

戦略的創造研究推進事業CREST
研究領域「生命現象の解明と応用に資する
新しい計測・分析基盤技術」
研究課題「高精度1分子内動画計測から見える
生体分子構造認識プロセス」

研究終了報告書

研究期間 平成18年10月～平成24年3月

研究代表者:佐々木裕次
(東京大学大学院 新領域創成科学研究科 教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

タンパク質分子が機能発現する際に起こる分子内部の構造変化情報をマイクロ秒の高速性で、かつÅ以下の高精度性を持って1分子検出することは、多くの生命現象の素過程を理解する最善策である。着目した1分子からの動的構造情報を *in vivo* において究極的に高感度計測する。理想的には装置が実験室規模で、本研究の最終目的の1つはこの究極的1分子計測システムの実現にある。位置決定精度を高精度にするために、超短波長プローブであるX線や電子線を用いる。本研究では考案したX線1分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking: DXT (基本特許申請済))を現状のミリ秒からマイクロ秒レベルまで高速化する。また X 線を電子線プローブに代用し、装置規模を大型放射光施設から実験室レベルまで落とし計測装置のコンパクト化を実現し、回折情報を追跡することで動的な3次元情報を得るという計測方法の普及に努める。電子線1分子追跡法(Diffracted Electron Tracking: DET(基本特許申請済))では数十ミリ秒の3次元動画計測を目標とした。本研究では主に上記2つの新しい計測法(DXT&DET)の高度化を進めるための基盤技術開発を進めた。5年間の主な研究成果としては DXT 及び DET に関連する基盤技術の確立に関して4課題、AChR 系の分子変化計測に絡んだ成果2課題、Group II chaperonins の ATP 結合に伴う3段階の分子内構造変化計測、Peptide/MHC 系における分子内構造変化計測に絡んだ成果3課題、X線放射圧の合力発生の確認、そして DET により電子線により励起された流体の存在を確認できた。以上12件について簡単に下記に説明する。

DXT 及び DET 計測技術関連では、DXT の測定可能なビームラインが CREST スタート時は1ヶ所だったが、終了時までには3か所(BL40XU(SP-8), BL28B2(SP-8), AR-NW14A(KEK))に増強させた。BL40XU はナノ秒までの高速 DXT 用、BL28B2 は通常のミリ秒時分割計測及び比較的大きな運動をモニターする系用、KEK の NW14A は、高速可視レーザーパルス励起を行える DXT(caged や光励起型タンパク質)用として区別して利用する体制が整った。ナノ結晶の作製にも躍進があり KCl(100)を用いた新規なより良質な結晶作製に成功した。高速計測の検出器系ではイメージングインテンシファイヤーと CCD 及び CMOS カメラの組み合わせに関する最適化が確認され Tracking 計測ならナノ秒レベルの計測が可能であることを示した。また上記計測法の基盤技術として、DXT 用半自動解析ソフトの開発、細胞系への展開のためのナノ結晶安定化技術(界面活性剤を使用しない)、DET に関しては安定に真空中で隔膜を用いて水溶液薄膜を形成させて水溶液中での3次元分子内部運動が計測できるセルを完成させ、その標識に上記自作金ナノ結晶だけではなく、市販の金コロイド(利用最小直径 40nm)も利用が可能であることを確認した。これは DET の普及と言う観点からある意味「大発見」である。

数多くの重要なタンパク質分子の機能に絡んだ分子運動計測にも DXT は成功した。極めて重要な膜タンパク質 AChR 系では、AChBP と AChR の分子内構造変化を比較しながらリガンドの ACh が反応した時と Toxin である α -Bungarotoxin との反応時の比較より、tilting/rotating 混合運動という今までモデルとして予測されてこなかった分子内運動がチャンネル開閉運動に関与していることを定量的に示すことができた。また AChBP においてナノ結晶の大きさに依存した分子内運動の存在も確認できた。これは今後貴重な Force curve 的な運動評価法に発展させることができるかもしれない。定量的な計測手段であるX線の利点が発揮できるかもしれない。次に非常にダイナミックな分子運動が予想されているタンパク質分子のフォールディングに関与する機能性分子である Group II chaperonins の ATP 結合に伴う分子内構造変化においては、クライオ電顕でモデルが提案されていたが、それに比べアロステリック的運動と非アロステリック的運動があることが分かり、ATP 結合時の分子内回転運動速度と ATP 加水分解(解離)時の回転速度が異なることを定量的に示すことができた。また、本 CREST での中心的な系として計測を行ってきた TCR/peptide/MHC 系における分子内運動計測と peptide/MHC 間の安定性や affinity、T 細胞活性との相関や、peptide/MHC 分子間の相互作用を変調させると言われてきた DM の動的な機能の発見など、極めて多彩な動的特性が「分子内運動計測」という非常に強力で定量化可能な因子との関係を明らかにできたことは画期的だった。また、ここではこれら得られた1分子情報と対比できるマクロ系実験系データとしてナノ秒レベル蛍光寿命測定を検討し素晴らしい相関があることも確認した。今後の DXT の高速化の Motivation にもなる重要な対比実験である。

加えて2006年に佐々木が世界で初めて確認したX線放射圧にも進展があった。DXT高速化のおかげで溶液中を自由にブラウン運動している金ナノ結晶からのX線回折を詳細に解析できた。その結果、放射圧の合力の存在が確認された。合力は **Trapping** の可能性を示唆しており本格的なX線放射圧の利用も検討できることになる。そして、電子顕微鏡を基本にしたDETにおいて、市販金コロイドを用いた3次元分子内部運動追跡計測の原理実験に成功し、電子線励起方向に沿って異方的な流体励起が存在していることも確認された。金コロイドの利用が可能になったことは非常に重要な発見である。このように溶液の局部流体が測定できるということは、逆の意味でナノ結晶をタンパク質分子に標識しなくても、タンパク質の構造変化に伴う局部流体が発生するとすれば、それを検出できる可能性が出てきたことになる。新しい非標識分子内運動計測デバイス設計のヒントとなる成果である。

(2) 顕著な成果

1.

概要: nAChR 及びそのリガンド結合部位のホモログである AChBP に DXT を適用した。100 μ s の時間スケールで計測をすることで分子内部運動の可視化に成功した。得られた運動パターンは **rotation** と **tilt** がステップ的に現れる運動であった。この運動が観測される確率はまだそれほど高くないが、**rotation** と **tilt** の両方の運動が重要であることは間違いない。非常に注目されている ACh 系において世界初の分子内運動計測である。

2.

概要: T 細胞受容体(TCR)と組織適合性抗原(MHC)の認識機構解明のために DXT 計測した。リガンドとして I-Ak と I 型糖尿病を起こす I-Ag7 を選んだ。その結果、ペプチドが MHC とは独立に運動することが確認でき、その運動が日単位で経時的に減少していくことも分かった。次にペプチドの回転運動と T 細胞の活性化がほぼ相関することを見出した。ペプチドが動くことにより準安定状態を作り、それを TCR が認識するという全く新しい認識機構が示唆された。

3.

概要: DET では従来の自作金ナノ結晶の代わりに市販金コロイドを用いて良好な電子後方散乱回折像(EBSP)の取得に成功した。これは全く期待していなかった成果で、本計測法を汎用法として広めるプレクスルーである。金コロイドで水中のブラウン運動を計測した結果、金ナノ結晶より大きな運動として捉えられ、更には金ナノ結晶では捉え切れなかった電子線による局部励起が基因する3次元の異方性を持つ運動性が確認された。3次元1分子計測技術が確立したことになる。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

機能性生体高分子が機能発現する際に起こる分子内部の構造変化情報を高速で高精度に1分子検出することは、多くの生命現象の素過程を理解する最善策である。得られる構造情報は原子サイズ以下の精度、時分解能はマイクロ秒レベル、1分子からの情報を in-vivo において高感度計測する。理想的には装置規模が実験室レベルであること、それが究極的1分子計測の理想像であり本研究構想の目的はこの究極的計測システムを実現することにある。本研究は以下の7つのテーマに集中して研究が遂行される。(1) X線1分子追跡法の高速化、(2) ナノ結晶完全結晶化、(3) 電子線1分子追跡法の開発、(4) 走査型X線放射圧顕微鏡の基礎検討、(5) 免疫系1分子計測、(6) 膜系1分子計測、(7) マイクロ秒1分子計測。以上7つのテーマに6つのグループが有機的に連携し効率的に研究を進めてきた。

(2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

久保GをCRESTスタート時期から数えて2年後に参加していただいた。以前DXTで測定していたKcsA(Cellに発表済)での実験から機能性膜タンパク質の次のターゲットを決めあぐねていた2年間であった。理由は予想以上の運動をチャンネルがしてくれないという点であった。KcsAも予想の範囲内の運動だった。その割には測定が非常に困難であった。しかし、周辺の研究領域の研究者と討論するとAChRはまだまだ運動の予想ができない分子であるとのことで、行う決心をした。その変異体系の実験経験があった久保Gに加わっていただいて、同じCRESTの宮澤チームの協力もえることができて、八木Gと共同開発した高速DXTで初めて確かな分子内運動の検出に成功した。

金川Gと小園Gと佐々木Gで行っていたMHC系の研究において、DXTのデータから分子認識モデルを立てることができたが、その評価を積極的にやるべきと糖尿病に関連する免疫系I-Ag7を加え、より一層実践的なモデル評価ができるようになり、予想していなかった運動や因子を確認することができた。1分子結果は疾病に直接絡む例が確立できる可能性も示唆できた。今後、疾病を意識した分子間相互作用に注目して研究を進める必要性も新たに感じることもできた。

分子内運動が予想されていてその結論を出すことが重要な局面のサンプル系にも出合った。シャペロニン(東京農工大学の養王田教授提供)というタンパク質分子であるが、電子顕微鏡で複数のスナップショットとつなぎ合わせて分子内運動を予想していたのだが、それをDXTで計測するとそのモデル化が正しいところとそうでない部分を明確にでき、私達自身もDXTの利点を再認識でき自信が持てる実験結果を得ることができた。電頭の3次元性と比較できるほどの次元性をDXTが持っていることが自分自身で分かったことは偉大である。違うドメインが同期して動くかどうかという判断もDXTはできる。これはアロステリック効果が実際に高速に測定できる可能性を示唆している。今後、そのような系の実験を進めたい。FRETよりも次元性の高い情報が取得できる等のDXTの利点の再考は今後素晴らしい進展が約束されたと思っている。

DETの開発において、この計測方法自身がEBSP(Electron Back-scattering Pattern 後方電子線散乱パターン)データを取得するという方法なので、DETの研究ではないが、多くの高感度EBSP計測が最近行われており、それらを考慮することでDETの可能性(特に感度や時分割性)を確認できた。また、グラフェンが炭素単分子でも安定に存在する(2010年ノーベル物理学賞)ということでこれをDETサンプルに使用すると3-4倍の信号強度になることが分かった。産総研の協力でその単層グラフェンをDETサンプルの真空と水溶液層との隔離を実現している隔膜に利用しようと現在挑戦している(3月に報告予定)。あのような究極的な膜が真空と水溶液と言う真空状態が全く異なる境界を安定に存在させることができれば、非常に面白い現象も今後見つかるかもしれない。グラフェンの応用としても非常にトピックス的である。是非実現したい。

高速運動計測を行っている佐々木Gと八木Gの討論の最終に、世界最高速のカメラでDXTをやったらどうなるだろう?という素朴な疑問をこのプロジェクト中に実現することができた。同じJSTの予算で開発された近畿大学の江藤教授が独自に開発した「江藤カメラ」である。CCD素子の中に画像の記憶部分を併用させることで、高速で伝送画像容量を飛躍的に増強した。最高速度100nsということで通常の画面サイズよりも4-5倍程度も大きいのは、DXTのように回折スポットでできるだけ一度に沢山検出して統計処理して議論する実験では生命線となる。「江藤カメラ」の利用で大量

の回折スポットを100ナノ秒で追跡することが可能となった。本研究で購入したPhotoronのC-MOSカメラと併用として μ sレベルの計測を一層集中的行っていく予定ある。

§3 研究実施体制

(1) 佐々木グループ (東京大学大学院 新領域創成科学研究科)

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
佐々木 裕次	東京大学大学院 新領域創成科学研究科	教授	H18.10～
一柳 光平	同上	助教	H21.2～
関口 博史	同上	特任助教	H21.8～
小野寺 百合	同上	技術補佐員	H21.4～
鈴木 祥仁	同上	大学院生	H22.4～
張 幸源	同上	大学院生	H22.9～
星指 健太郎	同上	大学院生	H22.9～

② 研究項目

- ・ 高エネルギー1分子追跡法確立と1分子計測周辺基礎研究

(2) 八木グループ ((財)高輝度光科学研究センター 利用研究促進部門)

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
八木 直人	(財)高輝度光科学研究センター	主席研究員	H18.11～
佐川 琢麻	同上	協力研究員	H19.5～H19.10
松尾 龍人	同上	研修研究生	H20.11～H22.3

② 研究項目

- ・ X線1分子追跡法の高速度化

(3) 石川グループ (日本大学文理学部物理学科)

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
石川 晃	日本大学文理学部	教授	H18.10～
小川 直樹	同上	助手	H22.4～
大崎 暁弘	同上	副手	H18.10～H22.3
葛西 拓也	同上	学部4年生	H19.4～H20.3
宮野 博紀	同上	学部4年生	H20.4～H21.3
広畑 泰久	同上	研究員	H20.4～
大本 美和歌	同上	学部4年生	H21.4～

② 研究項目

- ・ 電子線1分子追跡法の開発

(4) 金川グループ (東京大学大学院 新領域創成科学研究科)

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
金川 修身	東京大学大学院 新領域創成科学研究科	特任研究員	H18.10～
小川 直樹	理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター	研究員	H18.10～ H22.3
高瀬 光代	同上	テクニカル スタッフ	H18.10～ H22.3

② 研究項目

- ・免疫系1分子計測

(5)小園グループ (東京理科大学 生命科学研究所)

①研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
小園 晴生	東京理科大学	准教授	H18.10～
小園 裕子	同上	研究員	H22.4～
松宮 陽	同上	学生	H22.4～
蔣 冬	東京理科大学	学生	H20.4～H22.3

②研究項目

- ・免疫系分子認識プロセスの1分子動画計測

(6)久保グループ (独立行政法人 産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門)

①研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
久保 泰	産業技術総合研究所	部門長・グループリーダー	H20.10～
下山 佳子	同上	研究補助員	H20.10～H21.4
Cai Weiyang	同上	研究補助員	H20.10～
小林 珠寿子	同上	研究補助員	H21.4～H22.3

②研究項目

- ・膜系1分子計測

§ 4 研究実施内容及び成果

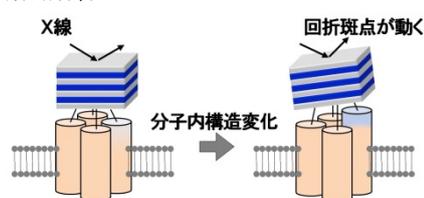
本研究は以下の7つのテーマに集中して研究が遂行されてきた。(1) X線1分子追跡法の高速化、(2) ナノ結晶完全結晶化、(3) 電子線1分子追跡法の開発、(4) 走査型X線放射圧顕微鏡の基礎検討、(5) 免疫系1分子計測、(6) 膜系1分子計測、(7) マイクロ秒1分子計測。各グループにおける研究成果を要約する。

4-1 佐々木グループ(東京大学大学院 新領域創成科学研究科)

(1) 研究実施内容及び成果

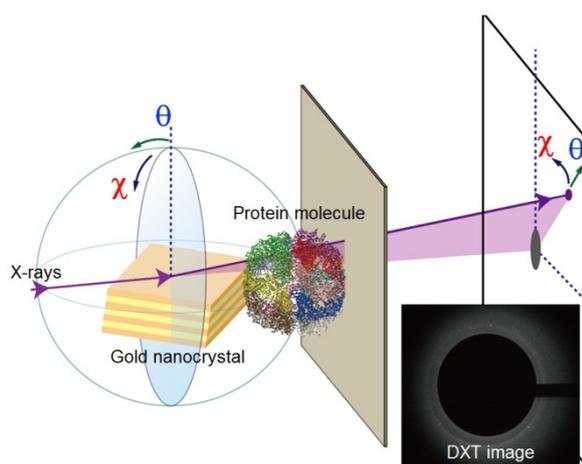
①研究のねらい: X線1分子追跡法の高速化と1分子周辺技術構築

下記の討論を理解しやすくするためにも今後討論されるDETとDXTの原理について簡単に説明しておく。1分子計測で位置決定精度 pm(nm/1000)が実現すれば、タンパク質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というのが基本的なモチベーションであった。そこで、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 X 線1分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking: DXT)で1分子



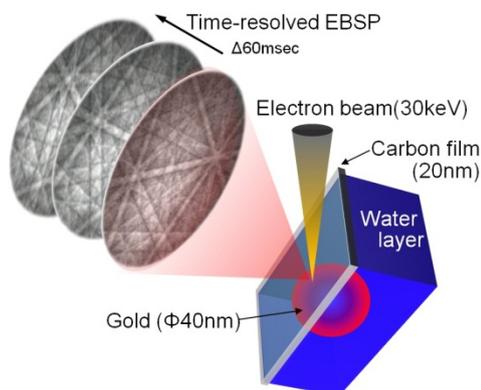
原理図1: DXTの原理図

検出できると考えた。DXT のアイデアは単純です(原理図1)。直径数 nm 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し、標識結晶からの X 線回折斑点を指標に、着目したタンパク質分子の動きを時分割的に追跡する。目的 1 分子の一部に構造変化が起こるとその部位に標識されているナノ結晶が分子内部の構造変化と同期し方位が変化し、ナノ結晶からの回折斑点の位置が動く。次元性と特長としては、原理図2のように θ 方向と χ 方向を全く独立な次元として測定されるので、3次元的な運動へ帰属することも可能となる。タンパク質分子が基板に原理図1のように垂直に基板固定(基板上への垂直固定はルーチンのように可能)した場合は、その垂直方向に平行に微小振動している運動(tilting)しているのが θ 方向に回折スポットが運動する方向で、タンパク質の面内に(垂直方向に対して垂直な面(細胞膜面内))における回転運動(rotating)に帰属されるのが、 χ 方向の回折スポット運動に対応する。



原理図2: DXT原理(θ と χ 軸を独立に測定できる)

このDXTの最大の欠点は、大型放射光施設を使わなければ、時分割的なデータを取ることができない点だ。これを補うアイデアとしては放射光施設の代わりに物質との断面積の大きい電子線を利用する計測法がある。原理図3にその装置構成の簡略図を示す。DXTではナノ結晶の運動を回折点として検出していたが、DET(Diffracted Electron Tracking)ではEBSPと呼ばれるナノ結晶からの2次元回折パターンを追跡することになる。DXTが点として表れていたものが、DETでは2次元パターンとして表れる理由は、電子線の方がX線よりも物質に対する相互作用が3桁程度大きいので、非弾性的な信号も複雑に絡み合い2次元パターンとなる。従ってその情報を解析することでナノ結晶の3次元的な方位情報を



原理図3: DETの原理図

取り出せることが利点となる。DXTでも θ 及び χ 方向の運動は独立にモニターでき、その回折斑点は時として、別の場所に同じナノ結晶から点として検出することが稀にあるが、これは確率的にも経験的にも極めてまれであり、よってナノ結晶の3次元方位を同時に DXT で決定することはほぼ不可能と言える。この EBSP 検出は電子顕微鏡技術としては古く歴史があるが、本目的のように標識されたナノ結晶の方位を高速で測定することを目的に EBSP を極めて高感度に測定することへの努力は全くされてこなかった。従って、検出系 CCD カメラ前にイメージングインテンシファイヤーを挿入した高感度検出系の構成は世界初の試みとなった(感度が上がるかどうか不明であった)。既存の技術が既にある、このような可能性を示すことが重要である点においては、DXT よりも DET を提案することの方があるかにインパクトがあると思われる。

②研究成果

(a) ナノ結晶の完全結晶化(X線利用と電子線利用から分かった事):

