

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26600140

研究課題名(和文) マイクロ回折粒子を用いた中性子1分子追跡法の実現

研究課題名(英文) Diffracted Neutron Tracking using labeled micro-crystals

研究代表者

佐々木 裕次 (SASAKI, YUJI)

東京大学・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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：直径マイクロメートル以下の中性子回折する微結晶を目的分子に標識し、秒レベルの時分割で中性子1分子追跡法(Diffracted Neutron Tracking :DNT)を実現することを目標に研究を進めてきた。同様の発想でX線及び電子線において1分子追跡法はすでに実現させており、本研究成果で3大量子ビームを用いた1分子追跡法が完成させることになる。標識可能なナノ結晶の素材を決定するために、金ナノ結晶とダイヤモンド結晶の中性子回折評価を行った。その結果、直径0.1ミクロンのダイヤモンド結晶の方が、非常に高感度であることをJ-PRAC (NOVA BL21)での実験で証明できた。

研究成果の概要(英文)：Time-resolved Diffracted Neutron Tracking (DNT) can observe dynamical single molecules by using labelled micro-crystals. Until now, we're successful to observe dynamical single molecules by using X-rays and Electrons. Single molecule tracking techniques using 3 big quantum beams will make them be completed by this study result. In order to decide the material of detectable and labelled micro-crystal, the neutron diffraction of the gold micro-crystal and the diamond micro-crystal was performed. As a result, it was revealed that a crystal of a micro diamond (0.1 micron) was very sensitive by an experimental beam line of J-PRAC (NOVA BL21).

研究分野：量子ビームを用いた1分子計測学

キーワード：中性子 1分子 バイオサンプル

1. 研究開始当初の背景

タンパク質分子の機能発現に関する研究は、構造生物学的情報取得を中心に進んできました。しかし、今後は生体分子の安定な構造情報だけではなく、機能発現時における分子内部構造動態変化をモニターしなければなりません。1990年代から飛躍的に進展した可視光1分子計測は分子生物学を一変させ、構造揺らぎを伴う機械論的な機能発現メカニズムが根拠ある形で登場し始めました。本申請代表者の佐々木は1998年に当時主流であった可視光を用いた1分子計測手法よりも飛躍的に高精度性高速性を実現すべく、量子プローブの代表として、X線を用いた1分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking :DXT)を考案し、今まで多くの分子内運動計測に成功してきました(PRL,PRB, BBRC, Cell, PLOS One 等で発表)。原理的には非常に単純で、タンパク質分子の観察したい部位にナノ結晶(X線では直径20-40nm)を化学的に標識し、そのナノ結晶からのX線回折スポットを時分割追跡します。基本的に回転運動を観察していますが並進運動に換算するとピコメートル精度での位置決定で、現在最高速度で数百ナノ秒時分割観察も成功しています。例えば、可視光を用いた1分子計測技術では、神経系チャネル分子のように非常に極微小な構造変化でマイクロ秒の高速性を持った分子内部運動を計測することは不可能ですがDXTは計測に成功しています(論文投稿中)。中性子の場合も角度精度的な部分は同じですから精度としてはDXTと同レベルです。中性子の最大の利点はダメージゼロ。長時間の測定プローブとして理想的です。感度の悪い中性子という発想を高感度化できる唯一の標識ラベル法でどこまで打開できるかが鍵となります。J-PARCのフラックス量から考えると可能性が十分あります。

高感度に中性子回折する数十マイクロメートルの標識体を3種類(ダイヤモンドとシリコンとスーパーミラーのマイクロ化断片)作製し、秒レベルの積算で回折斑点を検出できることを確認します。フラックス計算ではバックグラウンドを非常に低く見積もると十分に検出できる計算となります。サンプル系としては、この回折マイクロ粒子を高分子により基板固定しその動画を計測することを目標とします。

2. 研究の目的

直径マイクロメートル以下の中性子回折する微結晶を目的分子に標識し、秒レベルの時分割で中性子1分子追跡法(Diffracted Neutron Tracking :DNT)を実現します。同様の発想でX線及び電子線において1分子追跡法はすでに実現させており、本研究成果で3大量子ビームを用いた1分子追跡法が完成します。X線1分子追跡法(Diffracted X-ray

Tracking ;DXT)では、1998年に本申請の佐々木裕次によって提案実証されて以来、多くの機能性タンパク質分子の機能に伴う分子内部動態計測を実現してきました。中性子をプローブに用いる最大の利点は、そのダメージレスです。これによりX線や電子線では全くできなかった長時間時分割測定が可能になります。

