

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22241032

研究課題名（和文） コンパクトX線1分子計測装置の実現と複合計測法開発

研究課題名（英文） Development of Compact Diffracted X-ray Tracking Instrumentation

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

研究成果の概要（和文）：

2000年に大型放射光施設を用いたX線1分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking: DXT)を提案し、それ以来、ポリマーやDNA分子、抗原抗体反応、そして機能性膜タンパク質と分子内運動をマイクロ秒からミリ秒レベルで、かつピコメートルという超高精度で高速1分子計測してきた。この高精度1分子追跡法を実験室レベルで計測可能とする装置開発を行い汎用的手法として確立させることが本研究の目的である。実現のための技術的ポイントは3つある。直径100-800nmサイズの完全ナノ結晶作製技術の確立、デモ的な実験室レベルX線光源として放射光施設を用いての高効率集光化、そして、究極的信号バックグラウンドの低減対策を放射光施設で実現した。

研究成果の概要（英文）：

In 2000, we successfully conducted in vitro time-resolved X-ray observations of picometer-scale slow Brownian motions of individual protein molecules in aqueous solutions. In this single-molecule detection system, which we call diffracted X-ray tracking (DXT), we observed the rotating motions of an individual nanocrystal labeled to a specific site in individual protein molecules by using the time-resolved Laue diffraction technique. It is the purpose of this research that we perform the compact DXT instrumentation which enables measurement of the single molecule of this high precision pursuing method on a laboratory level. There were three technical points for realization. We succeeded in the new nanocrystal's production, x-ray condensing, and a background's reduction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	26,000,000	7,800,000	33,800,000
2011年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2012年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	34,600,000	10,380,000	44,980,000

研究分野：科研総合理工

費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノバイオサイエンス

キーワード：1分子イメージング・ナノ計測

1. 研究開始当初の背景

1980年代の終わり、可視光を用いた1分子計測法が登場して以来、1分子計測手法は大きく進展してきた。例えば、GFPがノーベル賞化学賞を取り、細胞内においても1分子計測が簡単にできる時代の到来を予感させた。しかし可視光を利用しているからには、一部の例外的利用(FRET等)を除けば、位置決定精度の限界は避けられない。nm精度以上を出すのはかなり難しく、注目する1分子が並進的な運動をするのであれば計測可能かもしれないが、分子内部の運動はほぼ不可能と言ってよい。そんな状況が1990年代後半からすでにあり、新しい方法論の登場(短い波長利用)が期待されていた。そんな中、研究代表者の佐々木はX線を用いた1分子計測法を考案(Y. C. Sasaki et al., Phys. Rev. E., 62, 3843-3847 (2000), Phys. Rev. Lett., 87, 248102-248105 (2001))し、ポリマー分子やDNA1分子の局所的な運動をミリ秒オーダー、ピコメートル精度で運動計測することに成功した。DXT法とは完全結晶に近いナノ結晶(直径20-30nm)を目的生体分子に標識して、目的分子の運動をナノ結晶の結晶方位の変化として検出するX線領域で唯一実現している1分子計測法である。計測される運動モードとして、回折斑点の運動が 2θ 方向(直径方向)と χ 方向(円周方向)に区別できるのも特徴である。原理検討後も、バクテリオロドプシンの光励起に伴う分子内構造変化計測や(Phys. Rev. E, 70, 021917-1-7 (2004))、X線放射圧の世界初の計測に成功し(Applied Physics Letters, 89, 053121 (2006))、抗原抗体反応の分子間相互作用によって分子揺らぎと分子間結合力が定量的に議論できるという「1分子カロリメトリー」を提案するに至っている(Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol.335, pp.770-775 (2007))。そして最近ではチャンネル分子として極めて重要なタンパク質のイオン透過開閉運動に伴うKcsA分子内部運動を世界で初めて実時間1分子計測した(Cell 132, 67-78 (2008))。現在、T細胞におけるMHC上のペプチド認識機構にペプチドの分子内部運動が極めて重要であることを示すデータを得ている。いずれの1分子運動計測もX線1分子追跡法の高精度性で初めて実現できた成果であり、この方法がより多くの研究者へ普及する形にまで進展させることは発明者の責任であると考えている。DXT最大の欠点は、重要ナノプローブである金ナノ結晶の作製法が特異的であることと、大型放射光施設を利用しなければミリ秒レベルの実時間計測が不可能であるという点だ。逆にこれを克服し実験室レベルの1分子計測が実現できたら、競争相手である可視光を用いた1分子計測と同様に多くの研究者が利用できる研究