本研究の最大の特長は、放射光という大型施設を利用したX線 1 分子追跡法 (Diffracted X-ray Tracking: DXT)の最大の欠点を克服する可能性のある電子線 1 分子追跡法 (Diffracted Electron Tracking: DET)の研究を併用して進めている点にある。当初は単純にマシンタイムが 30-100 倍程度に増加できると考えていたが、上記二手法のプロープの特性差異をしっかり意識しなければならないことを再認識する結果を得る事ができた。X線と電子線の最大の違いは各エネルギーにおける Mean free path (平均自由行程)である。X線は例えば 30keV(0.4 Å)では金を1mm以上に渡って透過するが、電子線の場合はたった 30 Å進むと強度は半減する。この特性を利用すると、本 1 分子計測法の中心的重要技術であるAuナノ結晶の表面構造評価とバルク構造評価を区別して行う事が可能となる。当初はその区別すら必要とは考えていなかったが実際の実験結果は意外なものであった。結果的にDETの用いるナノ結晶作製条件とDXTのそれとはかなり違う事が明らかになった。DETの場合は、アニーリング温度400度(アニーリング時間は 2 時間)であるが、DXTの場合は、アニーリング温度450度(アニーリング時間45分)であった。注目する点は、DXT最適条件で作製されたナノ結晶の表面結晶性がアニーリング温度を上げているにも関わらず劣化している点である。常識的にナノサイズの薄膜や粒子の結晶性はアニーリング温度を上昇させればさせるほど良好になる。しかし、形状がその温度に依存して変化するために各目的の実験によって最適アニーリング温度は異なってくる。ここで予想されるKCl 上の金ナノ結晶の結晶性向上メカニズムは図 2 のようになる。これは全く予想していなかった。従来のエピタキシャル成長に関する研究は通常電子顕微鏡下で行われてきた。また数 nm サイズの現象に注目され、数十 nm サイズの表面以外の現象にはそれほど注意されてこなかった。その間隙をぬった結晶成長プロセスのように思われる。より詳細な結晶成長に関する研究を電子線だけではなく、X線やAFM等の複合的な評価法を用いて行っていかなければならないことが再認識できた。

ナノ結晶の結晶化をより完全なものに近付けるための研究も欠かせない。現在、完全結晶化のためのアニール時の高温処理において、隣接するナノ粒子間の融合によって粒子が肥大化し、目的の 1 分子計測用のナノ結晶にそぐわないという問題点がこの完全結晶化最大の障壁となっている

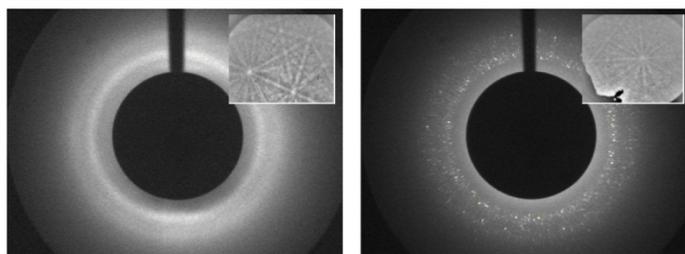


図1: 左は基板加熱温度375度の時の金ナノ粒子からのラウエパターン。全く回折スポットが確認できない。しかし、電子顕微鏡で確認した回折パターン(EBSP)はかなり良質の結晶がナノ粒子表面に存在することを示す。右は基板加熱温度475度の時のラウエパターン。かなり大量な回折スポットが確認できる。しかし、電子顕微鏡で確認した回折パターン(EBSP)はあまり良質とはいえない。ちなみに、525度程度になるとNaCl基板上的ナノ粒子はほとんど蒸発してしまう。

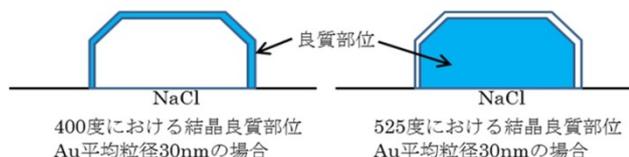


図2: 上記データから類推されるNaCl基板上で起こっている結晶成長プロセス。X線と電子線の研究を併用することで初めて明らかとなった。

る。解決策はアニーリング現象の低温化という事であるが、この技術はフェムト秒レーザーを用いたレーザーアニーリング技術として、Si元素系で確立しており、これを金系に適用すべきであると判断し、最近その予備実験を開始した。レーザー強度を上げ過ぎると結晶化を向上させるのではなく粒子自身を細分化(微粒子化)してしまう事も他の系で報告されているので注意深く実験を始めたところである。将来的には1分子計測用の金ナノ結晶を市販化し、より多くの研究者にDXTやDETを利用できるようにしたいと考えており、またQドットのような可視域ですでに利用されているナノ粒子もその結晶性さえ向上させることができればDXT(DET)への併用利用も夢でなくなる。そのためにも水溶液中でも利用可能なレーザーアニーリング現象を利用した低温アニーリング化を早急に実現したいと考えている。

(b) 非標識1分子計測手法を目指した試み:

本研究の中心的1分子計測手法は、両者ともにAuナノ結晶をプローブとして、その結晶から発生するX線及び電子線照射時の規則的な反射パターン(回折点)からその高精度の方向情報を読み取る。このAuナノ結晶は、サンプル対象である生体高分子の特位的に標識され、その特位的部位と基板固定内に存在する運動の総和を時分割的に高精度検出できる。この新規高精度1分子運動追跡手法の利点は、非常に画期的なものであるが、しかしナノ結晶をラベルするという欠点を克服するための方法論探索を本研究課題の大きな一つの柱としている。結果的に有効であると判断したのは、原子間力顕微鏡(AFM)の感知レバーの位置検出を従来の光テコの原理を利用するのではなく、感知レバーの一部に金ナノ結晶を標識してその回折点から感知レバーの位置決定を行うというアイデアである。この発想は本研究の根底の発想である「1分子内の位置決定精度は波長に依存する」というものに合致しており、高エネルギープローブを使用する利点が発揮されることになる。ただ、AFMで利用される感知レバーはSi系材料で作製されておりナノレベルで加工されているので、その結晶性を利用すれば従来のAFMにそれほど改良なしに感知レバーのX線検出が可能になると考え、この数年Si系の材料からの回折斑点の検出を試みてきた。しかし、その結晶性の質なのかSi系という軽元素から成り立っているためなのかmsオーダーで検出することが不可能と判断するに至った。現在、感知レバーの色々な部位に、結晶性の良好な通常DXTやDETで使用してきた金ナノ結晶よりもひと回り大きな結晶を物理及び化学吸着させるか、感知レバー上で結晶性を向上させる工程の確立を行っている。

可視光による感知レバー位置検出に比べて明確に異なる点は、カメラ長(探針と検出器の距離)を伸ばすことによってかなりの精度まで位置決定精度を向上できることと、探針の回転運動をモニターできることである。欠点としては並進運動を直接的にはモニター出来ない点がある。この並進運動検出のために感知レバー自身の形状の検討や並進方向のみの周期構造を感知レバーの一部に設置する等の試みを今行っており、精度的な限界は原理的にかなり優秀なシステムとなる見込みである。

(c) X線1分子追跡法と電子線1分子追跡法に関するソフト開発:

DXTやDETと同類と分類できる単粒子追跡法(Particle Tracking Velocimetry, PTV)という計測手法がある。可視光を利用して1つの粒子の運動を追跡する手法であるが、これがX線回折現象に取って代わったのが、DXTやDETと言える。流体関連全般において多くの速度計測がPTVによってなされ、その計測結果は自動追跡アルゴリズムの開発によって日々進展している。このアルゴリズムをDXTに応用しようと、この1、2年ソフトは開発を行ってきたが、X線の特異的な信号バックグラウンド等の理由で完全な回折斑点の自動追跡ソフトは完成に至っていない。しかし、計測データの迅速なデータ処理ができるソフト開発は行い、上記問題点が克服できた際に迅速にパッケージ化し、DXTやDETのユーザーに配布しより汎用的な高精度1分子計測解析ソフトウェアを完成させることも本研究の目標の1つとしている。図3が現在作製されている解析ソフトのフロントページである。

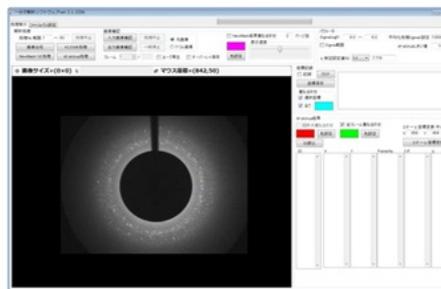


図3: DXTデータの回折追跡ソフトのFP

図3が現在作製されている解析ソフトのフロントページである。

(d) AChBP 系分子内構造変化計測:

nAChR (ニコチン性アセチルコリン受容体) は中枢および末梢神経に存在するリガンド受容性イオンチャネルである。2003 年に宮沢らによって立体構造が決定された。しかしながら、チャネルの開閉メカニズムは未だに解明されていない。nAChR に似た構造をもつタンパク質の立体構造を基に、二つのモデルが提唱されている。

一つは回転モデルで、もう一つは横開きモデルである。本研究では、nAChR およびそのリガンド結合部位のホモログである AChBP に DXT を適用した。100ms の時間スケールで計測をすることで、それぞれのタンパク質の運動の可視化に成功した。3ステップの運動が観測され、回転と横開きの両方の運動が重要であることが明らかになった。

当初は χ 方向の回転運動だけ注目していたが、ACh 存在化においても、存在しない水溶液条件下においても、 χ 方向の運動や類似した θ 方向の運動が観察された。その結果が図4である。少なくとも 30ms の時分割で測定した時よりは、 χ 方向の回転運動が明確に見えるようになったのは大きい進展と考えていたが、その測定データを蓄積するにつれ、 θ 方向の運動も連動して起こっているのではないかと考えた。その結果が図4である。100 マイクロ秒ごとの変化量 $\Delta \theta$ と $\Delta \chi$ の相関を見てみた。一見差がないように見えるが、ノイズ的な小さな回転運動等をフィルターリングして差ヒストグラムを取ると図5のように差が明確化された。ACh が存在する場合、右上と左下の赤い部位があり $\Delta \theta$ と $\Delta \chi$ の組み合わせが関連した運動が2つ見て取れる。また、典型的な運動として、より明確な $\theta \rightarrow \chi \rightarrow \theta$ という3ステップの連続運動がよく観察される。現在のところ、統計処理をすると明確にこのステップが現れるほどの確率では現れてはいるが、非常に興味ある連続運動であると考えている。

また、今までにない相関も取れてきた。図6は標識されたナノ結晶から反射してきた回折斑点の強度でその運動速度との相関を取った。

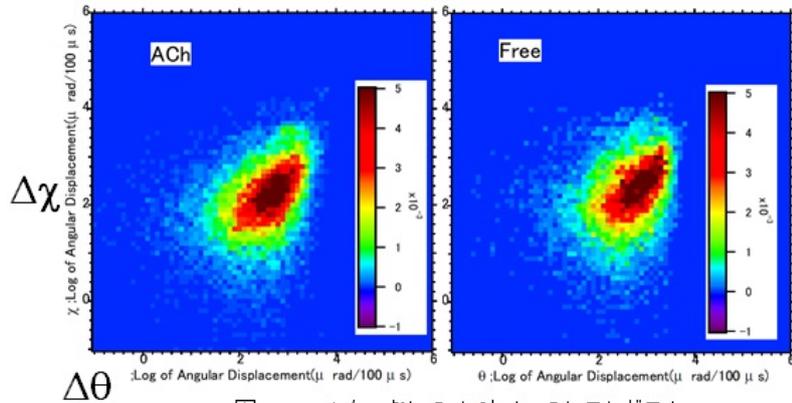


図4: フィルターなしの $\Delta \theta$ と $\Delta \chi$ のヒストグラム

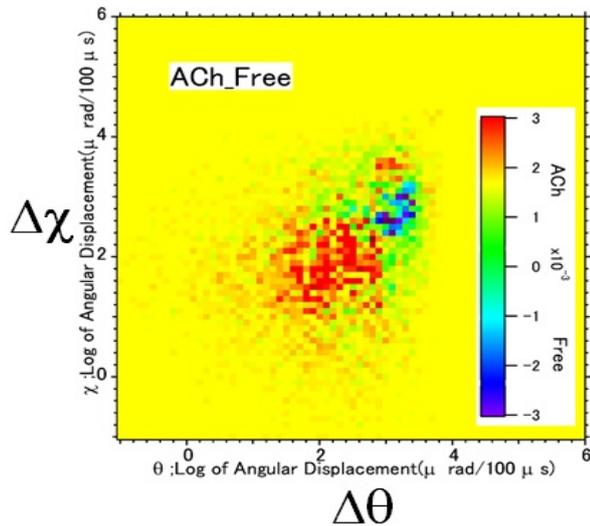


図5: AChあるなし $\Delta \theta / \Delta \chi$ の差ヒストグラム

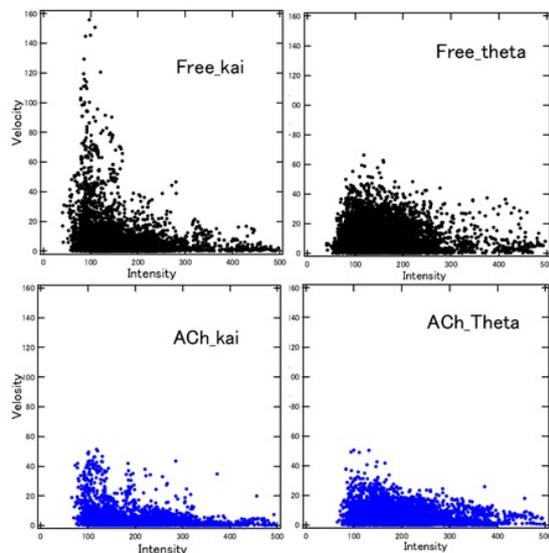


図6: ナノ結晶サイズと運動特性($\Delta \theta$, $\Delta \chi$)の相関

明らかに強度が低い方は運動速度が速くなっている。

そして ACh あるなしでの違いも明確となっている。この回折斑点の強度というのはナノ結晶の大きさと考えると、小さい方が運動しやすいという傾向があることが明確である。これは 30ms で測定しているときは全く現れなかった相関である。このサイズ依存性はナノ結晶による粘性変化に起因しているとは思われるが、より深い考察(チャンネル運動の負荷試験)が今後成されることが期待される。このように今まで DXT は、MSD 曲線一辺倒の解析を行ってきたが、それでは表せない運動様式もあることが色々なたんぱく質分子の運動を計測することで実感することができた。これは非常に大きな進歩である。もう少しデータが揃えば、速度ではなく加速度としてその負荷試験における力場計測ができるのかもしれない。今、変異体やリガンドの数を増やして最後のデータ蓄積をしている。

(e) シャペロニン分子内構造変化計測:

シャペロニンは変性タンパク質と直接相互作用し、その折れたたみを促進させるタンパク質である。シャペロニンは複数のサブユニットから成るリング構造を背中合わせに 2 つ重ねた筒状構造をとり、ATP 依存的にその構造を変化することで機能するが、そのダイナミクスは明らかでない。我々は高精度の分子内運動計測を実現する DXT を用いて、II 型シャペロニンの構造変化を解析した。様々な ATP 濃度条件および caged-ATP 存在下における光照射前後での測定を比較した結果、シャペロニン・リングは ATP 結合後、非協同的な閉運動後、リング上方からみて時計回りに約 10 度ねじれることがわかった。

図 7 は 2 m M ATP 濃度条件および caged-ATP 存在下における光照射前後での測定を比較した結果

を示している。2mM ATP と時は CW も CCW も両方の方向に回転していたが、Caged ATP ではほぼ CCW が最初の回転方向であった。つまり、CW 方向が ATP の結合した際に連動して起こる回転運動であることが分かった。また、ATP が結合してから構造変化するまでに少々タイムラグがあることも別に行ったストップフローの蛍光測定で判明し、その時は α 回転ではなく、 θ 方向の運動で極めて早い運動が確認された。また、ATP 結合に伴う回転運動と ATP の加水分解に伴う反回転運動の運動速度が異なることも判明した。これを説明するためには、もう少し実験しなければならないが、今のところ、CCW は 1 ステップで回転し、CW は 2 ステップで回転しているので(図の中の(2)の状態が混ざった状態で CW 方向に回転している)、それが原因で CCW の方で少々回転速度が速いのではないかと考えている。この結果は DXT 測定法ならではの定量的な成果だと言える。

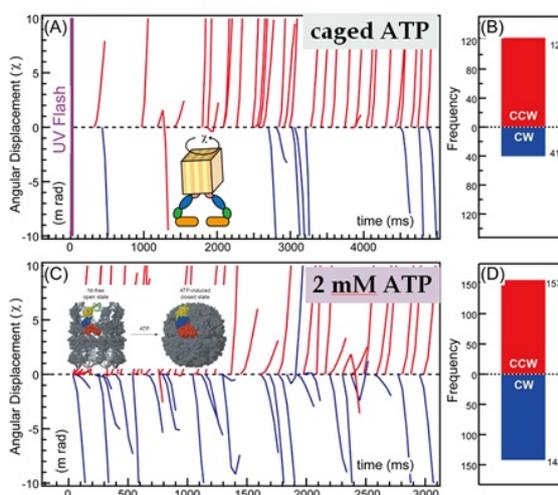


図 7: ATP 結合に伴う回転方向の決定実験

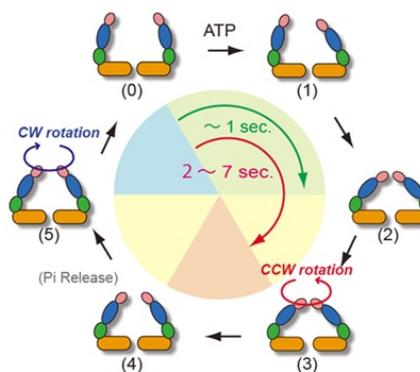


図 8: ATP 分子結合そして加水分解に伴う構造変化

(f) MHC系 DXT 測定:

古くから MHC の研究において行われてきた手法に SDS-stability assay というものがある。これはペプチド、MHC 複合体の種類により SDS 化の程度に差が見られることを利用したもので、必ずしもペプチド/MHC 間のアフィニティーの強弱と、SDS 化を受ける強弱は一致しない。現在まで SDS 感受性に差がある理由は解明されていないが、我々は色々なペプチドを用いた DXT の結果からコン

プレックスの分子運動が関係していることに気が付いた。今後、解析する複合体の種類を増やし分子運動と SDS 感受性の関係について解明を試みる予定である。これを通じて、1分子計測といったミクロの測定から、SDS 感受性といったマクロの現象を説明しうることを期待している。

図9はSDSデータから得られたMHCモノマー・ダイマーの分子安定性とDXTの測定から得られたダイマー時のMHC本体の θ 方向運動のMSD曲線から得られた拡散定数の相関を示した。分子内運動がある値を超えるとモノマーになる確率が上昇する。これは常識的な物質変化に反しないが、熱力学的に1つの曲線として解析することは今のところできていない。それで、Van't hofのような関係式を代入してみると、2つの直線でこの図9の曲線を解析することが適応であると考えられるようになった。この2つの直線フィッティングにより、各 ΔS と ΔH が導かれる。これらの数値を考察することで、MHCとそのダイマーの間に挟まっている peptide がどのような結合様式で安定化しているかを考察できる。例えば、図10にはほとんど熱力学的に変化がない状態(青の3点)を維持している結合形態(key-lock モデル)系であり、モノマーに分解しやすかった方(赤の3点)には、かなり構造変化が起こっている(induced fit モデル)と分類するという例である。これは1つの可能性であるが、分子内運動を代表する拡散定数を用いることであたらしい熱力学の指標という可能性がでてきたことになる。MHC系はかなる特殊な系であるが、より汎用的なサンプル例を積み重ね、新しい分子内運動の考えや、1分子測定とマクロ測定の相関を考えることの大切さを再考できたのではないかと考えている。

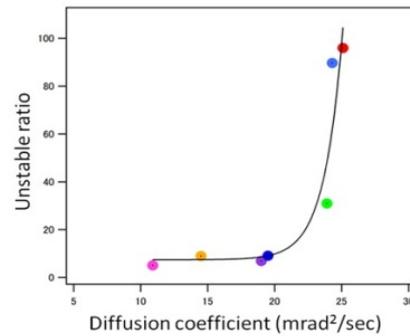


図9: 分子安定性とDXTから得られた拡散定数

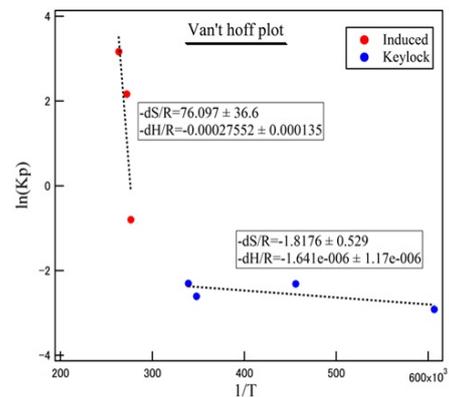


図10: Van't hof plot で2つの直線に近似する

(g) 自由ブラウン運動からのX線放射圧計測:

