

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15030

研究課題名(和文)蛋白質の1分子動態計測法に最適化した半導体X線検出器の開発

研究課題名(英文) Development of SOI detector adopted for recording single molecular dynamics of proteins

研究代表者

清水 啓史 (Shimizu, Hirofumi)

福井大学・学術研究院医学系部門・講師

研究者番号：50324158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：X線1分子動態計測法は、蛋白質に金ナノ結晶を観測プローブとして取り付け、放射光白色X線を観測光として照射して、蛋白質の構造変化を金ナノ結晶からの回折点の運動として計測する1分子計測法である。従来の観測器では1ピクセルのサイズが大きく、大きな運動を追跡しきれない場合があるため、ピクセルサイズを小さくできる半導体検出器技術(SOI)を用いたセンサーが1分子動態観測システムに利用可能かどうかを検証した。

研究成果の概要(英文)：Single-molecular conformational changes of proteins have been recorded by diffracted X-ray tracking method in which the diffraction spots from a gold nanocrystal, attached to the protein, were tracked on the two dimensional X-ray detector. In some cases the entire motions were not recorded because the size of X-ray receiving surface was insufficient. Aiming to resolve this issue we examined whether the Silicon-On-Insulator (SOI) sensor whose pixel size is very small (~17micron) can be used for or not.

研究分野：生物物理学・生理学

キーワード：1分子計測 X線回折 蛋白質

1. 研究開始当初の背景

X線1分子動態計測法は、金ナノ結晶を観測プローブとしてイオンチャネル蛋白質に固定し、放射光白色X線を観測光としてイオンチャネル分子の構造変化を金結晶からの回折点の運動として動画記録する(図1)。蛋白質の運動を追跡できる観測範囲はX線のスペクトル範囲と観測器の観測可能領域サイズ、および観測器のピクセルサイズによって規定される。X線のスペクトル範囲については、白色X線集光ミラーを放射光施設に導入することで解決した。残る課題は、広い範囲を計測できる観測器の開発である。既製品として利用可能な検器は受光面積が小さい(解像度が悪いピクセルサイズ:80ミクロン~170ミクロン)ため、大きな構造変化を追跡しきれない問題があった。一方、半導体X線検出器(SOI)はピクセルサイズが小さい(17ミクロン)ため、同一面積であれば高解像度の観測器が作製できる可能性があった。

2. 研究の目的

本研究では蛋白質の1分子動態計測の観測範囲を広げることが目的として、17 μm とピクセルサイズの小さい半導体X線検出器(SOI)の特性評価を行うことを目的とした。開発標準品(512 \times 832 pixel、図2)を用いて、センサーのX線エネルギー依存性を計測し、センサー部の設計の妥当性を評価する。評価に基づいて1024 \times 832 pixelのセンサーを作製する。我々が作製に成功した、金ナノ結晶の回折像を計測し、検出可能性を評価する。また、X線のエネルギー情報を保持しているSOIの特長を生かしてデータ解析を行い、背景ノイズを除去する計測が可能かどうかを検討する。また、エネルギー情報から各回折点の結晶面を決定する。SOIセンサーの試作は高エネルギー加速器研究機構の新井教授のご協力を得て行う。

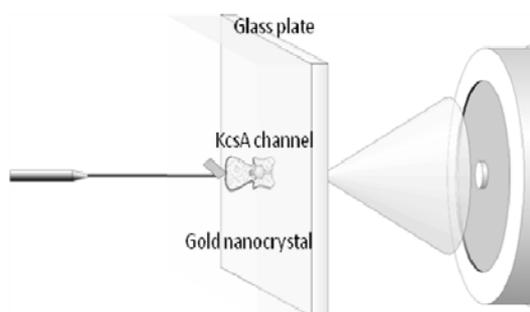


図1.1 分子動態計測システムの概要

蛋白質に金ナノ結晶を観測プローブとして付加する。X線照射により回折点の運動を記録する。

3. 研究の方法

SOI技術を用いた半導体X線検出器の受光部の開発標準品(図2:512 \times 832 pixel)をセットした観測用読み出し基板を用いて観測する。SPRING8(BL28B2)に白色X線集光ミラーを導入し、ミラー調整モーター機構によって集光角を決定して計測した。観測試料としては、基板上に高真空中で成長させた金ナノ結晶、およびSi(111)結晶を用いる。Si結晶については $\theta-2\theta$ 回折計上に固定し、回転させることで、X線のエネルギーを選択して回折点の計測を行った(図3)。