手法となる。また実験室レベルの装置化が完成すれば、暗視野顕微鏡や蛍光顕微鏡そして原子間力顕微鏡等の金ナノ結晶を共通のプローブとしたコンパクト高精度1分子複合装置を実現可能にする。標識されたナノ結晶の全く違う観点からの位置計測が同時計測可能となる。

2. 研究の目的

1998年に大型放射光施設を用いたX線1分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking : DXT)を提案し、それ以来、ポリマーやDNA分子、抗原抗体反応、そして機能性膜タンパク質と分子内運動をマイクロ秒からミリ秒レベルで、かつピコメートルという超高精度で高速1分子計測してきた。この高精度1分子追跡法を実験室レベルで計測可能とする装置開発を行い汎用的手法として確立させることが本研究の目的である。実現のための技術的ポイントは3つ。直径100-800nmサイズの完全ナノ結晶作製技術の確立、実験室レベルX線光源の高効率集光化、そして究極的信号バックグラウンドの低減を実現する。

3. 研究の方法

以下の3つの方法を用いて目標を実現した。

- (1)大型完全ナノ結晶の作製法検討
- (2)信号強度の検討とバックグラウンド低減策
- (3)実践的に多くのサンプル系を計測し装置の複合化

4. 研究成果

現在までの2つの成果について報告する。
(1)コンパクトなX線1分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking : DXT)を確立させるために検出器系としてPILATUS 100 K (RIGAKU)を導入した。PILATUS 100 KはX線検出用に開発されたピクセルアレイ検出器であり、通常のCCDカメラと比べてX線の検出効率(8 keV, 99%)と高いダイナミックレンジ(20 bit)を持っている。PILATUS 100 Kを高エネルギー加速器研究機構のPF-AR, NW14AビームラインでDXT計測により検出器の評価を行った。X線は18 keVにピークを持つX線エネルギー幅が $\bullet E/E = 15\%$ 、繰返し周波数が794 kHzのX線源を用いた。X線のスポットサイズはサンプル表面上で $450 \times 100 \cdot \text{m}^2$ に調節した。検出器以外はこれまでのDXTと変えずに、通常高速CCDが設置されている自動ステージの上に固さを調節し、そのまま設置した。PILATUS 100Kのピクセルサイズは $172 \times 172 \cdot \text{m}^2$ で 487×487 pixels (受光面積: $83.8 \times 33.5 \text{ mm} \cdot$)となっており、これまで用いた高速CCDより受光面積が小さいのでX線のダイレクトビームを除いた同心円の半分のX線回折像のみ動画観測を行った。

サンプルは2種類用意し評価を行った。粘着フィルム上に散布した金ナノ結晶 50 nm~200 nm を評価サンプルとして、金ナノ結晶 (50 nm~200 nm) をラベルした apoPYP タンパク質を基板に固定したサンプルを実験サンプルとし、それぞれのサンプルの金ナノ結晶からの X 線回折像を取得した。X 線露光時間は 36 ms/frame とした。これまで主に用いてきた高速 CCD カメラ (C4880-10, 浜松ホトニクス) と比べて S/N 比が 5~10 倍以上改善された。また低角側には通常基板や空気からの散乱があり通常高速 CCD カメラでは S/N 比は落ちる。対照的に PILATUS 100 K は X 線エネルギーの閾値を決めることでエネルギーの低い X 線をカットすることができる。そのためバックグラウンドのノイズが大幅に軽減されたことにより全体的に S/N 比が向上した。またバックグラウンドの X 線散乱をカットすることが出来るので、カメラ長を長くして角度分解を向上することが可能である。X 線露光時間は 9 ms/frame に設定し、X 線アプソバーを外したカウントを上げた。S/N 比と受光面積を下げることなく時間分解能 10 ms 以下の X 線 1 分子計測が可能になった。