本研究では、 μ sec レベルの検出能で、水溶液中に単分散している金ナノ結晶のブラウン運動を観測した。結果、金ナノ結晶の結晶面に対してエネルギー依存の明確なX線放射圧(\sim aN)が観測された。また、ナノ結晶の運動方位性を詳細に解析した結果、X線放射圧の合力と考えられる結果も得ることができた。この結果は、金ナノ結晶をタンパク質分子にラベルし、タンパク質1分子の動きを可視化する高速DXTにおいて、数 aN レベルの力場を検出できることを証明し、逆に aN でナノ結晶のブラウン運動を変調できることも分かった。つまり、もしタンパク質分子の中で超微小な力場によって誘導された動的構造変化が存在するならば検出が可能となる。

図11は私達が考えているX線回折現象が起こった時に発生するであろう放射圧力場の方向性である。1996年に基板に固定したナノ結晶で放射圧を計測した例を発表し

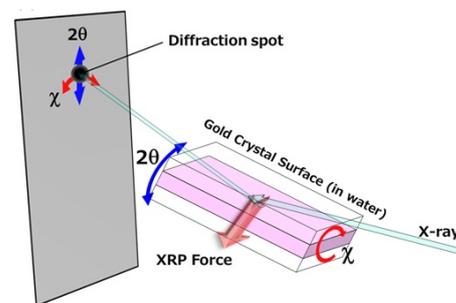


図11: DXTで観察されるX線放射圧の力場方向

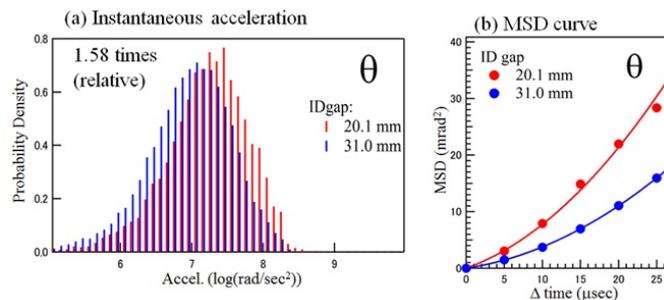


図12: X線強度と加速度分布の関係

たが、やはりよりシンプルな系において放射圧を計測しなければ、応用も広がらないであろうと考えて、自由運動しているナノ結晶に係る放射圧の計測を実現したかった。そのためにはマイクロ秒の高速測定を行わなければならない。本研究ではそれが1つの目標であった。

図12にはその結果である。右図はMSD曲線で入射X線強度を変えると圧力の度合いが変わるというものである。先にも述べたが、以前まではMSD曲線一辺倒の解析であった。今回からその回折点の運動からその加速度を求めて力場の計測とした。その結果が図12の左図である。MDS同様に明確な力場の差が表れている。注意しなければならないのは、その力場もある程度分布を持っているという点である。ナノ結晶自身の大きさにもガウシアン分布があるので、これは合点がいく。

問題は図13に表れた。その力場の角度依存性を解析してみた。最初は単純に角度というのは回折現象であるから、単純にX線強度分布と一致すべきであると考えた。しかし、一番回折強度が強くなる回折角度でその運動加速度との不一致が目立つ。現在色々なデータを同時に解析している。まだ、結論は出ていないが、X線の回折現象が同時に起こっているのではないかと考えている。つまり、X線合力が発生しているかもしれない。合力が発生するというのは予想していなかったが、多くの応用範囲がこれで広がる可能性も出てきたことになる。

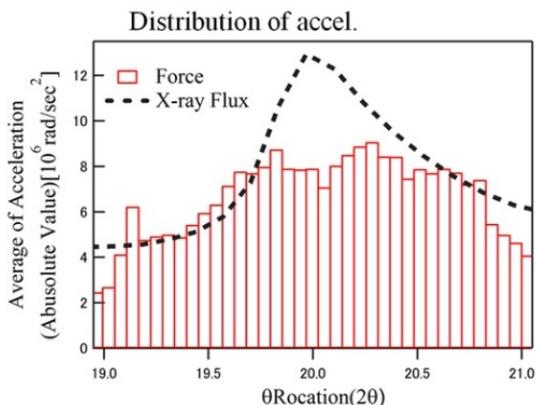


図13: 検出角度と加速度分布の関係

(h) DXT用ビームライン整備:

図14に示した写真は、新たにDXTが計測可能になったビームラインの写真である。DXTに必要な要点は以下の3点である。(1)白色及び疑似白色X線光源が利用できること(2)X線集光光学系を持ってサンプル位置でS/Nの良い信号が来る(3)サンプルのxz軸遠隔操作システム(4)X線検出系が安定に設置できる。BL40XUで構築されて最適高速DXTを模倣して写真の2ビームライン設置が終了した。特にKEK-NW14ARはYAGレーザーやフェムト秒レーザーを併用できるので、Caged化合物系実験や光励起系実験を時分割的に測定することができる。シャペロン系はKEKでの実験結果である。このビームラインはJST/ERATO(腰原プロジェクト)によって5年前に建設され、DXTの実験に利用可能であることが予備実験によって確認されていた。このビームラインの設計者はDXTの最初の計測を行ったSPring-9 BL44B2のBL担当者の足立氏であったことより、若干の投資を行う事でSPring-8と同等(高速実験を除く)の実験が可能となったことは幸運であった。DXTのユーザーも20人程度になったので、多くのユーザーと議論しながら、各系での最適条件を見つけつつ実験を加速させて行きたい。



図14: 新たに加わったDXT用ビームライン

また、非常に心強い話としては、高速運動計測を行っている佐々木Gと八木Gの議論の結果、世界最高速のカメラでDXTをやったらどうなるだろう?という素朴な疑問をこのプロジェクト中に実現することができた。最高速度100nsということで通常の画面サイズよりも4-5倍程度大きい。回折

スポットを追跡することが可能となった。近畿大学の江藤教授が開発したメモリー機能をもった超高速 CCDカメラである。またプロトタイプ(図15)であるが、100 ナノ秒での計測は世界一早い1分子計測と間違えなく言える。CREST 期間内にもこのレンジでの面白いデータが取れる予定である。本研究で購入した Photoron の C-MOS カメラと併用として μs レベルの計測を一層集中的に行っていく予定ある。

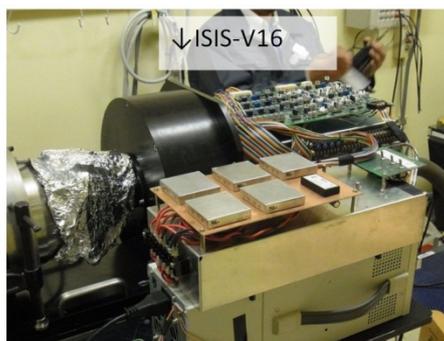


図15: 江藤カメラをDXTで用いてみた

(i) その他の進展(細胞系への拡張):

DXTにおいて、サンプル準備のプロセスはかなりルーチン化してきた。しかし、DXTデータをより高度に利用するためには、DXTにおける最大の欠点である分子運動の初期値を決定できないという点を、他の計測方法と併用することで克服しなければならない。現在AFM等の前評価を挿入して、より厳密な運動解析の可能性を検討している。また、DETのサンプル準備工程の検討過程で、DETで真空中での溶液封じのために使用している 10-20nm のカーボン薄膜が、X線の全反射現象の際に発生するエバネッセント波を利用した新しい表面計測法に利用できるのではないかと結論を導き出した。これは今後可干渉性向上が期待される放射光利用の1つの可能性を示すことになり、早急に原理実験を行いたいと考えている。

放射光の今後の進展を考慮すると、X線領域の自由電子レーザー(X-FEL)の登場で、数年後に桁違いの高強度X線光源がヨーロッパ、米国、そして日本国内に設置されることになる。勿論、この利用法は多くの研究者のすでに研究テーマとなっているが、その高強度の故のX線によるダメージの問題が深刻になっている。そんな時に、サンプル系(分子)への直接照射を回避する方法論の有効性が再確認されることも考えられる。DXT然り、X線によるAFM探針のモニタリング然りである。ダメージ回避の検討は現在それほど深刻にされておらず、まずは照射してからという姿勢が多くの研究者の共通の姿勢に思える。この時期に上記発想で新しい計測手法を多く提案することは今後の展開を考えると非常に有効であると思われる。

X線エバネッセント顕微鏡等の新しい計測手法を考案することができた。また、ナノ結晶を市販レベルまで企画化できるかもしれない段階まで来た。測定結果から出た意外性としては、T細胞系においてMHCが提示するペプチド認識機構に新しい動的なプロセスの確認を定量的に提案できた点である。佐々木の異動に伴って、高エネルギープローブを用いた1分子計測をバイオ系だけではなく、無機材料系に対しても動的な構造計測法として利用できる可能性を探り始めたが、この新しい展開は今後またバイオ系の測定を考える上で必ずやプラスになると考える。また、この異動が必要となった近郊(関東地区)での実験が偶然可能となったことは、本研究プロジェクトを最終段階においてラストスパートとして発揮された。加えて、このKEK-AR施設利用で、予想以上に多くの放射光研究者がDXTの今後の進展状況を注目していることが分かって非常に勇気を得た。今後の国際的な新しい放射光施設で初期段階のDXT計測に道が開かれた。より多くの分子内運動計測を確実にこなすことがまずはDXT普及の第一歩と考えている。

(2) 研究成果の今後期待される効果

DXT や DET の利点を宣伝しながら、多くのユーザーを今後開拓していくべきだという自信を持つことのできた5年間であった。「ユーザーフレンドリー」な計測手段の確立を目指すことは、より新しいニーズに触れることができることを意味し、DXT や DET をより進化させることが可能となる。ナノ結晶の効果においても、AChBPでのサイズ効果を直接議論できるデータも出てきたのは非常に頼もしかった。ナノ秒まで行けば理論計算の研究者との積極的な情報交換をして現在問題になっている点を明確化していけるし、何を測ればよいか! ? という戦略を基本的なところから立てることができる。DET はすでに有機材料系(溶媒ナシ)での分子運動計測の共同研究が進もうとしている(現在科研費申請中)。MHCは論文が通るまでにはまだ一山ありそうであるが、ブレイクスルー的な匂いがすることは明確で、最終的には直接疾病に絡めたり、「揺らぎ」を分子が認識するプロセスを明確化できるとするとその意義は大きく、医薬品や人工的な物質創成系にも影響を及ぼすことのできる可能性もある。DXTやDETによって「分子内部運動」を高速領域で測定可能であるということ

をより戦略的に宣伝し、「分子内運動計測法」としての標準化に必要なデータ取得も行っていく必要がある。最近、ピコサイエンスの本を書くから一章書いてほしいという依頼があった。ナノサイエンスの次は間違えなくピコサイエンスで、その対象は高速領域における「分子内部運動計測」ということになるだろう。ここ1-2年が山場となるのではないか。また、今後出てくる第4世代の新型放射光施設(X-FEL や ERL)でも話題になるような位置で研究展開できるような工夫も必要だろう。例えば、干渉性の良い光源であるから、回折斑点を追跡するのではなく、ナノ結晶から発生するホログラフィックなパターンを時分割して3次元情報計測が可能になる high-speed Holographic X-ray Tracking (HoloXT)とか、色々な可能性を意識して DXT/DETworld を広げていきたい。

また、これらの研究から出てき基盤技術の中には、全く異なった研究領域での利用法もあるのではないかと可能性も追求していきたい。例えば結晶性の極めて高いナノ結晶及びナノ結晶の作製技術、タンパク質分子へのナノ結晶標識技術、カーボン薄膜によってなされた高真空状態と水溶液状態の界面を形成した薄膜技術(単分子まで行くとより究極的)などは、色々な応用が考えられる。

4-2 八木グループ(財団法人高輝度光科学研究センター)

(1) 研究実施内容及び成果

①研究のねらい: X線1分子追跡法の高速化

②研究成果

(a) 高速 X 線シャッターの評価

SPring-8 の強力な X 線により、生体試料が損傷を受けることはよく知られている。高速時分割実験の場合、短時間に非常に強い X 線を試料に照射することになるので、不要な X 線照射を避けるための高速 X 線シャッターの使用が必須である。X 線用シャッターとして購入した UNIBLITZ 社製シャッター(XRS6S2P0-100)のテストを SPring-8 のビームライン BL40XU で行った。XRS6S2P0-100 を二つタンデムに置き、X 線ビーム(15keV)を通した。透過 X 線強度は、PIN ダイオード(浜松ホトニクス社製)とカレントアンプを用いて測定した。このシャッターの最小開時間はカタログ値で 3.2 ミリ秒であり、それより短い露光時間を得るには、一方のシャッターを閉めつつ他方を開けるという操作を行う必要がある。これはシャッターコントローラで遅延時間を設定することで実現可能である。適当な遅延時間を設定することにより、500 マイクロ秒程度の開時間を得ることが可能であった。

X 線用ではないが、同じく UNIBLITZ 社製の高速シャッター LS2T2-100 を用いると、100 マイクロ秒の開時間が得られた。この場合には、15keV では閉状態でも 10%程度の X 線がシャッターを透過するので、X 線シャッターと組み合わせて使用することが必要である。

これらのシャッターは、BL40XU の X 線による熱負荷に耐えられる構造にはなっておらず、そのため長時間にわたって照射されないようにステンレス製の空冷シャッターを上流に置いている。これは開閉に数 10 ミリ秒を要するが、連続的にビームを受け止めても損傷を受けない。複数のメカニカルシャッターを用いた X 線の ON/OFF は、これらのシャッターをタンデムに並べ、パルス発生器で遅延制御することによって可能であった。

(b) X 線イメージインテンシファイアの評価

X 線検出器にはガス検出器、半導体検出器などさまざまな種類があるが、二次元の回折パターンを高速に記録できる X 線検出器は限られている。SPring-8 では 15 年以上前から(株)浜松ホトニクスと協力して回折記録用 X 線イメージインテンシファイア(X-II)の開発を行ってきた。X-II はもともと医療用で回折実験で使用するよりも高いエネルギーの X 線で使用するようにならされている。したがって低エネルギーの X 線で使用するには医療用 X-II の窓材であるアルミニウムをベリリウムに換えることが必要であった。これには入力面の蛍光体である CsI を直接ベリリウムに蒸着する必要があった。さらに、空間分解能を上げるために CsI を薄くする必要も生じた。これらの技術は 10 年程前に確立され、X-II は SPring-8 における標準的な時分割 X 線回折実験用検出器として使用されている。

本研究においては、新たに改良を加えた 2 台の X-II の性能評価を行った。一台は 4 インチのベリリウム窓を持つ高速 X 線 X-II (V7739P/MOD46/P-II) である。X-II は、入射窓で X 線を電子に変換し、それを高電圧下で加速し、出力窓の蛍光体に当てて、その蛍光を可視光用のカメラで観

察するものである。入射窓ではベリリウム(0.5mm厚)の真空側に厚さ0.15mmのCsIが蒸着しており、これによってX線はまず可視光に変換される。CsIの真空側にはフォトカソードが蒸着しており、これによって可視光は電子に変換される。印加されている高電圧によって電子は加速され、出力面の蛍光体に当たって強い蛍光を生じる。この際に電子レンズが入力面の電子の分布を縮小して出力面に投影するため、入力面のX線像を増倍して可視光像として観察することが可能となる。像が縮小されるため、可視光用カメラでレンズを通して出力画像を観察することが容易になる。この場合、X-IIの残光特性を決めるのは蛍光体である。入力面の蛍光体であるCsIは数マイクロ秒の残光を持つと言われる。一方出力面の蛍光体には一般には発光量の多いP43(GADOX/GOS, Gd₂O₂S:Tb)使用されるが、P43は数ミリ秒の残光を持つと言われている。P46(YAG, Y₃Al₅O₁₂:Ce)の残光はマイクロ秒オーダーで減衰するので、高速撮影に適している。以下に示すように、実際にP46を用いたX-IIでは、10マイクロ秒以上の高速測定が可能であることが明らかとなった。

もう一台のX-IIは超高感度X-IIで、同じく4インチのベリリウム窓を持つ低エネルギーX線用である。出力面はやはりP46を使用している。ただし本機はさらにその後段(出口窓の後ろ)に近接型II(multi-channel plate, MCP)を置くことで、更なる感度の上昇を実現している。

超高感度X-IIのテスト実験は、BL40XU常設の回転シャッターとソレノイドシャッターを用いて5マイクロ秒のX線パルスを作り出して行った。試料にはニワトリ臍コラーゲンを用いた。X線カメラは、ORCA-II-ER(C4742-98-24A)を使用した。近接型IIの感度を0にして、5マイクロ秒の露光で記録したコラーゲンの回折パターンには数次の反射が見られ、すでに単一フォトンが観察可能であった。近接型IIを使用しないイメージインテンシファイアと比べると約10倍の明るさである。

次に近接型IIのゲインを8に上げると、単一フォトンの積分強度はゲイン0と比べて60倍程度となった。この場合には単一X線フォトンが明瞭に観察可能であった。増幅による感度の上昇は明らかであるが、強度の強い部分では、近接型IIに流れる電流の制限によって直線性が失われていると思われる。

ここで行った性能評価では、強いX線を使用しているため、近接型IIが飽和気味であり、強度測定には問題があった。しかし、強度定量の必要ないスポットの位置を測定するような計測には、十分な性能を有していると考えられる。長時間の計測では飽和によって感度が低下するが、短時間の高時間分解能測定では威力を発揮するものと思われる。

(c) 高速 CMOS カメラと P46 蛍光体の評価

X-IIの特長の一つは、実験目的に応じて組み合わせる可視光用カメラを変えることができる点にある。従来X-IIと組み合わせてX線高速時分割実験を行う際にはCCDカメラが使用されている。

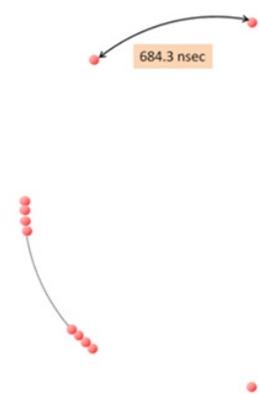


図1 SPring-8の蓄積リングにおける電子の分布(バンチモード)。電子はバンチと呼ばれる単位に分離して蓄えられた状態で蓄積リングを周回している。電子の総量は蓄積電流が100mAとなるように調節されている。この図は2010A/2011A期のDモードで、蓄積リングの1/7周に電子が等間隔に詰め込まれており、それ以外では5つの孤立バンチ(50ピコ秒程度)となっている。孤立バンチには各3mAの電流が蓄えられており、85mAが連続部分に蓄えられている。

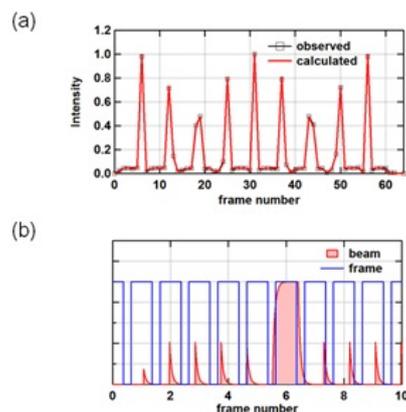


図2 2010A/2011A期DモードにおけるX線ビーム強度。(a)は実測したビーム強度と、計算による予想値。(b)はシミュレーションにおけるX線強度の各フレームへの配分の様子を示す。6フレーム目は、電子が連続的に詰め込まれている1/7周の部分(図1)に相当し、強いX線が観察される。1フレームは768ナノ秒である。