また、観測範囲を広げるため、センサーチップを2枚使用した1024 \times 832 pixelの検出システムを試用し、受光面の大面積化によって生じる課題について検討した。

いずれのSOIセンサーを用いた観測においても、ビームラインで観測する際のジグの製作、および観測、観測データの解析について新井教授のグループの三好敏喜講師、三井真吾博士、西村龍太郎氏と共同で行った。

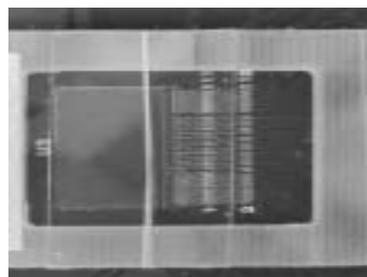


図2 SOI 検出器の受光部

512 \times 832 ピクセルの解像度を持つ開発標準品センサー部分。サイズは10mm \times 15mm。

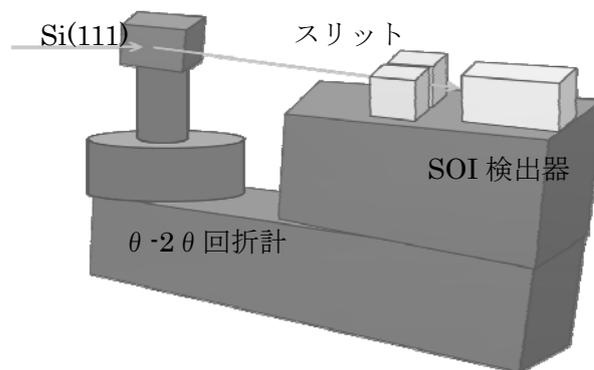


図3 X線計測システムの概要

Si(111)結晶によって分光したX線を下流に設置したSOI検出器によって計測する。

4. 研究成果

まず初めに X 線 1 分子動態計測法で用いる金ナノ結晶からの回折点の計測を行った。観測光は動態計測法に用いる X 線照射条件と同一とするため、集光ミラー角度、X 線の輝度を調整する金属アテニューエータ、X 線の照射面積を調整するスリット幅を調整した。また、標準的な金ナノ結晶試料と動態計測法で通常使用している高速 X 線検出器を用いて動態観測と同一条件（観測速度～ms）で回折点が観測できることを確認した。SOI センサーを搭載した読み出しボードを、製作したジグで固定し、確認された回折点が受光面に入るようにカメラと試料の距離を調整した。露光時間を調整し、サブミリ秒時間分解能の計測と同等の条件での計測とした。その結果、SOI センサーでナノ結晶からの回折点の観測に成功し、SOI センサーが観測に応用可能であることが明らかになった。

次に、Si 結晶を用いて Si 結晶の回折点を計測した。 $\theta - 2\theta$ 回折計上に Si 結晶と SOI 観測器を置き、Si 結晶からの回折点を計測した（図 4）。Si 結晶からの回折点を Si 結晶の角度を変えながら観測した。1 フォトン毎の X 線エネルギー評価のため、十分に輝度を落とした X 線を用いて観測し、センサーで捉えた回折 X 線のエネルギー分布を計測・解析した。その結果、想定していたエネルギー分布に比べて広い分布となり、エネルギー分布の解析に利用するには、センサー部位の冷却等の工夫が必要であることが示唆された。

最後に、センサーチップを 2 枚使用した観測システムで計測を行った。受光面積が大きくなったことで、回折点の計測可能領域は広がったが、現状のデータ読み出しシステムの場合、読み出し速度が 1/2 となるため、動態計測に使用するには読み出しシステムを含めた開発が必要であることが明らかになった。一方で、センサーチップの配置方法を検討することで、最大 4 枚のセンサーを利用し