3. 研究の方法

平成26-27年度の2年間において2つの技術的な確立を成し遂げることによって夢の中性子による1分子追跡法が実現します(1)標識するマイクロ回折粒子作製法の確立(2)マイクロ回折粒子と1分子間での1対1対応反応の実現が主な実験目的となります。

4. 研究成果

直径マイクロメートルレベルの中性子回折する微結晶を目的分子に標識し、秒レベルの時分割で中性子1分子追跡法(Diffracted Neutron Tracking :DNT)を実現することを目指し研究を進めてきた。同様の発想で、X線及び電子線において1分子追跡法は、本申請の佐々木裕次によってすでに実現しており、本研究成果で3大量子ビームを用いた1分子追跡法が完成させることになる。

X線1分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking ;DXT)では、1998年に本申請の佐々木裕次によって提案実証されて以来、多くの機能性タンパク質分子の機能に伴う分子内部動態計測を実現してきた。電子線を用いた1分子計測(Diffracted Electron Tracking ;DET)もすでに実現している。

中性子をプローブに用いる最大の利点は、そのダメージレスである。これによりX線や電子線では全くできなかった長時間時分割測定が初めて可能になる。まずは、標識可能なナノ結晶の素材を決定するために、金ナノ結晶とダイヤモンド結晶の中性子回折評価を行った。その結果、直径0.1マイクロメートルのダイヤモンド結晶の方が、非常に高感度であ

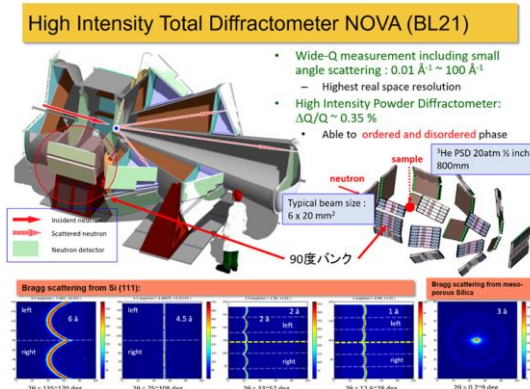


図1 : J-PARC (NOVA BL21)。非常にフラックスが高く理想的なBL

ることを J-PRAC (NOVA BL21)での実験で証明できた。

図1が利用した J-PRAC (NOVA BL21)である。90度バンクと呼ばれるバックグラウンドが非常に低い部分の検出系を主に行った。そのダイヤモンド結晶の回折パターンも図2に示す。

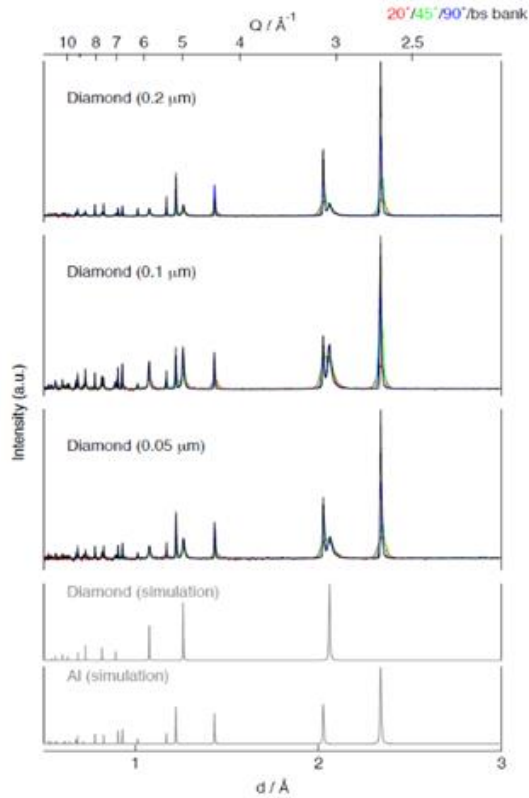


図2：三種類のサイズのダイヤモンド結晶の回折パターン。通常サイズが大きい方が回折強度となるが、直径が0.1μmのサイズが一番強度の強いパターンを示した。

他にも金結晶やシリコン結晶を用いて評価したが、図2のような明確な回折パターンを得ることができなかった。これは直径が0.1μmのサイズのダイヤモンド結晶が一番よいパターンを検出できたことは、中性子に対する単純な散乱断面積ではなく、それ自身の結晶性の良し悪しが非常に重要であることが割った。アルミニウムのパターンも示しているのは、中性子実験で溶液系の実験を行う場合は、カバーが必要で放射化しないアルミニウムやシリコンが良くサンプルホルダーに利用される。