標準的なものは浜松ホトニクス社製 C4880-82 で、640x480 ピクセル(12ビット)の画像を毎秒約 30 フレーム記録できる。最近は同社の C9300-201 も使用されており、同じ画素数(12ビット)で毎秒約 160 フレームまでの記録が可能である。さらに同社の C7770 は同じ画素数(10ビット)で毎秒約 300 フレームの記録が可能であるが、CCD を 3 台使用するためにプリズムで光を分割しており、感度が低いという欠点があった。CCD 素子は読み出し時に電荷を隣接したレジスタに順次転送するため、読み出し速度には限度がある。そのためここ数年 CCD に換わって CMOS センサーを使用する高速カメラが普及しつつある。CMOD は CCD の用に電荷を移動することなく直接画素をアドレッシングして読み出すため、高速化が可能である。そこで、フォトロン社製高速 CMOS カメラ FASTCAM SA1.1 を購入して性能評価を行った。本カメラは 1024x1024 ピクセルで毎秒 5400 フレームの撮影が可能である。

本カメラの AD コンバータは 12 ビットであるが、ダーク画像のノイズ評価からは、実効ダイナミックレンジは約 8 ビットであった。同様の方法で C9300-201 のダイナミックレンジを求めると約 9 ビットとなり、CCD のほうが読み出しが遅い分だけダイナミックレンジが広いことが分かった。しかしこの 2 倍の違いの重要さは、実験に必要な時間分解能や画質によって異なると思われる。

P43 と P46 の二種類の蛍光体を使用した X-II と組み合わせを行ったテスト測定では、蛍光体の残光特性の違いが顕著に表れた。P43 蛍光体では 1 ミリ秒以上の残光が確認され、ミリ秒以下の測定では P46 の使用は必須であり、本研究に於ける蛍光体の選択が正しいことが明らかとなった。

そこで、P46 蛍光体の蛍光特性を評価するために、さらに CMOS カメラの画素数を減らして、毎秒 1,302,000 コマ(1 コマ 768ns)で P46 蛍光体のサブマイクロ秒領域における残光特性を検討した。最初の実験では、SPring-8 の BL40XU において X 線ダイレクトビームを観察した。シンチレータは浜松ホトニクス社製で、粉末の P46 を石英基板上に 20 ミクロンの厚さで塗布したものである。これを同社製高分解能 X 線画像検出器(ビームモニター 2)に装着し、タンデムレンズを用いて観察した。ダイレクトビームは 64x8 ピクセルの視野にほぼ収まって観察された。X 線ビーム強度としては、64x8 ピクセルの積分値(暗電流分を除く)を使用した。

高時間分解能で測定したフレームごとの放射光強度変化は、蓄積リングのバンチモードによって異なっていた。図 1 に使用した SPring-8 の運転モードを示す。この運転モードにおいては、電子が連続して蓄積されている部分を記録しているフレームと、孤立バンチを記録しているフレームとで大きな強度差が見られた。

カメラのフレーム周期と孤立バンチのずれによって、フレームによっては全くバンチを含まないことがあるが、蛍光体の残光によってデッドタイムの間に入った孤立バンチの強度が尾を引いて記録されるために、強度がゼロとなるフレームは観察されなかった。観測された強度変化は、P46 蛍光体の蛍光が時定数 60 ナノ秒の単一指数関数的に減衰すると仮定して十分に説明可能であった。この解析によって、P46 蛍光体の残光減衰時間が 60 ナノ秒であることが確定的となった。

このように P46 蛍光体の残光時間は 100 ナノ秒以下であり、しかも指数関数的に素直に減衰しているため、この蛍光体は高速 X 線強度測定に適している。これは、P46 が一分子計測法のような高速に回折スポットを追跡する実験や、電場による結晶歪みを回折スポットの微小な動きで検出する場合に有用であることを示している。XFEL のように X 線が強力な繰り返しパルスとして得られる場合にも、残光の蓄積がなく、各 X 線パルスで得られた回折像をはっきりと時間的に分離して観察することが可能である。

(d) 高速 X 線イメージインテンシファイアの評価

P46 蛍光体の残光は 60 ナノ程度秒であることが判ったが、X-II には入力面に CsI 蛍光体を使用されており、この残光も検出器としての特性を左右する。そこで、同様に D モードにおける X-II の残光特性を評価した。BL40XU のダイレクトビームは X-II には強すぎるので、シリカ粒子の小角散乱の一部分の強度を測定した。実験の方法は図 2 と同じである。

本実験結果から、P46 蛍光体のみの場合と比較して、X-II では残光が長いことが明らかである。4.5 マイクロ秒ごとにパルス状に観測されている 1/7 周部分は、分離はできているが残光が長く尾を引いており、パルス間の強度は孤立バンチから予想されるよりも高い。さらに、シャッターを閉じた後も数 10 フレームに及ぶ長い残光が見られる。この結果は、時定数 600 ナノ秒と、7 マイクロ秒程度の 2 種類の残光が存在することを示唆している。さらに、シャッターを閉じた後の残光が計算値と合致しないことから、より長い残光成分の存在も示唆されている。P46 蛍光体のみ残光時間が 60

ナノ秒であったことから、X-IIで観察されたこれらの残光は入力面蛍光体であるCsIの特性を反映したものであると考えられる。しかし、時定数600ナノ秒の成分が残光の主成分であるため、本X-IIは数マイクロ秒の時分割実験には十分に使用可能であると判断される。じつ、金ナノ結晶からの回折を10マイクロ秒程度の時間分解能で捉えることが可能であることが確認されており、P46を使用したX-IIとCMOSカメラの組み合わせが、研究目的に適合したシステム構成となっていると判断される。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究で明らかとなったP46蛍光体を用いたX-IIと高速CMOSカメラの組み合わせは、マイクロ秒時間時間分解能でのX線回折・散乱実験を可能とする。このような実験は、生物試料だけではなく、無機材料の構造ダイナミクスの研究で頻繁に行われていることから、他の放射光実験や今後のXFEL(X-ray Free Electron Laser)実験への波及効果が見込まれる。特に設置が予定されている高エネルギー加速器研究機構で開発中のERL(Energy recovery linac)では、1ナノ秒で比較的強度の強いシングルX線パルスが長時間発生できる全く新しい放射光の開発にこのDXTの原理が非常にマッチすると予想される。高速化は勿論ナノ秒まで行かざらう。放射光の高強度化で一番問題視されていたサンプルへのダメージもこのDXTなら標識されているナノ結晶だけにX線を照射すればよいので、理想的なダメージレス測定が実現する可能性がある。勿論この場合はX線をナノビームとして集光する技術の開発も必須となるが、この点に関してはビームの空間干渉性が格段に向上するので、実現はそれほど難しくないとされている。ここで1つ付け加えたいのはこの干渉性向上がDXTに与える影響である。これは絶大なものがあって、例えば、ナノ結晶のホログラフィー動画が測定できる可能性がある。これは情報が3次元になり理想的1分子動画計測が実現する。

XFELやERLのような第4世代放射光施設が今後数年で利用が本格化する。この夢のようなX線強度を利用して何を見るか？と科学者が聞かれた時にすぐに出てきた答えの1つが「1分子動画」であった。しかし、その10年前の夢はダメージの影響と第4世代でもまだ足りないと言う現実であった。現在は細胞レベルやナノサイズまで大きくした微小結晶体の構造決定へと推移している。この妥協は生命科学では全く次元が異なる結果を招く。計算科学の躍進もすさまじく、マイクロ秒の1分子運動計算が実現し、より高精度なナノ秒レベルの1分子運動予測が可能になりつつある。今後の放射光を利用した方法論の考案者は、ここで多分子系へ妥協するのではなく、標識でもなんでもやってなんとか「1分子」を計測できる手段を確立することが今非常に大切だと考えている。そのしがみ付く1つのアイデアが「標識」だというのが私の答えだ。これは弊害も多い。「本当の運動が見えるのか？」「高速運動についていけるのか？」等、これらの単純な疑問に対して1つ1つ丁寧に定量的に回答し打開して行き、その過程でこの「標識」法を「非標識」の方向に導く新しい方法論の発想を追い続けることが私の使命と考えている。

4-3 石川グループ(日本大学 文理学部)

(1) 研究実施内容及び成果

① 研究のねらい: 電子線1分子追跡法の基礎技術の確立と生体分子への応用

石川グループが確立を目指した電子線1分子追跡法(Diffracted Electron Tracking ; DET)はその名が示す通り、白色X線を用いたX線1分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking ; DXT)のX線の代わりに電子線を利用しようとしたものである(図1)。何故、すでに技術が確立し多くの成果を得ているDXT以外に同様の原理を利用した計測法の確立を目指したかという、以下の理由があった。DXTには高輝度のX線源が必要であり、Spring-8、KEKといった大型放射光施設が必要なのに対し、電子線は市販の走査型電子顕微鏡(SEM)で済むといった点である。大型放射光施設を

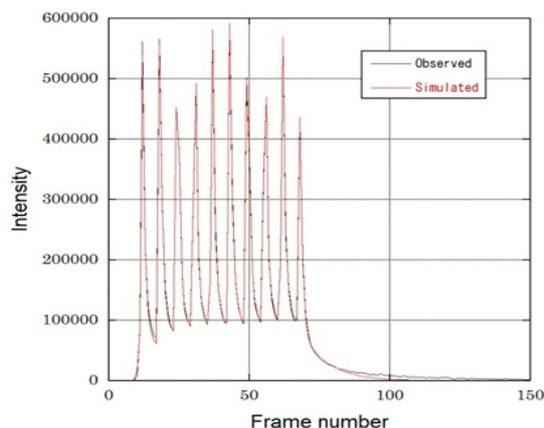


図3 P46蛍光体を使用したX-I Iの、2010A/2011A期Dモードにおける残光特性。黒線が実測値、赤線は、 $t_1=590\text{ns}$ 、 $t_2=7033\text{ns}$ の二種類の残光を仮定した時の計算値である。1フレームは768ナノ秒である。

利用することは様々な目的で利用する研究者と利用機会を取り合うことであり、必然的に実験実施機会は厳しく制限される。これは、実験結果を次の計測に生かすフィードバックにとっても時間がかかることを意味する。また、DXT に世界中の多くの研究者が興味を持ったとしてもすべての試料の計測をおこなうことは時間的に不可能であり、DXT を利用した研究の普及に大きな障害となってしまう。そこで、石川グループでは市販の SEM を利用し、ラボレベルで運用できるコンパクトな装置での 1 分子計測法である DET の確立を目指した。

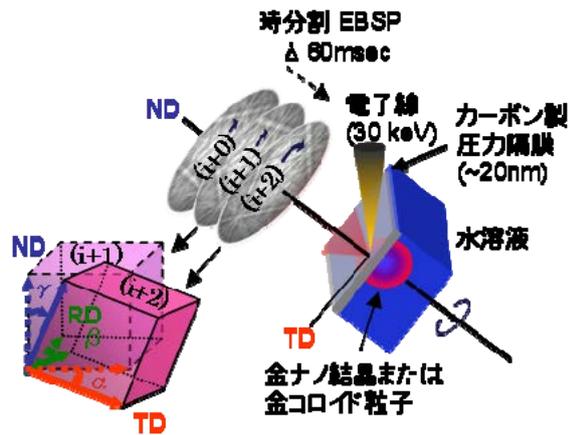


図1. 電子線1分子計測(DET)の原理

② 研究成果

(a) DET用EBSP計測装置(走査電子顕微鏡):

走査型電子顕微鏡はフィールドエミッション型電子銃を持つ日本電子(株)製 JSM7001F であり、これに電子線の回折像(電子後方散乱回折パターン; EBSP)を取得するための装置を設置した。EBSP からは発生元の金属が分かれば結晶方位を決定することが可能である。EBSP の発生は非常に古くから知られている現象であり、特に材料系において結晶の向きを計測するために広く用いられている。そのため、SEM+EBSP という組み合わせは極めて一般的なもので多くの研究施設ですでに設置されている。石川グループでは、より少ない電子線量で明瞭な EBSP 取得を目指すため、CCD カメラの前段にイメージ・インテンシファイヤーを装着した。DET 用の特殊な装置としてはこのイメージ・インテンシファイヤーのみである。そのため、既存の SEM でも比較的少ない予算で DET 計測機能を追加することが可能である。このイメージ・インテンシファイヤーにより、従来システムの約 10 倍の高感度化に成功した。これによって、サイズ約 70nm の金ナノ結晶から、最小の照射電子線電流値 0.05nA で EBSP を計測できることを確認した。

(b) 大気圧環境計測用小型セル(Wet Cell)の開発

電子線は X 線と比較して物質との相互作用が非常に大きい。そのため空気中では空気分子との相互作用のため電子線の照射が不可能である。そこで、電子顕微鏡の筐体内は高真空に保たれている。DET の目標は DXT と同様にタンパク質等をはじめとする生体高分子の水溶液中での分子内運動計測であるが、含水が必須のサンプルを真空中に設置することができない。そこで、SEM 用標準試料台に外寸をあわせた DET 用試料台を設計した(図 2)。この中央に大気圧を保持するセルを設置するため、図 3 のようにリン青銅製の金属板(グリッド)に観察用の窓を設けて、そこに電子線の透過をなるべく阻害しないように極薄高耐圧性カーボン膜(隔膜)を張り付けた。この隔膜が DET の成否を決定する重要なファクターとなる。というのも、セル内のサンプルに電子線を照射し、その回折像(EBSP)を得るためには電子線を 2 度も隔膜透過させなければならない。また、サンプルの周囲の水も電子線の進行を阻害するため得られる EBSP 信号は減衰しノイズの乗ったものとなる。そこで、隔膜はできる限り薄く作成しなければならない。しかし、1 気圧の圧力差だけでなく、電

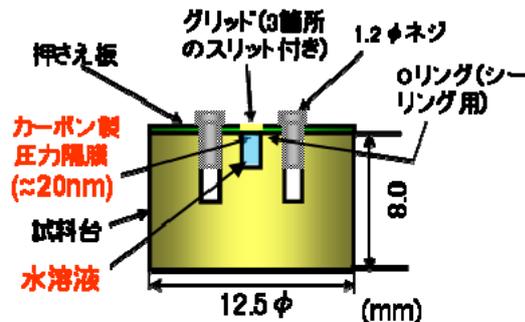


図2. DET用 WetCell

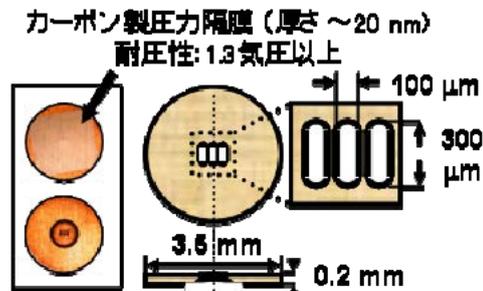


図3. 隔膜を貼った特殊グリッドの写真(左)とグリッドの模式図

子線の照射による物質の変化(ダメージ)にも耐えなければならない。

当研究室では以前から透過型電子顕微鏡用に隔膜作成技術を発展させていた。DET 用の隔膜もその技術を応用する形で作成した。隔膜はカーボンの真空蒸着法で作製するが、カーボン隔膜の強度を高めるには、高真空下で低速で蒸発させることが重要であり、蒸着源の形状と寸法、加熱電流値と加熱時間、蒸着膜厚さの制御法など、蒸着条件の最適化を図る必要があった。また、隔膜をグリッドに貼り付けるまでの過程での隔膜の損傷を避けるために、保護用のトリアセチルセルロース(TAC)の膜(厚さ約 100 nm)の上にカーボンを蒸着し、グリッドに貼ってから TAC 膜を溶解・除去する方法を採用し、厚さ 10~15 nm 程度で 1.3 気圧の耐圧性能を持つ隔膜の製作を可能とした。この方法により作製した厚さ約 20 nm のカーボン隔膜下に、金ナノ粒子を水とともに密閉し、SEM 像観察はもちろん、EBSP 計測をも可能とした。

(C)水層中の金ナノ結晶の DET による「ブラウン運動」の解析:

DETの最終的なターゲットはタンパク質など生体分子に標識した金ナノ結晶の微小運動の 1 分子計測であったが、まず DET 原理を実証する目的で、隔膜上にメルカプト基を持つシラン化合物を蒸着し、その上に金ナノ結晶を結合させた無機高分子系を用いて金ナノ結晶の水溶液中での運動計測を試みた。

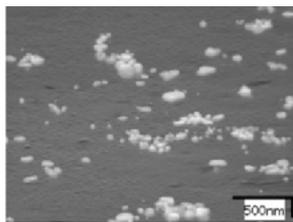


図4. Wet Cell内水中の隔膜に結合した金ナノ結晶

研究当初、金ナノ結晶の隔膜への結合はうまくいかず、金ナノ結晶がひどくアグリゲーションしてしまう状態が SEM 像から観察された。1 分子計測には独立した結晶の目的分子への結合が望ましいため、これの解決から取り組んだ。従来では 1 ml 程度バッファーに NaCl 結晶上に製作した金ナノ結晶を溶解させ、溶解液をシラン処理した隔膜に滴下していたが、結合した金ナノ結晶を SEM 観察するとほとんどアグリゲーションしていた。そこで、NaCl 結晶を数 mm 角に劈開し、隔膜上に極微量滴下した溶解液に金ナノ結晶側をのせて表面を溶かし、金ナノ結晶を隔膜上に沈ませる方法を開発した(図 4)。これにより、アグリゲーションをある程度防ぐことに成功し、独立した金ナノ結晶から EBSP を得られる道筋が立った。

しかし DET 開始当初、電子線によるダメージの影響で隔膜が局所的に削られ、弱くなり破れてしまう問題が発生した。隔膜が破れると、内部の空気や水分が一瞬に真空中に放出され計測不能になってしまう。そこで、様々な条件を検討した結果、セル内の水の量を減らすことでダメージにより破壊される確率を低下させることに成功した。現在では塩類バッファーを用いることでよりダメージを低減させることが判明している。これにより、水中での金ナノ結晶から加速電圧 30kV、照射ビーム電流値 0.087 nA、CCD カメラ撮影のシャッター速度 60 ms の条件で 2 秒間、約 30 枚の連続 EBSP が得られ、そこから各結晶方位が決定できるようになった。約 200 粒子を計測し、統計処理を行なった結果、真空中ではほとんど運動が見られなかったが水中では比較的大きな運動が計測された。しかし、3 次元的方向性には差が見られなかった(図 5、 α, β, γ の定義は図1参照)。

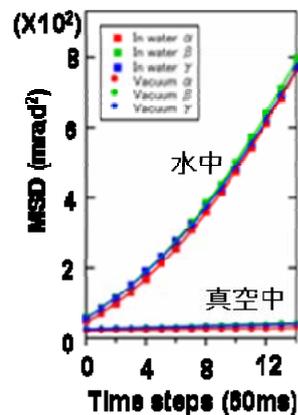


図5. 水中及び真空中で測定した金ナノ結晶の運動

(d)DET における金コロイドの利用、及び 3 次元運動計測:

CREST 開始から 5 年間、DET の標的分子に対するラベルは金ナノ結晶のみを用いていた。これは、市販の金コロイドが化学的な凝集のみにより常温下で作られるものであり、結晶性など全く持たないものだと考えていたためと、実際に DXT において金コロイド粒子からは良質の回折スポットが得られないことが明らかになってきたためである。当初、全く別の目的で入手した金コロイドを隔膜に結合させ EBSP を取ってみたのはほんの遊び感覚であった。ところが、予想に反し金コロイド粒子からは非常に明瞭な EBSP が観察された。このことから、コロイド粒子の表面から数 nm は想像以上に結晶化していることが分かった。また、同一の金コロイドを用いても DXT では回折が得られないことから金コロイド粒子内部の結晶性はよくないことが考えられる。実際に DET に使用できるか検討するために、金ナノ結晶と同じ条件のシラン化合物を用いて、金コロイド粒子の水中での運動を計

測した。その結果、金ナノ結晶より一桁以上大きな値で運動が計測された(図 5、6 の比較)。すなわち金コロイド粒子は金ナノ結晶より運動検出感度が 10 から 20 倍程度高いことが示された。また、結晶各ベクトルの角度変化を求めた結果、運動の方向性が 3 次元の差として現れてきた。これは金ナノ結晶を用いたときには見られなかった特長である。これらの方向性は、真空中では電子線の照射圧によるもの、また水中では照射位置の水の熱膨張による影響と考えている。