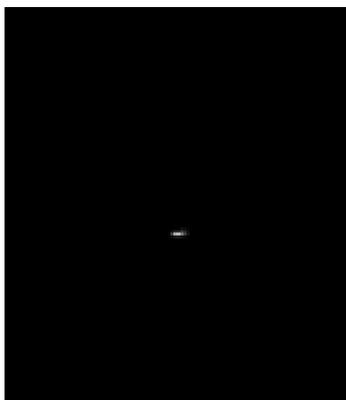


図 4. SOI 検出器で観測した回折点の例
Si(111)結晶によって分光した X 線を下流に設置した SOI 検出器によって計測した。

た 1703936 pixel の観測システム開発が可能であることが分かった。

本研究の成果により、1 分子動態観測システムに応用するための SOI 観測システム開発には、センサー設計における高速連続読み出しへの対応、マルチセンサー配置ボードの設計、高速読み出しプログラムの開発が必要であることが明らかになった。これらのシステム開発は、単独研究の予算範囲を超えるため、SOI 観測器開発研究全体の進展状況を注視しつつ、研究への応用の可能性を探索したい。

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 4 件）

①Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto
Temperature-Jump effects on the single molecular dynamics of the KcsA Potassium J. Physiol. Sci. 67 Suppl S118 2017 査読無

②Kio Tahara, Yoshikazu Hirai, Hirofumi Shimizu, Toshiyuki Tsuchiya, Osamu Tabata., ‘Photoresist Micro-Chamber for the Diffracted X-ray Tracking Method Recording Single-Molecule Conformational Changes’ Procedia Engineering 168 (2016) 1394 - 1397 査読有

③Y. Furutani, H. Shimizu, Y. Asai, S. Oiki, H. Kandori., ‘Specific interactions between alkali metal cations and the KcsA channel studied using ATR-FTIR spectroscopy’ Biophys. Physicobiol. 12(2015) 37-45 査読有

④A. Yamakata, H. Shimizu, S. Oiki., ‘Surface-enhanced IR absorption spectroscopy of the KcsA potassium channel upon application of an electric field’ Phys Chem Chem Phys. 17 (2015) 21104-21111 査読有

〔学会発表〕（計 7 件）

①清水啓史、岩本真幸
「KcsA カリウムイオンチャネルの 1 分子運動に対する試料温度ジャンプの影響」第 94 回日本生理学会 2017 年 03 月 28 日～30 日 アクトシティ浜松（静岡県 浜松市）

②Hirofumi Shimizu
‘Single-Molecule Fluctuations and Conformational Changes of KcsA Potassium Channel’ The 8th Japan-Taiwan symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会) 2017 年 03 月 16 日～18 日, Academia Sinica, Taiwan

③清水啓史、岩本真幸

「X線1分子動態計測法への試料温度ジャンプシステムの導入」第54回日本生物物理学会 2016年11月25日～27日 つくば国際会議場（茨城県 つくば市）

④Kio Tahara, Yoshikazu Hirai, Hirofumi Shimizu, Toshiyuki Tuchiya, Osamu Tabata,

‘Photoresist Micro-Chamber for the Diffracted X-ray Tracking Method Recording Single-Molecule Conformational Changes’ The 30th EUROSENSORS (EUROSENSORS XXX) (国際学会) 2016年09月04日～07日 Budapest, Hungary

⑤清水啓史

「イオンチャネルの1分子構造変化計測」
第一回イオンチャネル研究会（招待講演）
2016年07月07日～08日 福岡大学（福岡県 福岡市）

⑥清水啓史

「蛋白質の分子揺らぎと構造変化を計測するX線1分子動態計測法の開発」第53回日本生物物理学会年会，シンポジウム「動的構造生命科学を拓く新発想測定技術」（招待講演）2015年09月13日～15日 金沢大学（石川県 金沢市）

⑦田原樹生，平井義和，清水啓史，土屋智由，田畑 修 「3次元微細加工技術を応用したX線1分子動態計測用低ノイズマイクロチャンバの開発」電気学会総合研究会 E部門総合研究会 2015年07月02日～03日 九州大学医学部百年講堂（福岡県 福岡市）

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

○取得状況（計 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 啓史 (Shimizu, Hirofumi)
福井大学・学術研究院医学系部門・講師
研究者番号：50324158

(3) 連携研究者

新井康夫 (Yasuo Arai)
高エネルギー加速器研究機構・教授
研究者番号：90167990