図3は非常の高濃度の0.1μmのサイズのダイヤモンド結晶と低濃度の場合の回折パターンであり、濃度依存性は明確に確認することができた。これにより、サンプルホルダーのアルミニウムからの回折パターンと重ならないで高感度に検出できるのが、0.1μmのサイズのダイヤモンド結晶からの(022)と(113)のピークであることが分かった。次に、(022)の90度検出バンクのデータを図4に、(113)の90度検出バンクのデータを図5

Diffraction pattern

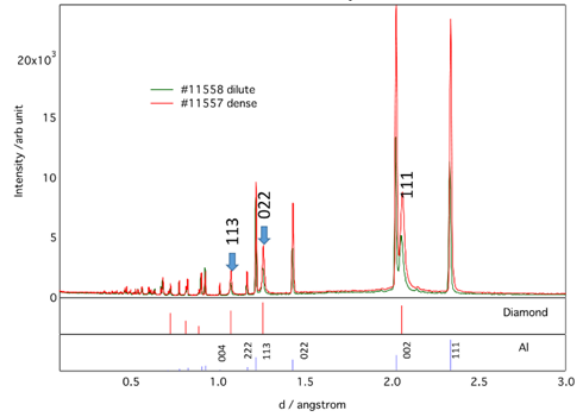


図3：ダイヤモンド結晶の回折パターンの濃度依存性

・90度検出器バンクのデータ

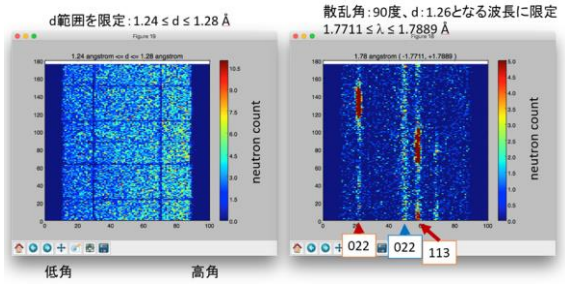


図4：ダイヤモンド結晶からの(022)のラウエパターンと回折パターン(1時間積算)

・90度検出器バンクのデータ

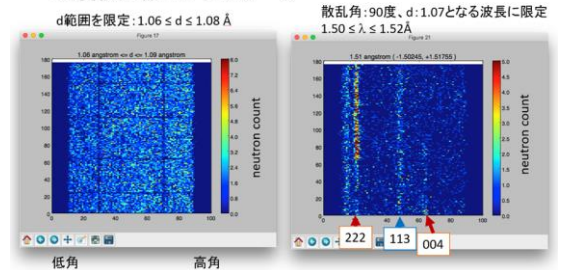


図5：ダイヤモンド結晶からの(113)のラウエパターンと回折パターン(1時間積算)

に示した。もし、0.1μmのサイズのダイヤモンド結晶の結晶性が極めて良質なものであれば、図4と図5でラウエパターンが検出できるはずであるが検出できなかった。つまり、それほど結晶性が良い訳ではないという結論となる。また、サンプルホルダーのアルミの回折パターンとか重なってはいないもののこの積算時間(1時間)でも強度不足が確認できた。

本実験の目標は秒レベルの測定であったので、このラウエ式の回折検出方法で1秒間の積算をしたのが図6である。ノイズと区別つかないフォトンしか検出できていないことが分かった。

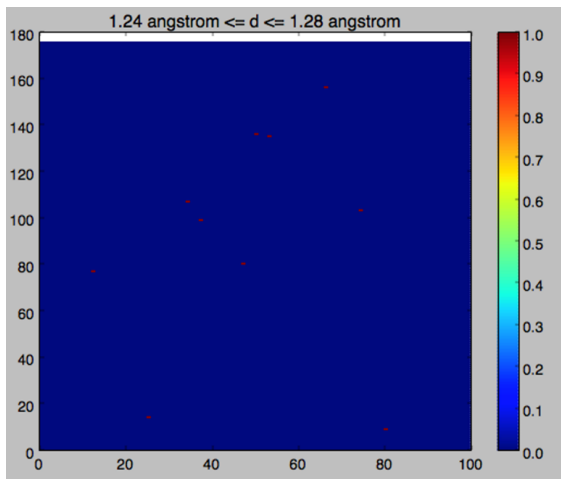


図6：ダイヤモンド結晶からの(022)のラウエパターン（1秒間積算）

結論

(1) 標識可能なナノ結晶の素材を決定するために、金ナノ結晶とダイヤモンド結晶の中性子回折評価を行った。その結果、直径0.1ミクロンのダイヤモンド結晶が、非常に高感度であることをJ-PRAC (NOVA BL21)での実験で証明できた。