(2) 本予算によって作製された全反射ミラーの設置方法がルーチン化し、12 時間程度あればセッティングが完了し、X 線 1 分子追跡計測 (Diffracted X-ray Tracking; DXT) が可能なセットアップが終了することができる。これで現状でナノ結晶 50-70nm のサイズでタンパク質 1 分子の運動計測をビデオレイト (1 枚の画像を積算する時間が 30ms) の連続 2 秒間測定がルーチン的にできるようになった。この研究成果の意味は、世界のどこの放射光施設においても、ベンディングマグネット方式のビームラインにおいて、後付の X 線集光系を付加すれば、ビデオレイト DXT 測定が十分可能であることを証明したことになる。本 H24 年度から本格的な DXT を行い、今まで利用してきた SPring-8 の BL40XU との比較も定量的に行うことが出き、それをまとめて論文投稿しほぼ受理された (計測方法専門誌である Review of Scientific Instrumentation に)。演題は、Diffracted X-ray tracking (DXT) for monitoring intramolecular motion in individual protein molecules。特に、BL40XU と本開発で DXT 測定が可能となった BL28B2 とで X 線入射スペクトルが異なることによるバイオサンプルへのダメージ効果が定量化できることがわかった。これは極めて重要なデータになるので、定量化を急いでいる。基本的に BL28b2 は、入射 X 線のエネルギーバンドパス ($\Delta E/E$) が 82% で、BL40XU の 12% の 7 倍以上も白色性が含有されており、非常に大きな分子内運動を回折斑点として追跡できる利点を持ち合わせてい

るが、欠点としてサンプルに関係のない X 線波長を常時照射していることになる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Hiroshi Sekiguchi, Ayumi Nakagawa, Kazuki Moriya, Koki Makabe, Kouhei Ichianagi, Shunsuke Nozawa, Tokushi Sato, Shin-ichi Adachi, Kunihiro Kuwajima, Masafumi Yohda and Yuji C. Sasaki; ATP dependent rotational motion of group II chaperonin observed by X-ray single molecule tracking, PLOS ONE in press (2013) (査読有り)

[学会発表] (計 3 2 件)

① 松下祐福, 小園晴生, 星指健太郎, 一柳光平, 関口博史, 佐々木裕次, X 線 1 分子追跡法を用いた MHC 分子認識機構の解明、第 26 回放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム、2013. 1. 14、名古屋大学

② 徳江真紀, 関口博史, 星指健太郎, 小林寿珠子, Cai Weiyang, 下山よしこ, 西野有里, 八木直人, 太田昇, 宮澤淳夫, 久保泰, 佐々木裕次, アセチルコリン受容体のマイクロ秒 1 分子計測、第 26 回放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム、2013. 1. 14、名古屋大学

③ 一柳光平 1, 関口博史 2, 野澤俊介 3, 佐藤篤志 3, 足立伸一 3, 佐々木裕次 1, 表面に分子修飾した金ナノ結晶の熱伝導プロセス、第 26 回放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム、2013. 1. 13、名古屋大学

④ 星指健太郎 1, 関口博史 2, 一柳光平 1, 鈴木祥仁 1, 八木直人 2, 松尾龍人 2, 太田昇 2, 佐々木裕次 1, 2, X 線/電子線の水中単一ナノ結晶に対する放射圧とその応用、第 26 回放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム、2013. 1. 13、名古屋大学

⑤ 関口博史, 山本陽平, 有田真優乃, 一柳光平, 野澤俊介, 佐藤篤志, 足立伸一, 養王田正文, 八木直人, 佐々木裕次, タンパク質複合体・協同的運動の 1 分子解析、第 26 回放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム、2013. 1. 13、名古屋大学

⑥ 一柳光平, 川合伸明, 野澤俊介, 佐藤篤志, 中村一隆, 足立伸一, 佐々木裕次, 非線形弾性衝撃圧縮下におけるシリカガラスの中

間距離構造変化の観測、第 53 回高圧討論会、
2012. 11. 9 大阪大学

⑦一柳 光平, 関口 博史, 星野 真人, 梶原
健太郎, 野澤 俊介, 佐藤 篤志, 足立 伸一,
八木 直人, 佐々木 裕次、Development of
Diffracted X-ray Tracking measurement
system using various wide-band energy
X-ray sources 白色 X 線源を用いた X 線 1 分
子計測法の開発、第 50 回生物物理学年会、
2012. 9. 24、名古屋大学

⑧田中 裕介, 関口 博史, 佐々木 裕次, 東
隆親, 織田 昌幸 Dynamic structural and
antigen binding analyses of antibody
single-chain Fvs、第 50 回生物物理学年会
、2012. 9. 24、名古屋大学