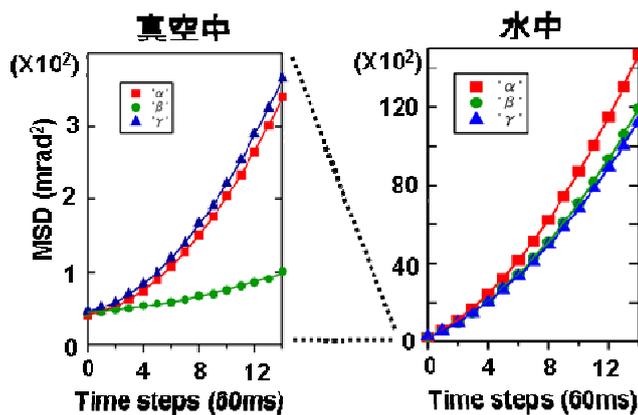


図6. 真空及び水中で測定した金ナノロッド粒子の運動

また、当然ながら金コロイドは市販されており入手しやすく、粒径も非常に良く揃っていて、更には DET に用いてもアグリゲーションしにくいことも分かった。このことから、金コロイドを標識分子として用いることは、DET の簡略化、高感度化、高精度化が同時に達成されたことを意味し、その意義は非常に大きいと考えられる。

(e) シャペロニンタンパク質を用いた DET による 1 分子計測:

金コロイドの発見により、本 CREST 期間内に実現不可能と思われていたタンパク分子への DET の応用が可能になった。しかし、X 線よりサンプルに対するダメージが大きいと考えられる電子線を利用する点や、前述の無機高分子を利用した金コロイド粒子の運動計測の際に見られた電子線の大きな照射圧や水の熱膨張による影響などタンパク質の 1 分子計測の際、問題となりうるファクターも見受けられた。実際に計測に用いたタンパク質は東京農工大の養王田正文教授から提供を受けた高熱細菌由来のシャペロニンである。シャペロニンは DXT を用いた計測から、高温 (70°C)、ATP 存在下で回転運動する様子が捉えられている。DET では使用する SEM の試料台が加熱できる仕様ではないため現時点では高温時の回転運動は計測できないが、ATP との結合は室温でも起こることが知られておりこれによる運動の変化が計測できると考え、DET を行った。シャペロニンは 7 量体がリング状に複合体を形成し更にこれが背中合わせに 2 つ積み重なった構造をしている。この上端を下端にチオール基が導入されている。そこで、隔膜上に極微量金を真空蒸着し、そこにシャペロニンを結合し、反対側の未反応のチオール基に金コロイド粒子を結合させることで、DET で 1 分子計測する計画を立てた(図 7)。金の真空蒸着はタングステン線に少量の金線を乗せ、電流を流し行った、このとき膜圧計を利用し、蒸着時間を変えながら金の蒸着量を変え、アイランド状に蒸着された最適量を決定した。また、シャペロニンの結合、金コロイド粒子の結合の各過程で非特異的な結合を防ぐための界面活性剤の量を決定した(図 8)。シャペロニン及び金コロイド粒子の結合の様子は SEM 像で判定し、DET を行った。その結果、予想通り、ATP を加えても特徴的な回

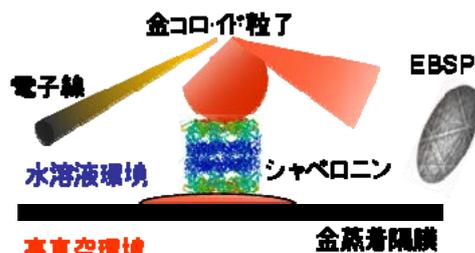


図7. DETによるシャペロニンの水溶液中における分子運動の1分子計測

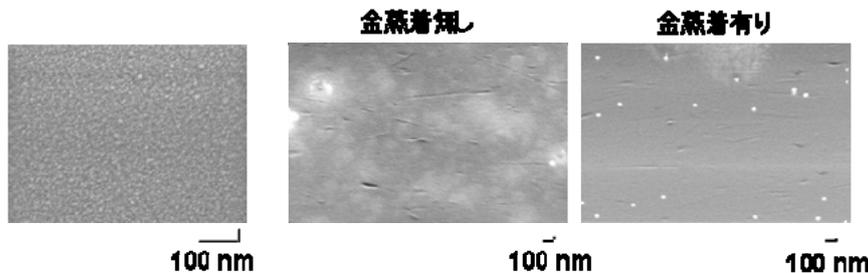


図8. 金蒸着アイランド状に施した隔膜(左). Wet Cell内、水中の隔膜上の金に結合したシャペロニンとラベルされた金コロイド粒子(右). 金蒸着無し隔膜を用いたコントロール(中央).

転運動は検出されなかったが、ATP 結合による運動量の変化および 3 次元運動特性の変化が観察された(図 9)。これにより、DET ではタンパク質に対するダメージは予想より小さくまた、照射圧や熱膨張の問題もタンパク質の運動性質を隠すほど大きなものでなく、十分 1 分子計測が可能であることが実証された。現在、養王田教授により室温でも回転運動が見られるシャペロニン変異体が作成されている。この変異体は発現精製が困難で現時点で DET に用いることはできていないが、近いうちに実施可能になる予定である。また、同時に種々のタンパク質に対して DET を行ってゆく予定である。

(2)研究成果の今後期待される効果

金コロイドを用いた計測が可能になったことは今後の DET 普及に大きな影響を及ぼしたところは明確である。次のターゲットは様々なタンパク質分子の3次元動画計測である。気にしていたダメージに関してもそれほど問題となっていない。今後の装置の高度化に関しては最初の目標はより高速化を狙う。最低マイクロ秒が目標となる。そのために、装置的な改造は2点。80 KeV 程度の高エネルギー電子線 SEM の方が隔膜の吸収を気にしないで金の EBSP を高感度に計測できる。しかし、通常の SEM 加速電圧は 30 KeV であるので特注での作製となる。しかし、メーカーも高エネルギー寄りの SEM という新しいジャンル

の装置創成には非常に興味を持っており、新規の電子顕微鏡ジャンルを開拓できる可能性が出てきた。今後実用化という点も考慮し、価格帯等を十分注意して装置構成を考えていく予定である。次の点は検出器の解像である。今回、世界で初めてイメージングインテンシファイアーを用いた EBSP 高感度計測を実現し、60 ms の高速連続計測を実現したが、より改造を進めればあと2ケタの高感度化が可能である。カメラ自身はクロック数を上げられる余地があり、1000 frame/sec は十分行ける。CCD チップは 640x480 ピクセルのもので、4x4 の Binning で動作させることで対応し、レンズによるフォーカスは集光率が非常に悪いので(ごく一部の情報のみ取り出している)、ファイバーカップリングの利用を検討している(約 80 倍の集光)。イメージ・インテンシファイアーを途中に入れることで十分 Gain も稼げる。この組み合わせでもような形の検出器で良いでしょうか。集光率はファイバーカップリングにより現状のものより、100 倍程度になりコントラストも良くなる。今までこれらの要素技術が現存しているにも関わらず、EBSP を動画として超高速に計測するというニーズがなかっただけで世界中だれも開発しようとしなかった。EBSP 動画のニーズは明確化させることができたので、企業の競争を煽りたい。また、最近注目されている原子層膜であるグラフェンを隔膜として利用する検討も始めている。現在のところ、グラフェンを真空と溶液の界面設定として意識した研究は皆無だ。共同研究を進めようとしている(これも3月までにある程度の成果が出る可能性がある)。このように、市販している金コロイドを使用できるということで、より装置の汎用性が出てきて各装置要因の高度化に気合が入ってきた。DET の提案者として責任を持って市場に出したいと考えている。サンプル系もバイオ材料だけではなく、有機材料(計測したいという要望を受けている)、または無機材料等の広域の分子内運動や原子移動を計測できる広域運動計測装置として確立していきたい。

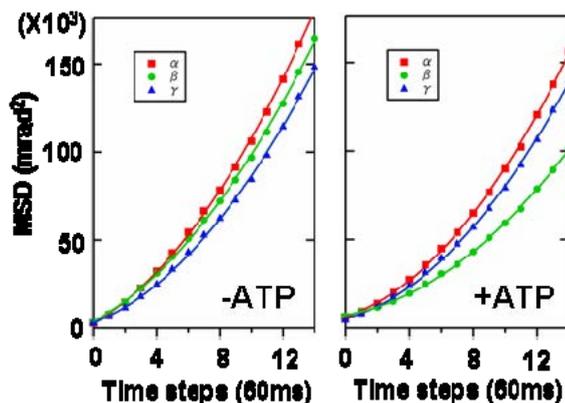


図9. DETによるシャペロニンの1分子計測より計算したMSD

4. 4 金川グループ(東京大学新領域創成科学研究科)

(1)研究実施内容及び成果

①研究のねらい: 免疫系分子認識プロセスの1分子動画計測

②研究成果

細胞性免疫反応の担い手である T 細胞が外来抗原を認識するためには、主要組織適合抗原

(MHC)が重要な役割を担っているという ZINKERNAGEL と DOHERTY の発見に端を発し、多くの免疫学者が抗原提示過程の解明を行って来た。その結果、外来抗原は、抗原提示細胞に取り込まれ、特異的なタンパク質分解経路に入っていく、その結果生じた抗原由来ペプチドがMHCに結合、ペプチド/MHC 複合体として細胞表面に発現されることが明らかになった。この複合体を T 細胞抗原受容体 (TCR) は認識し、免疫反応が惹起されるのである。TCR の認識系に必要な他の分子もほぼ同定され、それらの分子の結晶構造も解析されている。しかしながら、それらの分子の同定、解析にもかかわらず、外来の病原体に対する免疫反応の強度、持続性、さらには質 (T 細胞の反応がじっさいに病原体の排除につながるのかどうか) がどのように決められるかは、明らかでない。また、本来抑制されているはずの自己免疫疾患を起こす時のペプチド/MHC 複合体の特殊性も解決されていない。

人の自己免疫性の一型糖尿病の発生において、さらにマウス、ラットの一型糖尿病モデルにおいて多数の遺伝子が病因の候補とはなっているが、MHC が最も重要な遺伝因子であることは確実である。我々は、この疾患感受性を決める MHC (人では DQ2 と DQ8、マウスでは I-A^g7) が他の MHC に比較してペプチド結合性が弱いことを見だし、それと糖尿病発症との関係を示唆して来た。また、他のいくつかの代表的自己免疫疾患モデルに於いても MHC に対する低親和性ペプチドの存在が疾患の発症に重要であることが解っている。我々は、このペプチドの低親和性とは何かということに注目した。

T 細胞の活性化は、一義的には TCR と抗原ペプチド/MHC 複合体の間の親和性で決まる。しかしながら活性化にもいろいろのレベルがある。完全な活性化を起こし増殖するものから、サイトカインを出すだけで中途半端に終わるもの、逆に活性化が抑制されるものなど、リガンドの性質によって様々なものとなる。我々は、これらの様々な活性化状態の生まれる原因としては、TCR とペプチド/MHC 間の親和性の違いというよりは、ペプチドと MHC 間の親和性の違いにあると考えている。前者にはあまり差がなく、後者には大きな差がみられるからである。リガンドの性質を決めるのはペプチド/MHC の状態である。そこで、ペプチドが弱く結合している MHC の状態とはどのようなものなのか、動的構造を検証することにした。まずは、マウスにペプチドを免疫することにより、弱く結合したペプチドに反応する T 細胞を作り、それを基に構造的情報と生物学的情報を比較していくことにした。

我々は、モデルとして Hen egg lysozyme (HEL) タンパク質由来のペプチドが結合した I-A^k という MHC 分子を選んだ。まず、HEL タンパク質のアミノ酸残基 48-61 のペプチド (pHEL48-61) を B10.BR マウスに免疫した。B10.BR マウスは MHC として I-A^k を持つマウスである。それにより、反応性の異なる 2 種類の T 細胞を得た。一つは 3A9 細胞に代表されるもので、細胞内及び細胞外で形成された HEL 由来ペプチド/MHC 複合体に反応する。この T 細胞の抗原反応性は抗原ペプチドと I-A^k の親和性に非常によく相関する。もう一つは HS1 細胞に代表されるもので、細胞外で形成されたペプチド/I-A^k 複合体には反応するが、細胞内で形成された複合体には反応しない。さらに HS1 細胞は I-A^k への親和性が pHEL48-61 と比較して 5 倍低下する pHEL52-61 に対して、3A9 細胞より 100 倍強い反応を示すことが解った。また、pHEL48-61 の 52 番目の Asp を Ala に置換したペプチド

(pHEL48-61D52A) では、pHEL48-61 と比較して I-A^k への親和性が 4 倍程度低下し、HS1 細胞の反応は 30 倍程度低下した。すなわち、I-A^k への親和性がほぼ変わらない pHEL52-61 と pHEL48-61D52A で HS1 細胞の反応は 1000 倍以上の差が生じた。これらのことから、HS1 細胞はただ単に親和性の弱い複合体に反応するわけではないことが示唆された (図 1)。

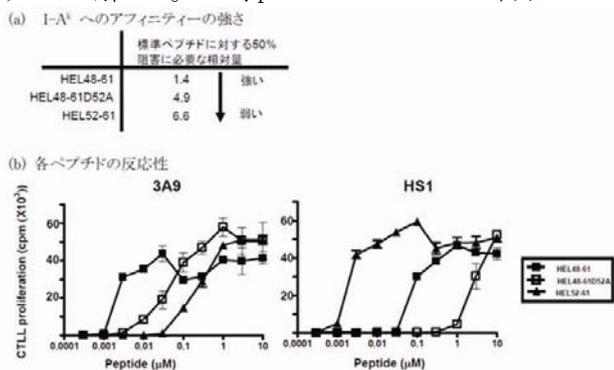


図 1. 3A9 T 細胞は反応の強さとアフィニティーの強さに相関が見られるが、HS1 には見られない。

我々はこの現象を説明するため、次のような仮説を建てた。弱い親和性を持つペプチド/I-A^kは、不安定な複合体を形成し、様々な形をとりながら運動する。HS1 細胞はその不安定な複合体が、安定なペプチド/MHC では取りえない、ある状態を取った時のみ認識できる。しかしながら、3A9 細胞は、安定な状態を見るため、分子揺らぎが大きいと認識できる構造の存在確率が減り、反応性が悪くなる。逆に強い親和性を持つペプチド/I-A^k は安定した複合体を形成し、3A9 細胞は非常によく反応するが、HS1 細胞は認識構造が出現しないため活性化されない、というものである。

そこでこの仮説を証明するために、ペプチド/I-A^k 複合体の分子運動を X 線1分子追跡法 (DXT 法) により計測した。pHEL48-61、pHEL52-61 および pHEL48-61D52A の各ペプチドと I-A^k 複合体を計測解析した結果、すべての複合体でペプチド自身の運動と I-A^k 本体の運動が相関していた。このことから MHC に比べてはるかに小さい分子であるペプチドが、複合体全体の分子運動を決定付けていることが解った。我々は、ペプチドの運動が異なっても複合体全体の運動は変わらないと予測していたので、この結果はとても意外なものであった。さらに、個々のペプチド/MHC 複合体の運動を比較すると、不安定な複合体と考えられる pHEL52-61/I-A^k および pHEL48-61D52A/I-A^k でより大きな運動をしていることが確かめられた。しかし、これらには分子の柔軟さに由来すると考えられる運動モーメントの違いが存在した (図 2)。

また、この結果は従来からペプチド/MHC 複合体の性質を解析する一つの手法として用いられていた SDS stability assay の結果と比較することで興味深いことが見えてきた。これはペプチド/MHC 複合体が SDS 存在下で複合体の状態を維持できるか否かを調べるものであるが、親和性の強い複合体にも関わらず SDS 耐性の低い複合体がみられ、親和性の強弱から SDS 耐性の強弱を説明することができなかった。現在のところ SDS 耐性の有無がどのような性質によるのか明らかになっていないが、我々は分子運動の大きさに関与しているのではないかと考えている。すなわち、分子運動が大きいと SDS 分子が複合体間に入り込み、最終的に複合体が分解する。現在のところこの考え方で、DXT による運動の大きさと SDS stability の有無の結果が良く一致している。これは DXT による一分子計測が、マスとしての分子動態を説明しようという点で非常に注目している (図 3)。

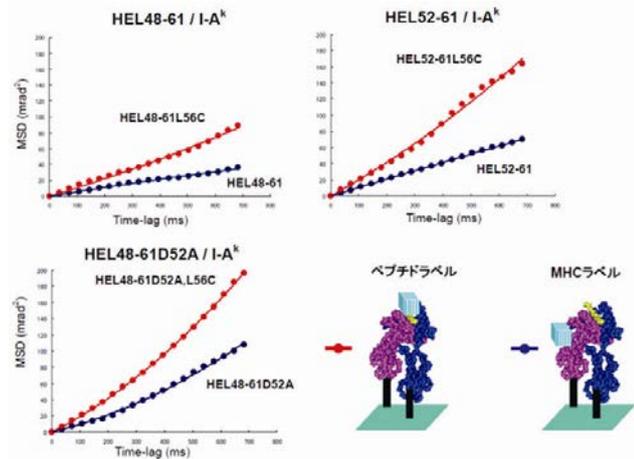


図 2. ペプチドにアフィニティーに影響しない場所で変異を入れペプチドにラベルした複合体と、変異をいれずに MHC 本体にラベルしたものを作成し、DXT により MSD 解析を行なった。アフィニティーの低い複合体である HEL52-61、HEL48-61D52A / I-A^k で大きな運動が観察された。また各ペプチドが複合体全体に影響を及ぼし運動の大きさに変化を与えていた。また、HEL48-61D52A / I-A^k では X 線放射圧の影響と考えられる外力を受け、パラボリックな曲線が描かれた。これは、この複合体が他に比べ柔軟な構造をしているためと考えられる。

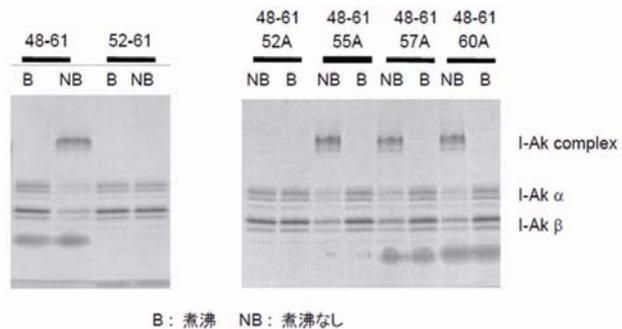


図 3. DXT の観察において分子運動の小さな複合体では SDS 耐性がみられる。

傾き運動
半径(θ)
方向

回転運動
円周(x)
方向

図 4a . 回折点の運動から二種類の運動について解析ができる。

更に DXT のデータを基に運動の詳細な解析を進めた。まず、図 4 に示すように回折点の動きは中心からの放射状方向(半径方向)と、円周方向の二通りに分けることができる(図 4a)。これを実際の分子の状態と、回折の起こり方を考えると、半径方向の運動はナノ結晶の回折面の向きによって、異なる角度での傾き運動であっても、同じ回折点の運動を示すことがある。ところが、円周方向の運動はナノ結晶の回折面の向きに関わらず、分子全体の回転運動を示すと想定された(図 4b)。

そこで、円周方向の運動に注目しそれぞれの複合体の運動を比較した。ただし、ペプチド/MHC 複合体は以前 DXT で解析された KcsA イオンチャンネルのような回転運動のための構造を持ったタンパク質でないため、この回転方向の運動は分子の柔軟性に由来する振動の一部だと考えられる。実際この運動は 0.1 Å 程度の非常に小さいものと考えられるが、DXT の最大の特徴である高分解能により、回折点の運動の中から円周方向の運動を抽出することに成功した。

その結果、p52-61/I-A^k 複合体では回転方向に対して速く大きな繰り返し運動が見られた。これはこの複合体で顕著に見られる現象で、分子運動の小さな pHEL48-61/I-A^k 複合体はもちろんのこと、 θ 方向で同じく大きな分子運動をしている pHEL48-61D52A/I-A^k 複合体では見られなかった。すなわち HS1 細胞が良く反応する複合体のみに特徴的な運動であった(図 5)。これらのことから 3A9 細胞はエネルギー状態の安定した複合体を認識し、HS1 細胞は安定状態から円周方向にずれた複合体を認識していると考えられる。

これらの結果は、T 細胞の抗原認識がペプチド/MHC 複合体の分子の揺らぎにより大きな影響を受けることをしめしている。さらには、低親和性のペプチドほどこの揺らぎが大きくなることによって、揺らぎの小さい高親和性のペプチドよりも T 細胞の活性化能力が高まるという従来の概念を一新し、免疫反応の理解を一步進めることになる発見であるといえる。