(2) 直径0.1ミクロンのダイヤモンド結晶からの回折パターンで一番S/Nの良い条件を見つけてラウエ回折を実践したが、長時間の測定でも結晶の配向パターンが検出されなかったため、それ自身の結晶性も完全なモノではないことが分かった。

(3) X線1分子追跡法で単色のX線においても1分子の動的挙動を計測できる原理実験に成功したので、この原理を中性子でも使えないかと議論を始めた。萌芽研究期間内に1分子の動的挙動を実測できなかったことは残念であるが、プローブの設定、及び光源の単純化など大きな進展ができた。

今後の研究戦略

良質のナノ結晶を目的分子に標識して、その目的分子の動態特性を時分割的に測定する3つの量子ビームを用いた計測手法であるX線1分子追跡法DXT、電子線1分子追跡法DET、中性子1分子追跡法DNTは、プローブフラックスという意味では、一番難しいのはDNTであろう。今回の実験で、比較的結晶性の良いダイヤモンド結晶を利用することはできたがまだ、不十分であることが分かった。

今後の方針として、まずは数秒レベルの時分割中性子実験は、現状のビームライン特性では現実的でないことが分かったため、現在、進めているX線1分子追跡法DXTで単色の

X線においても1分子の動的挙動を計測できるという発想を基に、ナノ結晶の回折点の運動速度を積算的にモニターする方法に切り替えて実験を継続する予定である。

J-PARCの利用に慣れてきたので、より一層マシンタイムを確保して、この方針での実験を継続していく。

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0件）

〔学会発表〕（計11件）

Y.C.Sasaki, 3D Dynamical Observations of Single Molecule Motions by X-rays, Electron, and Neutrons, CFEL Seminar, Deutsches Elektronen-Synchrotron DESY, Center for Free-Electron Laser Science (FS-CFEL-1) Hamburg, Germany, 2015.4.23

Y.C.Sasaki, Single Molecule Observations by Quantum Beams (X-rays, Electron, and Neutron), DZNE (German Ctr. Neurodegen. Diseases) & CAESAR Research Ctr. Bonn, Germany, 2015.4.29

Y.C.Sasaki, 3D Dynamical Observations of Single Molecule Internal Motions by X-rays, Electron, and Neutrons, IKM-Seminar, Institute for Complex Materials, Dresden, Germany, 2015.7.21

Y.C.Sasaki, 3D Dynamical Observations of Single Molecule Internal Motions by X-rays, Electron, and Neutrons, Séminaire CIRI, Amphi Pasteur, LYON, France, 2015.9.25

Y.C.Sasaki, 3D Dynamical Observations of Single-molecule Internal Motions from Channels and Intrinsically Disordered Proteins, Synchrotron SOLEIL, France, 2015.9.29

Y. C. Sasaki, 3D Dynamical Observations of Single Molecule Motions by X-rays, Electron, and Neutron : Max Plank Institute, Mainz, Germany. 2014.11.11.

佐々木裕次、マイクロ秒X線1分子追跡法とその広域的利用、SPRING-8シンポジウム2014. 2014.9.13

佐々木裕次、X線による1分子内部動態観察の実現、第50回X線分析討論会 2014.10.30.

佐々木裕次、X線1分子追跡法とは？自治医科大学. 2014.12.3

Hiroshi Sekiguchi, Yuji. C. Sasaki Intra-molecule Motion of Functional Proteins at Single Molecule Level Using Diffracted X-ray Tracking, , Advanced Photon Sources (APS), Argonne National Laboratory, Argonne, USA. 2015.2.12.

佐々木裕次、量子ビームを用いた 1 分子動態計測からの機能解析、第 32 回 PF シンポジウム 2015.3.17.

〔図書〕(計 4 件)

著書・総説 H. Sekiguchi and Y. C. Sasaki, “Real Time Intra-molecule Motion of ligand-gated ion channel at Single Molecule Level”, SPring-8 Research Frontiers 2014, page34-35, ISSN:1349-0087 (2015)

著書・総説 ピコ秒時間分解 X 線回折法を用いた金ナノ結晶内における光誘起コヒーレント振動の直接観察、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、表面科学 35, 371 (2014)

著書・総説 X 線 1 分子追跡法を用いたタンパク質分子部内動態観測、一柳光平、関口博史、佐々木裕次:放射光 27(3) 158-165 (2014).

著書 『機能構造科学入門—3D 活性サイトと物質デザイン』監修、大門寛、佐々木裕次

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://sasakilab.k.u-tokyo.ac.jp/>

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

大友季哉 (OTOMO Toshiya)
高エネルギー加速器研究機構 物質構造科
学研究所・教授
研究者番号：90270397

(3)連携研究者

()

研究者番号：