⑨関口 博史, 中川 あゆみ, 守谷 和騎, 有
田 真優乃, 山本 陽平, 一柳 光平, 養王田
正文, 八木 直人, 佐々木 裕次、
Cooperative Motion Analysis of group II
Chaperonin at Single-molecule Level using
Diffracted X-ray Tracking X 線 1 分子追跡
法による II 型シャペロン協同性評価、第
50 回生物物理学年会、2012. 9. 23、名古屋
大学

⑩Y. SASAKI, H. Sekiguchi, K. Ichyanagi,
K. Hoshisashi, N. Yagi,
Multi-dimensional High-speed Single
Molecular Observations from Labeled
Gold-nanocrystal using X-rays and
Electron, GOLD2012、2012. 9. 7、京王プラザ
ホテル

⑪Yuji Sasaki、Diffracted Electron
Tracking for Single Molecular
Measurement; Time-resolved EBSD from
Labeled Nanocolloid in Aqueous Solution、
EBSD2012、2012.6.21、カーネギーメロン大学
(アメリカ)

⑫一柳光平、関口博史、野澤俊介、佐藤篤志、
足立伸一、佐々木裕次、時間分解 X 線回折
による金ナノ結晶の光誘起格子振動と熱緩
和過程の観測、ナノ学会第 10 回大会、
2012. 6. 14、大阪大学

⑬ Yuji Sasaki, Observation of MHC
Structural Changes Elicited Antigenic
Peptide using Deffracted X-ray Tracking,
Biophysical Society 56th annual meeting,
2012. 2. 25 、サンディエゴ アメリカ

⑭ Hiroshi Sekiguchi, Chaperonin-Ring's
Twist Is Critical for Folding Activity of

Group II Chaperonin, Biophysical Society
56th annual meeting,
2012. 2. 25 、サンディエゴ アメリカ

⑮ Kohei Ichyanagi, Laser pump
diffracted X-ray tracking (Laser-pump
DXT) for single molecule measurement of
rotational motion in reaction with
photoindissociated ATP, Biophysical
Society 56th annual meeting,
2012. 2. 25 、サンディエゴ アメリカ

⑯佐々木裕次、1 分子計測学の行方と新光源
の利用、第 25 回日本放射光学会年会 放射
光科学合同シンポジウム、2012. 1. 9、鳥栖市
民文化会館

⑰一柳光平、関口博史、野澤俊介、佐藤篤志、
足立伸一、佐々木裕次、Caged-ATP とパルス
レーザーを組み合わせた光励起 X 線 1 分子
計測法の開発、第 25 回日本放射光学会年会
放射光科学合同シンポジウム、2012. 1. 9、鳥
栖市民文化会館

⑱関口 博史, 中川 あゆみ, 守谷 和騎, 養
王田 正文, 佐々木 裕次、X 線 1 分子追跡法
による II 型シャペロンの高精度動態解析、
第 49 回日本生物物理学年会、2011. 9. 17、
兵庫県立大学

⑲ Hiroshi Sekiguchi、Torsional Motion
Analysis of Group II Chaperonin Using
Diffracted X-ray Tracking 、8th European
Biophysics Congress、2011. 8. 25、ブダペス
ト ハンガリー

⑳K. Ichyanai, N. Kawai, S. Nozawa, T. Sato,
S. Adachi, K. G. Nakamura, Y. C. Sasaki,
“Time-resolved single-shot X-ray
scattering measurement of shocked
amorphous materials”, Thermec 2011,
2011. 8. 1, Quebec, Canada.

[図書] (計 1 件)

① Y. C. Sasaki, Picometer-scale Dynamic
X-ray Imaging, Chapter 1,
FUNDAMENTALS OF
PICOSCIENCE edited by Klaus D.
Sattler, CRC Press, Taylor & Francis
Group in press (2012)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

一柳 光平 (ICHIYANAGI KOHEI)

東京大学大学院新領域創成科学研究科・
助教

研究者番号：70435618

(H22→H23)

関口 博史 (SEKIGUCHI HIROSHI)

東京大学大学院新領域創成科学研究科・
特任助教

研究者番号 00401563

(H22→H23)

八木 直人 (YAGI NAOTO)

高輝度光科学研究センター・利用研究促進
部門・副部門長

研究者番号：80133940

(H22→H23)