(2)研究成果の今後期待される効果

我々は、結合したペプチドがそれを支える MHC 自身の分子内部運動(分子揺らぎ)を規定することを明らかにした。さらに TCR によるペプチド/MHC 複合体の認識の研究を通じて、分子揺らぎが免疫反応におけるタンパク質間相互作用に重要であるということを示した。この概念は全く

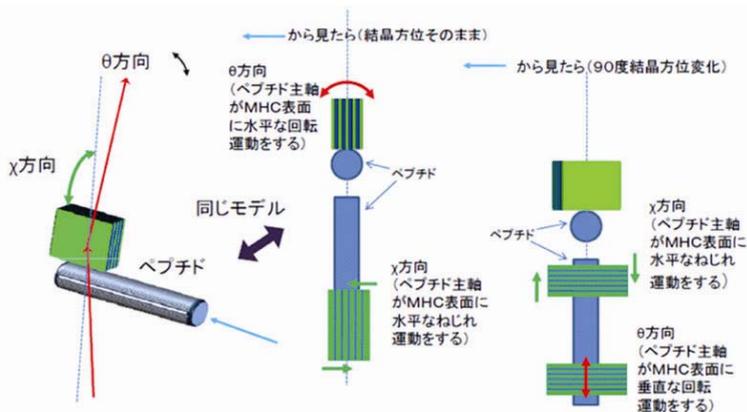


図 4b . 回転方向の運動は結晶の結合方向といったランダムに起こりうる要因に影響を受けにくく、異なる複合体間の運動の比較に適していると考えられる。このモデルでは結晶方向がそれぞれ 90 度異なる場合を想定している。この場合全く同じに見える半径 (θ) 方向の回折点の運動でも、結晶の結合方向によりペプチド-MHC 複合体の異なる方向への運動が起きている可能性を考慮しなくてはならない。ところが、円周 (χ) 方向の回折点の運動は結晶方向に関わらず、常にペプチド-MHC 複合体の回転方向への運動を示す。このことから、各ペプチド-MHC 複合体のより正確な比較がしやすいと考えられる。

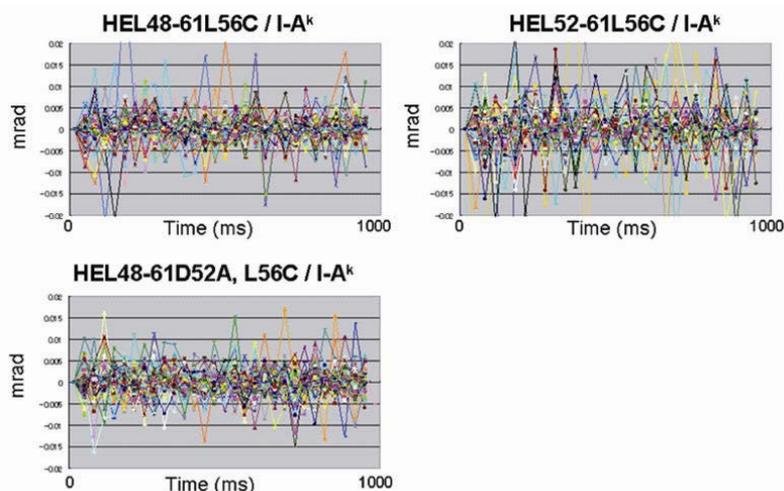


図 5 . 各ペプチド-MHC 複合体の $\Delta\chi$ プロット。各ペプチド-MHC 複合体において、複数の回折点を一秒間追跡し、回転方向の運動を抽出した。それぞれの点は 1 フレームごとに直前の位置からの χ 方向への移動量の差分を示している。HEL52-61/I-A^k で他より大きな回転運動が見られた。すべての複合体で短い時間間隔での往復運動がみられている。

新しいものである。これは構造生物学が進んでいた MHC 系研究にとっては非常に衝撃的で、このデータを見せても信用しない研究者が多くいた。彼らを納得させる多面的な分子内運動評価を進めなければならない。今後は、この概念を使って解決されていないより普遍的生物現象を説明して行こうと考えている。人の自己免疫疾患(自己免疫性血小板減少症、自己免疫性糖尿病)を惹起する自己抗原によるT細胞の活性化も、分子の揺らぎが関与しているか解析する。例えば、糖尿病の原因である分子揺らぎの多い抗原ペプチドが、胸腺で負の選択リガンドとして働かないのに、末梢では活性化して病気を起こしてしまうのは何故かといったことである。これらの研究を通じて、揺らぎの制御法を獲得し、人の自己免疫疾患発症制御、さらには感染症の制御が可能になることが期待される。

4-5 小園グループ(東京理科大学 生命科学研究所)

(1)研究実施内容及び成果

①研究のねらい: 免疫系分子認識プロセスの1分子動画計測

②研究成果

免疫系の中で特異的認識を行うのは T 細胞受容体(TCR)であり、そのリガンドが組織適合性抗原(MHC)である。我々は MHC とペプチドの動きが如何に機能と相関してくるか 1 分子反応解析を通して理解することを目的とした。MHC は細胞内に存在する抗原のペプチド断片を MHC 分子のフォールディングの一部として固く結合し、細胞表面で提示するという役割を持つ。T 細胞はその表面上にある T 細胞受容体(TCR)で抗原提示細胞上のペプチド/MHC 複合体を認識し、獲得免疫応答を開始する。TCR とペプチド/MHC 複合体の相互作用は、抗体-抗原反応に比較すると非常に弱い、抗原特異的であることも解っている。この相互作用の有無により異物であるウイルスや細菌が排除される。MHC 分子は自己のタンパク質も結合するため、自己免疫疾患も起こしうる。それ故ペプチド/MHC による T 細胞活性化の制御は、がん細胞の排除や自己免疫疾患の予防等にも欠かせないものである。TCR と MHC 系はタンパク質の相互作用を観察するうえでも特殊かつ普遍的なことを提唱する系である。他の生体内タンパク質リガンドとレセプターは共進化してきたため、鍵と鍵穴式のエントロピーのロスを伴わない結合をするものが主であるが、TCR の結合するものは本来的にはその TCR にとって未知のものであり、結合するかしないかの判断基準がそこに隠れている。生物体は、何らかの初期相互作用が系統だって進化したものであるのだから、その初期相互作用を観察しているとも言える。それ故 TCR と MHC は、長年、物理化学的解析の対象ともなってきた。結晶解析や Biacore による解析等である。しかし、それらで説明できない現象が多々出て来た。それらのうち我々の注目しているものは、MHC に弱く結合するペプチドが如何に特定の T 細胞を活性化するかということであり、もう一つは MHC が如何にペプチドを獲得するかということである。

研究手法としては、可溶性のタンパク質分子を昆虫細胞で大量発現させ、精製後、物理化学的手法で解析を行ってきている。Diffracted X-ray Tracking (DXT)に至るまでは平均的分子像をみるものでの解析を行った。それは熱力学的及び動力学的手法である。分解に伴う熱量測定(DSC)や X 線小角散乱(SAXS)、Biacore での相互作用解析なので

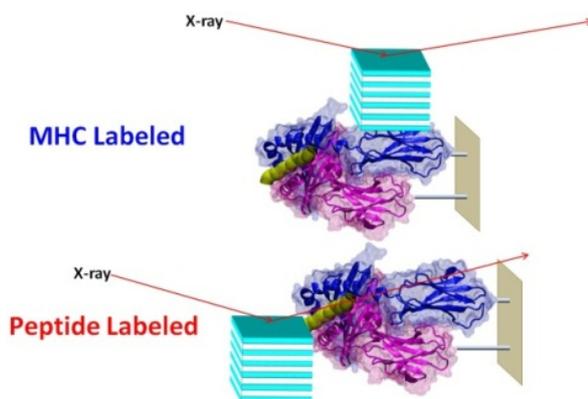


図1: TCRと特異認識するpeptide/MHCサンプルへのナノ結晶標識

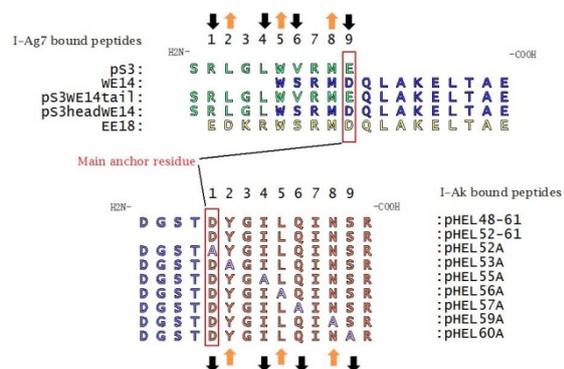


図2: 実験に用いたペプチド群。MHCとの結合に寄与する残基は下向き、TCR側の残基は上向きの矢印で表示してある。

る。それらの解析により、MHC では分子運動が種々の条件で異なり、それが機能発現に重要だという仮説を導くことができた。しかしながら証明はできなかつた。そこで 1 分子の動きをリアルタイムで見るというDXTを試みることになった。DXTでは、理想的には1分子の非常に小さな動きが検出できるはずである。我々は、ペプチドの中ほどのMHCとの結合に関与しない残基をCys残基に置換し、そこにナノクリスタルを結合させて測定している。また、MHCにはペプチド結合部位から離れたところにMet残基がありそこでMHC自体のラベルもできることになる。

(a) T細胞活性化との相関

T細胞活性化に関しては、金川グループとの共同研究で、I-A^kとそれに結合する数種類のペプチドを使い、①まずペプチドとMHCが独立に運動することを見出した。ペプチドはMHCのフォールディングの一部であるとそれまで考えられていたため、これは驚愕すべき発見であるといえる。②しかしながら同時に、ペプチドそのものがMHCのアロステリックな動き自体も規定していることが解った。③MHCのSDS耐性の獲得という現象がペプチド/MHCの拡散定数と相関することが解った。MHC IIのSDS耐性は、結合したペプチドの種類によりSDS-PAGEにおいてサンプルをボイルしない限りにおいては α 鎖と β 鎖が分離せずダイマーとして観察されるという現象である。MHCが安定にペプチドを獲得した時の指標として簡便性ゆえに広く用いられている方法であるがその原理は明らかでなかつた。この測定がその理解を大きく進めたと言って過言ではない。④ペプチドの収容溝内での回転する動きが特定のT細胞群の活性化と相関することを見出した。⑤また、ペプチドの違いによって収容溝内で拘束された運動を示すものと、自由な運動をするものに分けられることが解った。

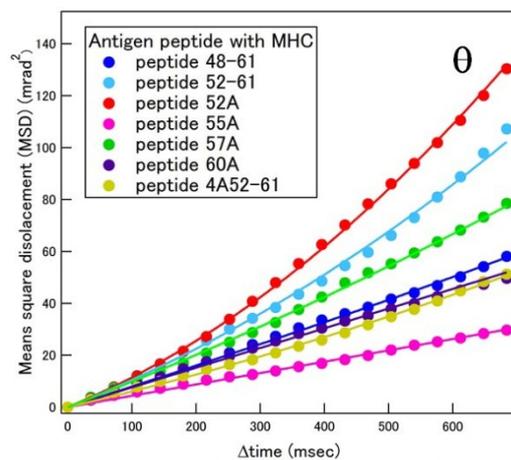


図3: 色々なpeptideの分子運動の違い

(b) MHCに結合したペプチドの動態の継時変化

これらの研究において偶然、ペプチド運動がそのMHCとのインキュベーション時間が異なると運動性も大きく変わってくることに気付いた。通常、ペプチドの交換反応はpHを低くして16時間程度インキュベートした後、pHを中性に戻すことによって行う。その後の時間経過は、あまり関係ないと考えられていた。しかしながら、最近 typeB T細胞という比較的弱く結合したペプチド/MHC複合体を認識するT細胞の一部は継時的にその反応性を失っていくものがあることが解って来た。つまり、そのT細胞の認識するリガンドの形が変化するということを意味するものである。そこで、DXTでその変化を追うことにした。すると短いペプチドを結合した pHEL52-61/I-A^k複合体でも長いペプチドを結合した pHEL48-61D52A/I-A^k複合体でも経時的にペプチドの運動が小さくなっていくことが解った。特に長いペプチドを結合した pHEL48-61D52A/I-A^k複合体でその傾向が顕著であった。このことはT細胞活性化という生物学的特性がDXTによるペプチドの動きの測定結果と一致しうることを意味する。これはDM分子というMHCのペプチド交換を行う触媒作用が比較的長い時間を経て可能になっているものと考えた。DMはMHC IIのホモログであり同じ染色体上に存在する遺伝子重複によってできた遺伝子である。DMが欠失した細胞では抗原のT細胞への提示効率が非常に悪くなることが知られている。DMはペプチド交換を促進してT細胞活性化を容易にすると考えられた。次にDMの機能解析を行うこと

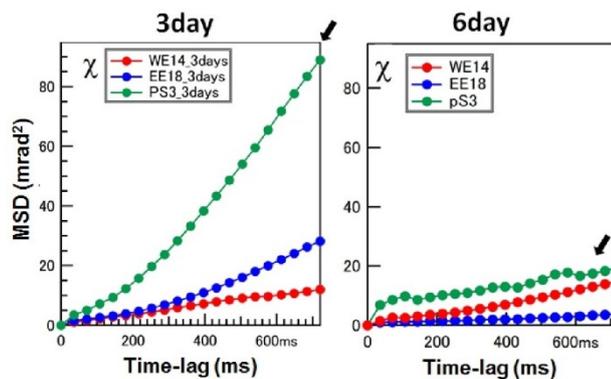


図4: 予想しなかつた分子内運動の継時変化

にした。

(c) MHC タンパク質の pH 依存性の性質

DMの機能を解析するうえで、ペプチド交換に関するMHC自体の特性をまず観察した。というのはin vitroではDMなしでペプチド交換は起こってしまうのである。MHCは生合成後インバリアント鎖と呼ばれるシャペロンと結合してMIICというライゾソームに似た、プロテアーゼに富みDMの局在する酸性小胞に運ばれる。そこで、プロテアーゼによりインバリアント鎖は分解され、CLIPというインバリアント鎖由来のペプチドがMHCのペプチド収容溝に残ることになる。そのCLIPペプチドを追い出し、抗原ペプチドを乗せることをペプチド交換と呼ぶ。In vitroでは、pHを酸性に下げ、MHCと抗原ペプチドを混在させるだけで抗原ペプチドはMHCに乗ってしまうということが判っていた。DSCによる熱量測定解析では、MHCはpH5でpH7よりも安定で、それはエントロピックな安定化であるという結論が出ていた。これは、pH5で分子運動が昂進していることを示唆していた。そこでDXTによりpH5とpH7のMHC/ペプチドの動きを解析すると、予測通りpH5で動きが大きいことが判った。しかしながら、in vivoではDMの働きは必須である。そこでDMを作製し、そのMHCに及ぼす効果を解析した。

(d)DMの機能解析

マウスH-2DMの作製を試み、数回目で成功した。そのDMのMHCとの親和性は低く、Biacoreでは特異的反応がかすかに見られる程度のものであった。しかしながら、DXTでの効果は大きなものがあった。DMと反応したMHCは非常によく動いていることが観察されたのである。DM混在状態でも、DMと反応後DMを洗い落としてから測定しても、ブラウン運動の大きさがDM未処理のMHCに結合したものに比べ明らかに大きかった。これは予期せぬ結果であった。我々は、DM結合時はペプチドの動きが大きく、DM反応後のMHCに於いては、ペプチドが強く深く結合し、動きは小さくなることを予測していた。ところがDMが離れた後も動きが大きいことが判ったのである。これは予期せぬ発見であった。DMがMHCのあるスイッチを押すことにより活性化状態が現れるというわけである。MHCへのペプチドの結合はまだ謎が多い。一つのペプチドが一つのMHCに結合しているだけで、いくつもの構造的アイソタイプの存在が示唆されている。また、DMの機能を代替する小分子がいくつも見つかった。さらに、In vitroではペプチド交換自体はDMなしでも容易に起こる。しかしながら、DM欠損マウスではT細胞の活性化に支障がでる。これらのことはDMの機能は単にペプチド交換を促進するのではなく、MHCに新たな機能を与えているといっても過言ではないことを示唆している。我々の発見は、それを強く支持するのではないだろうか。

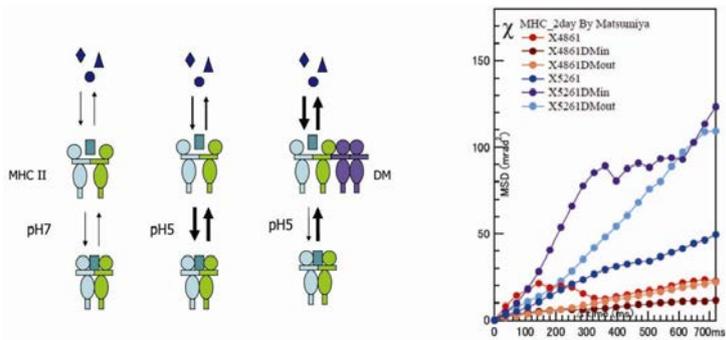


図5：DM機能の予測図（左）。DXTでは分子内運動が増幅していた（右）。

(e) I-Ag7の性質

次に、自己免疫を起こしやすいMHCであるI-Ag7に注目した。I-Ag7は一型糖尿病を起こす最重要因子である。最近、一型糖尿病の原因ペプチドが報告された。しかしながらそのT細胞活性化能はペプチドライブラリーから選択されたミモトープ

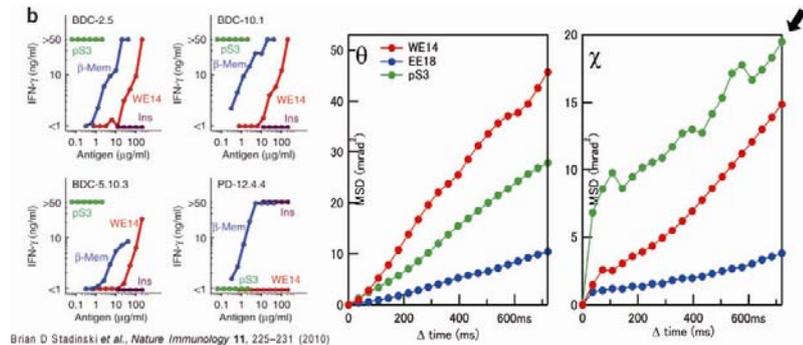


図6：I-Ag7に於いても活性化能のあるペプチドはχ方向の動きが大きい。

と比較すると千倍から一万倍ほど弱いこともわかっている。ミモトープもナチュラルリガンドも同じコア配列を持ちながら活性が全く異なるのである。我々は、上記結果(1)で短いペプチドは動きが大きくペプチド収容溝よりはみ出た長いペプチドは動きが小さいこと、それが T 細胞活性化に相関することを見出していた。そこで、まずそれらの動きを DXT で追うと I-A^b の場合と同様に、短いミモトープの方が長いナチュラルリガンドより χ 方向の動きが大きいことが観察された。つまり、2つの MHC アイソタイプでペプチドの回転運動の動きと T 細胞活性化が相関することが示されたわけである。現在、ミモトープそのものに余分の配列を加え、動きが抑制されるのか、実験中である。また、人為的に動きの抑制されたペプチドで T 細胞活性化が抑制されるのか、実験を試みている。

(2)研究成果の今後期待される効果

着手したがまだ結果の出ていないプロジェクトとして「ペプチド依存性の MHC の品質管理機構」がある(3月の報告)。MHC はその結合したペプチドにより細胞表面での半減期が異なることが知られている。また、MARCH I と呼ばれるユビキチンリガーゼは発達分化段階での抗原提示細胞上の全体量を制御することが知られている。そこで我々はペプチド依存的に MHC が細胞表面からいなくなるのは「揺らぎ」を基準としたユビキチン化がされるからではないかと考え、MARCH I KO マウス及び機能未知だが *in vitro* では MHC のユビキチン化が行える MARCH VIII KO マウスでの解析を準備中である。次に、TCR の動きを直接観察することを目論んでいる。今までの測定はペプチド/MHC 側のものに限られていた。TCR それ自体はシグナル伝達するような細胞質ドメインはなく、周囲に存在する CD3 を介してシグナルを伝える。つまり、TCR は何らかの働きかけを CD3 に対して行うはずなのでそれを DXT で観察しようというのである。さらに(e)で述べたようにペプチドの揺らぎを制御することで T 細胞の活性を制御することを目論んでいる。既に様々な自己免疫疾患に関わるペプチドの分子内運動が DXT によって同定されている。また、様々なガン抗原ペプチドが同定されているのでその運動も計測可能である。それらのペプチドのコア部分を変えずに長さだけを変えることにより揺らぎを変化させる。それにより、自己免疫は抑制し、抗腫瘍免疫は昂進するといった制御が可能になるかもしれない。このように、本研究は peptide/MHC 系から初めて TCR/peptide/MHC 系へと進化し、その多くの重要 peptide の分子内運動を peptide 自身の運動と peptide が交換されることによりその運動や形状自身が変化する MHC に着目しながら、TCR 自身の運動や形状変化もモニターする研究を今後も継続し、自己免疫疾患等のマクロな疾病に1分子内部運動がどのように絡んでいるか、またその運動を制御及び抑制している分子の存在を明確化していきたい。この5年間の研究で TCR/MHC 系において「分子内部運動」が極めて重要な物理因子であることが明確化され、そこに新しい分子認識システムが隠されていることが理解できたことは、免疫学だけではなく、分子間相互作用を考える上でも極めて重要な成果と言える。

