChBP and nAChR using X-ray Single Molecule Tracking, *Scientific Reports (Nature Publishing Group)* 4, 6384,1-9 (2014). 査読あり

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)

研究分担者

研究分担者氏名：柴山 修哉  
ローマ字氏名：(SHIBAYAMA, Naoya)  
所属研究機関名：自治医科大学  
部局名：医学部  
職名：教授

研究者番号(8桁): 20196439

研究分担者氏名: 関口 博史

ローマ字氏名: (SEKIGUCHI, Hiroshi)

所属研究機関名: 公益財団法人高輝度光科学研究センター

部局名: 利用研究促進部門

職名: 主幹研究員

研究者番号(8桁): 00401563

研究分担者氏名: 宮澤 淳夫

ローマ字氏名: (MIYAZAWA, Atsuo)

所属研究機関名: 兵庫県立大学

部局名: 生命理学研究科

職名: 教授

研究者番号(8桁): 60247252

研究分担者氏名: 佐藤-富田 文菜

ローマ字氏名: (SATO-TOMITA, Ayana)

所属研究機関名: 自治医科大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 50717709

研究分担者氏名: 久保 泰

ローマ字氏名: (KUBO, Tai)

所属研究機関名: 国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名: 生命工学領域創薬分子プロファイリング研究センター

職名: 副研究センター長

研究者番号(8桁): 10178030

## (2)研究協力者

なし。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者 個人に帰属されます。