4-6 久保グループ(産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門)

(1)研究実施内容及び成果

①研究のねらい: 膜系 1 分子計測

②研究成果

ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)は、神経筋接合部位や中枢神経系シナプスに局在するイオンチャンネル型受容体で、神経伝達物質アセチルコリンが結合するとカチオンを細胞内に透過して細胞の電気的興奮性を変える。nAChR は神経における情報伝達の中心的な役割を担い、またシビレエイ発電器官に局在発現しているため、タンパク質レベルでの特性解析や生理生化学的・薬理学的研究が膜受容体の中では先行している。一方、膜受容体とリガンドの相互作用に関する分子動態については、解離・会合過程の速度論的解析や熱力学的解析はあるものの、構造の動的変化については既存の技術で捉えることは困難であるため未だ解明が進んでいない。本研究では、研究代表者である佐々木が長年培ってきた放射光由来の X 線を利用した 1 分子計測技術(DXT)を利用して、nAChR とアセチルコリン

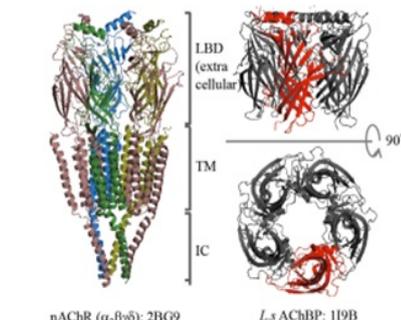


図1. ニコチン性アセチルコリン受容体とアセチルコリン結合タンパク質の構造モデル

などのリガンドとの相互作用に伴う受容体の分子動態を明らかにする。最終的にはこの分子挙動の変化と機能変化との関連性を解明することを目的としている。

nAChR は 4 回膜貫通型のイオンチャネル受容体で、その N 末端から第 1 膜貫通領域までの約 230 アミノ酸は細胞外領域にあってアセチルコリンなどのリガンドとの結合に関与する。我々は、海産軟体動物アメフラシ (*Aplysia kurodai*) 中枢神経系より nAChR のこの細胞外ドメインと相同性のあるタンパク質を同定した(投稿準備中)。Sixma らは独立にヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) から同定し、それをアセチルコリン結合タンパク質 (Acetylcholine Binding Protein, AChBP) と命名した。AChBP は神経系 nAChR (alpha 7) とアミノ酸配列の相同性が高く、両者は同様のリガンド選択性を示す。また nAChR と同様にサブユニットが 5 個会合して機能することを確認している(図 1, 2)。そのため、AChBP にリガンドが結合したときに起こる構造変化は、受容体 nAChR にリガンドが結合しイオンチャネルが開くまでの分子動態を解析する上で、細胞外領域での変化を解析するモデルシステムになると考えられる。

本研究では、先ず AChBP の N 末端および C 末端をそれぞれ 6 x His tag (H₆)あるいは Strep tagII (St) で修飾した H₆-AChBP、H₆-AChBP-St、St-AChBP-H₆ のコンストラクトのタンパク質を調製した(図 3)。AChBP は H₆ を介して基板に固定し、Strep tag - Streptavidin を介して金ナノ結晶を AChBP に固定する。その後、Streptavidin の影響を除く目的で Strep tag の代わりに Cys あるいは Met を末端に持つコンストラクトも作った(図 3)。これは Cys や Met の側鎖にある硫黄原子を介して金ナノ結晶を結合させるものである。

また、佐々木の異動に伴い関東地区での放射光施設利用の可能性を検討した結果、JST/ERATO(腰原プロジェクト)によって 5 年前に建設された PF-AR-NW14(KEK)では、DXT の実験に利用可能であることが予備実験によって確認された。このビームラインの設計者は DXT の最初の計測を行った SPring-8 BL44B2 の BL 担当者の足立氏であったことより、若干の投資を行う事で SPring-8 と同等(高速実験を除く)の実験が可能であると考えている。今後の利用を増やす予定である。この試料に X 線を照射して得られる回折点の動きを計測することにより AChBP の水溶液中での数秒間の分子運動をサブミリ秒の時分解で計測する。これをリガンドの有無によって分子挙動がどのように変化するかを計測した。さらに今年度は、原子間力顕微鏡(AFM)を用いてアセチルコリン ACh の存在・非存在に依存した AChBP の剛性に関する計測を行った。

図 2 に精製した His₆-AChBP のゲル電気泳動パターンを示す。変性ゲル電気泳動では単一

表 1 作製した AChBP と α -bungarotoxin との結合定数 K_D

	M.w. (a.a.)	K _D (aBTx)
His ₆ -AChBP	25.8 kDa (229)	30 nM
His ₆ -AChBP-StreptagII	26.9 kDa (239)	1 μ M
StreptagII-AChBP-His ₆	26.9 kDa (239)	
His ₆ -AChBP-CysTag	26.2 kDa (235)	1 μ M
His ₆ -AChBP-MetTag	26.6 kDa (239)	5 μ M
StreptagII- Δ 111aa/AChBP-His ₆	25.5 kDa (228)	0.5 μ M

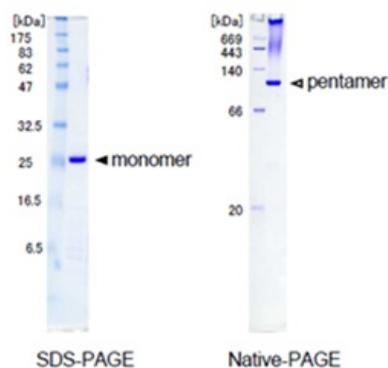


図2. 精製したAChBP: 変性ゲル電気泳動(左)では単量体が、未変性ゲル(右)では五量体に相当する位置にバンドが確認された。

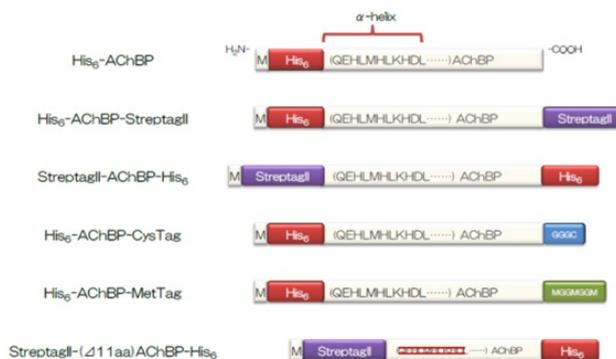


図3 調製したアセチルコリン結合タンパク質(AChBP)の概略図

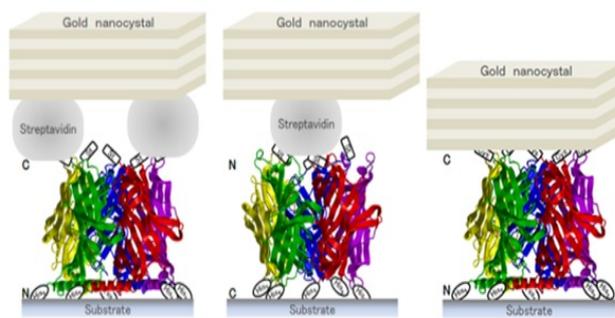


図4 AChBP, Streptavidin, 金ナノ結晶の想定される結合様態

ンドとなり、未変性ゲル電気泳動では、分子量が 5 量体に相当する位置に主たるバンドが認められた。このことから、立体構造を保持しながら十分に精製されたことが示唆される。調製した AChBP が本来の活性を持つことを検証するために、各コンストラクトについて alpha-bungarotoxin との結合活性を表面プラズモン共鳴法 (SPR) もしくは蛍光相関分光法 (FCS) を用いて解析した (表 1)。類縁の AChBP が示す K_d 値 1.8 nM (*Lymnea*), 250 nM (*Aplysia carifornica*) とほぼ比較できる値と見なすことができる。

(1) 図 5 には H₆-AChBP-Streptag-Gold のコンフィギュレーションで行った高輝度 X 線による回折点の動きを解析した結果を示す。アセチルコリン存在下で半径 (θ) 方向および円周 (χ) 方向への運動が有意に増加していることが判明した (図 5、赤点)。一方、nAChR のブロッカーとして知られる bungarotoxin (BgTx) 存在下では、 θ 方向の運動の増加が認められるが χ 方向の運動はフリー状態とあまり変わらないことが判明した (図 5、緑点)。

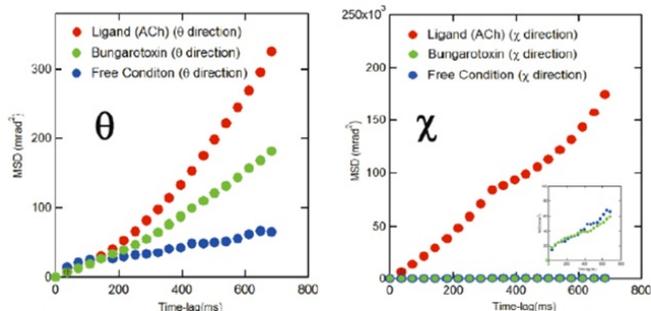


図5 X線回折点の半径(θ)方向および円周(χ)方向運動の解析
リガンド無し(青点)あるいはアセチルコリン(赤点)やフンガロトキシン(緑点)存在下での運動解析

(2) 劈開したマイカ表面に AChBP を吸着させ、アセチルコリンの存在/非存在下での AFM 画像を解析した。その結果、アセチルコリン非存在下で AChBP の高さが 5.0 ± 1.2 nm に対して、1 mM アセチルコリン存在下ではそれが 4.5 ± 1.1 nm に変化した。また、マイカ基板に播いた AChBP に対して AFM 探針による押し込み応力測定を行った結果、AChBP はアセチルコリン存在下では非存在下に比べてヤング率が低くなるということが判明した。

(1) の結果から、AChBP はアセチルコリンとの結合によって分子摂動が半径及び円周両方向ともに激しくなったことが示唆される。この結果は、AFM で直接 AChBP の形状及び弾性を計測した (2) の結果とも呼応する。即ち、分子の摂動が激しくなることにより AChBP 分子の統計的な容量の減少とタンパク質分子が柔らかくなる現象が観察されたと解釈される。従来、受容体にリガンドが結合するとその強固な相互作用により分子運動がむしろ制限されることが知られているが、今回 AChBP で見られたような相互作用形態は今までに報告は無い。

nAChR では、この細胞外ドメインでの摂動が膜貫通領域を構築する分子構造にも連動することが想定される。即ち、リガンドが無い状態では、主に 2 番目の膜貫通領域 (M2) で構成される疎水性フィルターにより水とイオンが透過しにくい状態にあるが、agonist の結合により分子内運動が惹起されて疎水性フィルターが緩み、チャンネルの開口確率を高めていることが考えられる。

今後は、nAChR のリガンド結合領域での激しい摂動が膜貫通領域に伝搬してチャンネルポアを確率的に広げるという作業仮説を検証するために、リガンド結合部位を含む細胞外ドメインに加えて膜貫通領域と細胞内ドメインを持つ nAChR 全体を用いた計測をすることにより、リガンド結合に伴う細胞外ドメイン構造の変化とそれに伴うチャンネル構成領域の構造変化を観察することが必要である。シビレエイ発電器官から調製した nAChR を用いた予備的な実験において、AChBP で確認されて同様の動きが細胞外領域で観察された。変異を導入した nAChR を調製するために、カエル卵母細胞を用いた発現系などを用いる。

(2) 研究成果の今後期待される効果

神経伝達物質とその受容体との相互作用に関する研究は、物理化学的な手法により古くから多くの研究者により研究されてきた。しかしながらリガンドと結合もしくは結合過程にある膜受容体の構造が解明されていないため、本課題は従来の研究とは大きく異なる。nAChR におけるこの分子動態の解明は、nAChR と類似性の高いセロトニン受容体、グリシン受容体、GABA 受容体、等のイオンチャンネル型受容体全般に演繹できると考えられる。またこれらの受容体は神経系疾患などを対象とする創薬の標的分子となっており、低分子薬デザインのための重要な構造知見を提供することが期待される。また、これらの受容体チャンネルが機能するときの詳細な分子動態が解明されると、この動きの特定の遷移過程・遷移状態を制御するという新たな創薬コンセプトを創生することも夢ではない。今後の研究方向として、より *in vivo* に近い状態における分子内部運動の計測が重要に

なる。AChR 系では、神経筋接合部位や中枢神経接合部位においてチャンネル分子同士(クラスターリング)やチャンネル分子と他分子との相互作用を分子内部運動という全く新しくかつ究極的な情報を通して「分子内部運動」との相関を定量的に計測し、その制御法も確立させることを目標にする。これら研究成果の意義は、生物学全般に渡り、医薬学や計算科学の進展にも影響を及ぼす。1分子の機能がマクロ(ここでは神経筋接合部位等)にどのような速度でどのような運動として取り出されているかを定量的に議論でき、最近注目されているユビキチン系のような「揺らぎ」と密接に関係すると言われる現象も定量的な解決がされれば多くの生物学関連の分野にこの研究の影響が及ぶ。計算科学や薬理学的な領域の研究にもその高速性と1分子性という共通点から今後積極的に絡み合い大きな研究方向を誘導する。本研究成果の学術的な意義は計り知れず、最先端計測技術が新しい学問体系を構築できる可能性もある。その結果、例えば薬理的な分子設計の指針に「分子内運動」という新しい因子が重要視され、病気のマカニズムに新たな解釈を与える基盤情報を与えるかもしれない。これら全く新規な相互作用測定を短時間を実現できる組織の基本がここで築かれた久保Gと宮澤Gと佐々木Gの共同体である。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 40 件)

【2008 年度】

(金川G)

1. Yamasaki S, Takase-Utsugi M, Ishikawa E, Sakuma M, Nishida K, Saito T, Kanagawa O. Selective impairment of FcεRI-mediated allergic reaction in Gads-deficient mice. *Int Immunol*. 20(10):1289-97(2008). Epub(2008)
2. Tomura M, Yoshida N, Tanaka J, Karasawa S, Miwa Y, Miyawaki A, Kanagawa O. Monitoring cellular movement in vivo with photoconvertible fluorescence protein "Kaede" transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5;105(31):10871-6(2008) Epub (2008)
3. Mori Y, Kato T, Kodaka T, Kanagawa EM, Hori S, Kanagawa O. Protection of IFN-γ signaling-deficient NOD mice from diabetes by cyclophosphamide. *Int Immunol*. 20(9):1231-7(2008). Epub (2008)

【2009 年度】

(佐々木G)

4. K. Ichiyonagi, T. Sato, S. Nozawa, K. H. Kim, J. H. Lee, J. Choi, A. Tomita, H. Ichikawa, S. Adachi, H. Ihee, and S. Koshihara, "100-picosecond time-resolved solution scattering utilizing wide-bandwidth X-ray beam from multilayer optics", *J. Synchrotron. Rad.* 16, 391-394, (2009).
 5. A. Tomita, T. Sato, K. Ichiyonagi, S. Nozawa, H. Ichikawa, M. Chollet, F. Kawai, S. Y. Park, T. Tsuduki, T. Yamato, S. Koshihara, S. Adachi: "Visualizing breathing motion of internal cavities in concert with legend migration in myoglobin", *Pro. Natl. Acad. Sci.* 160, 2612-2616 (2009).
 6. T. Sato, S. Nozawa, K. Ichiyonagi, A. Tomita, M. Chollet, H. Ichikawa, H. Fujii, S. Adachi, and S. Koshihara, "Capturing molecular structural dynamics by 100 picosecond time-resolved X-ray absorption spectroscopy", *J. Synchrotron.* 16, 110-115 (2009).
 7. P. Coppens, M. Pitak, M. Gembicky, M. Messerschmidt, S. Scheins, J. Benedict, S. Adachi, T. Sato, S. Nozawa, K. Ichiyonagi, M. Cholett, and S. Koshihara: "The RATIO method for time-resolved Laue Crystallography", *J. Synchrotron. Rad.* , 16, 226-230 (2009).
- (八木G)
8. Matsuo, T. and Yagi, N. Structural Changes in the Muscle Thin Filament during Contractions Caused by Single and Double Electrical Pulses. *J. Mol. Biol.* **383**, 1019-1036 (2008).
- (金川G)
9. Tsuji M, Komatsu N, Kawamoto S, Suzuki K, Kanagawa O, Honjo T, Hori S, Fagarasan S. Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science*.;323(5920):1488-92. 2009 Mar 13.

10. Miletic AV, Graham DB, Sakata-Sogawa K, Hiroshima M, Hamann MJ, Cemerski S, Kloepfel T, Billadeau DD, Kanagawa O, Tokunaga M, Swat W., Vav links the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton and T cell activation independently of intrinsic Guanine nucleotide exchange activity. *PLoS One*. 2009 Aug 12;4(8):e6599. (2009)

(久保G)

11. Nakajima, Y., Okamoto, H., & Kubo, T. “Expression cloning of *Xenopus* zygote arrest 2 (Xzar2) as a novel epidermalization-promoting factor in early embryos of *Xenopus laevis*.” *Genes to Cells* 14: 583-595 (2009)

12. Yamaguchi J, Naimuddin M, Biyani M, Sasaki T, Machida M, Kubo T, Funatsu T, Husimi Y, & Nemoto N. “cDNA display: a novel screening methods for functional disulfide-rich peptides by solid-phase synthesis and stabilization of mRNA-protein fusions.” *Nucleic Acids Res.* in press (2009) ; doi: 10.1093/nar/gkp514 (2009)

【2010 年度】

(佐々木G)

13. C. Lesoil, T. Nonaka, H. Sekiguchi, T. Osada, M. Miyata, R. Afrin, and A. Ikai, “Molecular shape and binding force of Mycoplasma mobile’s leg protein Gli349 revealed by an AFM study”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391:1312-1317 (2010).

14. S. Nozawa, T. Sato, M. Chollet, K. Ichiyanagi, A. Tomita, H. Fujii, S. Adachi, and S. Koshihara: “Direct Probing of Spin State Coupled with Electronic and Structural Modification by Picosecond Time-Resolved XAFS”. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 61-63, (2010).

(八木グループ)

15. Matsuo, T., H. Iwamoto and N. Yagi. “Monitoring The Structural Behavior of Troponin and The Myoplasmic Free Ca²⁺ Concentration During Twitch of Frog Skeletal Muscle.” *Biophys. J.* 99, 193-200, 2010 (doi: 10.1016/j.bpj.2010.04.021).

16. N. Yagi. Mechanism Of Latency Relaxation In Frog Skeletal Muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* (in press)

17. N. Yagi. A Scanning SAXS/WAXS Study of Rat Brain. *J. Physics: Conference Series* (in press)

18. Shinohara, Y., R. Imai, H. Kishimoto, N. Yagi and Y. Amemiya. “Indirectly illuminated X-ray area detector for X-ray photon correlation spectroscopy.” *J. Synchrotron Rad.* 17, 737-742, 2010. (doi:10.1107/S090904951003726X)

(金川グループ)

19. Ota N, Takase M, Uchiyama H, Olsen SK, Kanagawa O. No requirement of trans presentations of IL-15 for human CD8 T cell proliferation. *J Immunol.* 2010 Nov 15;185(10):6041-8. (2010)

20. Aiba Y, Kometani K, Hamadate M, Moriyama S, Sakaue-Sawano A, Tomura M, Luche H, Fehling HJ, Casellas R, Kanagawa O, Miyawaki A, Kurosaki T. Preferential localization of IgG memory B cells adjacent to contracted germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jul 6;107(27):12192-7. (2010)

21. Tomura M, Itoh K, Kanagawa O. Naive CD4⁺ T lymphocytes circulate through lymphoid organs to interact with endogenous antigens and upregulate their function. *J Immunol.* 2010 May 1;184(9):4646-53. (2010)

22. Fagarasan S, Kawamoto S, Kanagawa O, Suzuki K. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu Rev Immunol.* 2010 Mar;28:243-73.(2010)

23. Shimura E, Hozumi N, Kanagawa O, Metzger D, Chambon P, Radtke F, Hirose S, Nakano N. Epidermal gammadelta T cells sense precancerous cellular dysregulation and initiate immune responses. *Int Immunol.* 2010 Apr;22(4):329-40. (2010)

24. Tomura M, Honda T, Tanizaki H, Otsuka A, Egawa G, Tokura Y, Waldmann H, Hori S, Cyster JG, Watanabe T, Miyachi Y, Kanagawa O, Kabashima K. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest*. 2010 Mar 1;120(3):883-93. (2010)
(小園グループ)
25. N. Ogawa, H. Kozono, M. Takase, N. Ohta, H. Sekiguchi, Y. C. Sasaki, O. Kanagawa: (2010)
Role of dynamic motion of peptide/MHC complex for T cell activation. Submitted.
(久保グループ)
26. Yassaka, R.T., Inagaki, H., Fujino, T., Nakatani, K., & Kubo, T. “Enhanced activation of the transient receptor potential channel TRPA1 by ajoene, an allicin derivative.” *Neuroscience Research* 66: 99-105 (2010)
27. Hirabayashi, M., Ohashi, H., & Kubo, T. “Design of bio-inspired multi-stage regulations for diagnostic molecular automata.” *J. Computational and Theoretical Nanoscience* 7: 831-839 (2010)
28. Inagaki, H., Yamauchi, Y., Toriba, M., & Kubo, T. “Regional divergence of phospholipase A2-like protein cDNAs between New Guinean and Australian *Pseudechis australis*.” *Toxicon* 56: 637-639 (2010)
29. Naimuddin, M., Kobayashi, S., Tsutsui, C., Machida, M., Nemoto, N., Sakai, T., & Kubo, T. “Directed evolution of a three-finger neurotoxin by using cDNA display yields antagonists as well as agonists of interleukin-6 receptor signaling.” *Molecular Brain*, in press

【2011 年度】

- (佐々木G)
30. T. Hakari, H. Sekiguchi, T. Osada, K. Kishimoto R. Afrin, and A. Ikai, Non-linear displacement of ventral stress fibers under externally applied lateral force by an atomic force microscope, Cytoskeleton, in press (2011)
31. K. Ichiyanaqi, H. Sekiguchi, S. Nozawa, T. Sato, S. Adachi, and Y.C. Sasaki, Laser-induced picosecond lattice oscillations in submicron gold crystals, *Phys. Rev. B*, 84: 024110 (2011)
32. Y. Arai, K. Okabe, H. Sekiguchi, T. Hayashi and M. Hara, “Nanoscale chemical composition analysis using peptides targeting inorganic materials”, *Langmuir* 27:2478-2483 (2011)
33. T. Watanabe-Nakayama, S. Machida, I. Harada, H. Sekiguchi, R. Afrin and A. Ikai, “Direct detection of cellular adaptation to cyclic stretching at the single cell level by atomic force microscopy”, *Biophysical Journal* 100:564-572 (2011)
34. H. Ichikawa, S. Nozawa, T. Sato, A. Tomita, K. Ichiyanaqi, M. Chollet, L. Guerin, N. Dean, A. Cavalleri, S. Adachi, T. Arima, H. Sawa, Y. Ogimoto, M. Nakamura, R. Tamaki, K. Miyano, and S. Koshihara: “Transient photoinduced ‘hidden’ phase in a manganite, *Nature Materials*(査読有). 10, 101-105, (2011).
(八木G)
35. N. Yagi “A Scanning SAXS/WAXS Study of Rat Brain.” *J. Physics: Conference Series* 272, 012009, 2011. (doi:10.1088/1742-6596/272/1/012009)
36. T. Matsuo and N. Yagi. “Measurement of Persistence in YAG:Ce³⁺ Scintillator with Pulsed Synchrotron X-rays.” *J. Synchrotron Rad.* 18, 601-604, 2011.
(doi:10.1107/S0909049511010843)
(石川G)
37. Dynamical Observation of Motion of Gold Nano-Crystal in Water using Diffracted Electron Tracking (DET) with Use of Wet Cell SEM, Akira Ishikawa, Yasuhisa Hirohata, Yuji C. Sasaki
Proceedings of 17th International Microscopy Congress, I10.13 (2010)
(久保G)

38. Ono, S., Kimura, T., & Kubo, T.* “Characterization of voltage-dependent calcium channel blocking peptides from the venom of the tarantula *Grammostola rosea*.” *Toxicon* 58: 265-276 (2011), doi:10.1016/j.toxicon.2011.06.006
39. Naimuddin, M., & Kubo, T.* “Display of disulfide-rich proteins by cDNA display and disulfide shuffling assisted by protein disulfide isomerase.” *Analytical Biochemistry* 419: 33-39 (2011)
40. Inagaki, H., et al Kubo, T.* (5/5) “Functional characterization of Kunitz-type protease inhibitor Pr-mulgins identified from New Guinean *Pseudechis australis*.” *Toxicon* accepted for publication (2011)

(2) その他の著作物(総説、書籍など)

【2008 年度】

(石川G)

1. 隔膜型環境制御試料室システム: 福嶋 球琳男、石川 晃 顕微鏡、Vol.43、No.1, 9-14 (2008)
- (佐々木G)
2. Y. C. Sasaki, Dynamical Observations of Soft Nanomaterials Using X-rays or High-energy Probes, pp69-107, Chapter 2, *Soft Nanomaterials* (978-1-58883-040-1) edited by H. S. Nalwa (2009)
3. 佐川琢麻、東隆親、佐々木裕次、: X線1分子追跡法による生体分子間相互作用の定量測定、*生物物理*、48(1), 46-51 (2008).
4. 佐々木裕次 : の精度ピコメートルX線 固体物理 分子計測1線Vol 43 117-129 (2008)
5. 佐川琢麻、東隆親、佐々木裕次、 : 抗原抗体間相互作用の X線 1分子計測と熱測定 *日本熱測定学会学会誌 Vol 35(2)*, 98-104 (2008)
6. 佐々木裕次 : X線1分子追跡法考案ビフォーアフター *SPring-8 利用者情報 3月号* (2008)

【2009 年度】

(八木G)

7. 八木直人 「高分子における先端的放射光利用研究」 *高分子* 58(10), 729-732 (2009)
8. Matsuo, T. and N. Yagi. Structural changes in the muscle thin filament during contraction caused by single and double electrical pulses. *SPring-8 Research Frontiers* 2008, 46-47 (2009)
- (久保G)
9. 久保 泰: 分子進化から学ぶ標的認識ペプチドの創製法、*産総研 TODAY*、2009-04: 1-2 (2009)

【2011 年度】

(八木G)

10. N. Yagi. “Mechanism Of Latency Relaxation In Frog Skeletal Muscle.” *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 105, 180-186, 2011. (doi:10.1016/j.pbiomolbio.2010.10.002)
11. 佐々木裕次: 「X線による1分子追跡」 *現代化学* 2011年11月号
12. Y. C. Sasaki, Picometer-scale dynamic X-ray Imaging, Chapter 1, **Fundamentals of Picoscience** (978-1466505094) edited by Klaus D. Sattler in press (2012)

(3) 国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 13 件、国際会議 22 件)

1. Y. C. Sasaki, (JASRI/SPring-8)(*Invited Talk*) Diffracted X-ray Tracking (DXT) for Dynamical Individual Biomolecular Observations, X-ray Physics, **Gordon Research Conferences**, New London, NH, USA. August 5-10, (2007)
2. Y. C. Sasaki, (JASRI/SPring-8) (*Lecture*) Dynamical Observations of Individual Membrane Proteins with X-rays, The Daresbury Synchrotron Radiation Source (SRS), UK, Dec. 10 (2007)

3. Y. C. Sasaki, (JASRI/SPring-8) (*Lecture*) Dynamical Single Molecular Observations with X-rays, Institut für Angewandte Physik – Universität Tübingen, Germany. Dec. 14 (2007)
4. 佐々木裕次 (JASRI/SPring-8) : 機能性膜タンパク質分子の1分子内運動計測 (岡山大学理学部生物学科セミナー 2007. 7. 10)
5. 佐々木裕次 (JASRI/SPring-8) : 電子線1分子追跡法開発の生物物理学的意義 (NHM(New Horizon of Microscopy)研究会セミナー、日本大学文理学部 2008. 3. 28)
6. 石川晃 (日本大学) : 隔膜型雰囲気試料室の開発
日本顕微鏡学会関西支部特別企画講演会: 電子顕微鏡機能イメージング法の展開
「生物科学・材料科学におけるイメージングの統合化」 岡崎コンファレンスセンター 2008.12.20
7. Kanagawa, O. (RIKEN) Imaging and other new technologies at RIKEN. Invited lecture at Institute Gulbenkian de Ciencia, Lisbon, Portugal. October 2007.
8. Kanagawa, O. (RIKEN) Imaging and other new technologies at RIKEN. Invited lecture at Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan. Jan 2008.
9. Kanagawa, O. (RIKEN) Imaging and other new technologies at RIKEN. Invited lecture at Kyoto University medical school, Kyoto, Japan. Jan 2008.
10. Kanagawa, O. (RIKEN) T cell mediated autoimmunity. Invited lecture at TWMU (International Research and Educational Institute for Integrated Medical Sciences: IREIIMS) Tokyo, Japan. Dec 2007.
11. 佐々木裕次 (JASRI/SPring-8) : 機能性蛋白質分子内部の動的1分子計測
信州大学繊維学部(機能性高分子材料研究会)セミナー 2008.4.25
12. Y. C. Sasaki (JASRI/SPring-8): Dynamical Single Molecular Observations of Functional Membrane Proteins, Pacific Rim International Conference on Protein, Australia. (June. 22-26, 2008)
13. Y. C. Sasaki (JASRI/SPring-8): Dynamical Observations of Individual Single Functional Membrane Proteins, Frontiers of Biological Microscopy, Okazaki, Japan. (Nov. 9-12, 2008)
14. Y. C. Sasaki (University of Tokyo): Dynamical Single Molecular Observations of Functional Membrane Proteins using High-energy Probes, New Approaches to Complexity of Protein Dynamics by Single Molecule Measurements : Experiments and Theories, Osaka, JAPAN (Dec. 7-9, 2008)
15. Y. C. Sasaki (JASRI/SPring-8), Dynamical Single Molecular Observations of Functional Membrane Proteins, Three-Way Meeting – APS, ESRF, SPring8 Workshop Argonne National Laboratory, Argonne, USA (March 17-19, 2008).
16. Y. C. Sasaki (JASRI/SPring-8), Dynamical Single Molecular Observations of Functional Membrane Proteins, Pacific Rim International Conference on Protein Australia (June. 22-26, 2008).
17. Y. C. Sasaki (JASRI/SPring-8), Dynamical Observations of Individual Single Functional Membrane Proteins, Frontiers of Biological Microscopy Okazaki, Japan (Nov. 9-12, 2008).
18. Y. C. Sasaki (University of Tokyo), Diffracted X-ray Tracking (DXT) for super accurate dynamic observations of single molecular motions, TMS (The Minerals, Metals & Materials Society) 2009, UAS (Feb. 15-20, 2009).
19. N. Yagi (JASRI) and T. Matsuo. Ca-induced structural changes of regulatory proteins in skeletal muscles. XXXVI International Conference of Physiological Sciences. Kyoto, 2009/7/27-8/1
20. Kubo, T. (AIST), Ono, S., Naimuddin, M., Kimura, T., Nemoto, N., Baptista, G.,-R., Yamane, T., “In vitro evolution of peptide neurotoxins directed to receptor ligands”, Australian Peptide Conference 2009, Queensland, Australia, 2009/10/15
21. 佐々木裕次 (JASRI/SPring-8) : 電子線1分子追跡法開発の生物物理学的意義 (NHM(New Horizon of Microscopy)研究会セミナー、日本大学文理学部 2008.3.28)
22. 佐々木裕次 (JASRI/SPring-8) : 機能性蛋白質分子内部の動的1分子計測

- (信州大学繊維学部(機能性高分子材料研究会)セミナー 2008.4.25)
23. 佐々木裕次(JASRI/SPring-8): 先端1分子計測と次世代放射光の役割
(ERLサイエンスワークショップ, KEK, 2008.7.10)
 24. 石川 晃(日本大学)、隔膜型雰囲気試料室の開発、日本顕微鏡学会関西支部特別企画講演会、岡崎 生理研、2007年12月26日
 25. 久保 泰(産業技術総合研究所)、バイオマーカー探索と臨床診断・検査・創薬への利用、情報機構、東京、2008/11/14
 26. 佐々木裕次(東京大学): 第48回日本生物物理学会年会「Bridging Single Molecule Biophysics and System Biology: New Experimental and Theoretical Challenges」シンポジウム講演“Internal Molecular Motions in Single Membrane Proteins seen from X-rays and Electrons”
東北大学 2009.9.20-22
 27. 佐々木裕次(東京大学): 「高エネルギープローブを用いた分子内一分子運動計測」
第10回日本蛋白質科学会 札幌コンベンションセンター 2010.6.16-18
 28. 関口博史(東京大学): 「X線1分子追跡法から見えてきた膜たんぱく質分子内運動」
第30回表面科学学術講演会 大阪大学コンベンションセンター 2010.11.4-6
 29. 一柳光平(東京大学): 「時間分解X線回折を用いたナノ構造体の光応答観測」第24回日本放射光学会年会・企画公演『次世代放射光に向けた装置開発と利用研究～放射光実験用検出器と超高速現象の研究～』つくば国際会議場 2011.1.7-10
 30. T. Matsuo and N.Yagi(JASRI). The effect of the change of the intracellular Ca²⁺ concentration and myosin crossbridges on the behavior of troponin during skeletal muscle contraction studied by x-ray fiber diffraction and Ca²⁺-indicator. 10th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation and 6th International Conference on Medical Applications of Synchrotron Radiation. Melbourne, Australia. 2010/02/15-18
 31. N.Yagi. Biomedical Applications of Small-Angle X-ray Scattering at SPring-8. 5th Asia-Oceania Forum for Synchrotron Radiation Research. Pohang, Korea, 2010/07/08
 32. N. Yagi. Application of Small-Angle Scattering on Dynamics of Biological and Material Samples at SPring-8. The 7th SAXS Interest Group Meeting: Structural Evolution/Dynamics. Hsinchu, Taiwan, 2010/10/20
 33. N.Yagi. Time resolved biological SAXS at SPring-8. EMBO Practical Course on Solution Scattering from Biological Macromolecules. Hamburg, Germany, 2010/10/31
 34. N.Yagi. Beamline and Detector for XPCS Experiments. Workshop: Small-angle Scattering and X-ray Photon Correlation Spectroscopy in Soft Matter Research. Hsinchu, Taiwan, 2011/10/20
 35. K.Ichihana, N.Kawai, S.Nozaawa, T.Sato, S.Adachi, K.G.Nakamura, Y.C.Sasaki, “Time-resolved single-shot X-ray scattering measurement of shocked amorphous materials”, Thermec 2011, Quebec, Canada, Aug 2011.

② 口頭発表 (国内会議 12 件、国際会議 16 件)

1. 石川 晃、佐々木裕次、柳原利成、鈴木清一: SEM用の極薄隔膜 wet cellの開発、日本顕微鏡学会63回学術講演会 2007.5.22.
2. Y. C. Sasaki (JASRI/SPring-8), Dynamical single Molecular Observations of Functional Membrane Proteins using Diffracted X-ray Tracking (DXT), 9th International Conference on X-ray Microscopy (XRM 2008), Zurich, Switzerland, July 21-25.
3. Y. C. Sasaki (JASRI/SPring-8), Dynamical Individual Biomolecular Observations using Diffracted X-ray Tracking (DXT), Single Molecule Approaches to Biology, Gordon Research Conferences, August 17-22, (2008) New London, NH, USA.
4. 金川 修身(理化学研究所)、自己免疫の基礎並びに臨床研究をめぐる最新の動向、第四回自己免疫疾患研究会、東京、2008年7月12日

5. 小川 直樹(理化学研究所)、Molecular un-stability of peptide / MHC complex and Activation of T cell、2008 日本免疫学会総会、京都、2008 年 12 月 1 日
6. Y. C. Sasaki (JASRI/SPring-8), Dynamical single Molecular Observations of Functional Membrane Proteins using Diffracted X-ray Tracking (DXT), 9th International Conference on X-ray Microscopy (XRM 2008), Switzerland, July 21-25, Zurich.
7. Y. C. Sasaki (JASRI/SPring-8), Dynamical Individual Biomolecular Observations using Diffracted X-ray Tracking (DXT), Single Molecule Approaches to Biology, Gordon Research Conferences, New London, NH, USA. August 17-22, (2008)
8. Y. C. Sasaki (University of Tokyo), Single Molecular Observations through Single Labelled Nanocrystal Using X-rays and Electrons, Hybrid Materials Conference 2009, Tours, France. 5-19 March 2009
9. Y. C. Sasaki (University of Tokyo), A. Ohsaki (Nihon University), A. Ishikawa(Nihon University), New Single Molecular Detection System from Three-Dimensional Tracking of Single Nanocrystals using Scanning Electron Microscope, The 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society 2009, Boston USA.2009.2.28-3.4
10. T. Matsuo and N. Yagi (JASRI). Structural changes of myofilaments in live frog skeletal muscle caused by double pulse stimulation. European Muscle Congress, Oxford UK, 2008/9/13-15.
11. T. Matsuo and N. Yagi (JASRI). Structural changes of myofilaments in live frog skeletal muscle caused by double pulse stimulation. XXI Congress of the International Union of Crystallography Congress and General Assembly, Osaka, 2008/8/23-31.
12. 石川 晃(日本大学)、佐々木裕次(Spring8)、柳原利成(日本電子)、鈴木清一(TSL)、SEM 用の極薄隔膜 wet cell の開発、日本顕微鏡学会 63 回学術講演会、新潟、2007 年 5 月 22 日
13. 石川 晃(日本大学)、大崎暁弘(日本大学)、広畑泰久(日本大学)、佐々木裕次(Spring8)、Wet Cell SEM による水中の金ナノ結晶方位の EBSD 計測、日本顕微鏡学会 65 回学術講演会、仙台、2009 年 5 月 26-29 日
14. 小川直樹(理研)、Molecular un-stability of peptide / MHC complex and Activation of T cell 第 36 回日本免疫学会総会、大阪、2006.12.11
15. 小川直樹(理研)、Molecular un-stability of peptide / MHC complex and Activation of T cell、第 38 回日本免疫学会総会、京都、2008.12.2
16. OGAWA Naoki, TAKASE Mitsuyo, KOZONO Haruo, SASAKI Yuji C., KANAGAWA Osami (理研・RCAI、東京理大・生命研、SPring-8/JASRI) Analyses of T cell clones that have distinct recognitions for antigen-MHC class II complexes: 第36回 日本免疫学会総会 大阪国際会議場 平成18年12月11日～13日
17. KOZONO Haruo, OGAWA Naoki, SAGAWA Takuma, Azuma Takachika, KANAGAWA Osami, SASAKI Yuji (東京理大・生命研、理研・RCAI、SPring-8/JASRI) Molecular fluctuation drives peptide exchange of MHC II: 第36回 日本免疫学会総会 大阪国際会議場平成18年 12月11日～13日
18. Ogawa N., Takase M., Kozono H., Sasaki Y.C., Kanagawa O. (理研・RCAI、東京理大・生命研、SPring-8/JASRI) Molecular un-stability of peptide/MHC complex and activation of T cell. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、国立京都国際会館、平成 20 年 12 月 1 日～3 日
19. 関口博史(東京大学)、中川あゆみ、守谷和騎、養王田正文、佐々木裕次(東京大学)、 「ATP-induced Dynamic Motion of Group II Chaperonin Detected by Diffracted X-ray Tracking」 第 48 回日本生物物理学会年会 東北大学 2010.9.21
20. 一柳光平(東京大学)、関口博史(東京大学)、野澤俊介、佐藤篤志、足立伸一、佐々木裕次 (東京大学) 「金ナノ結晶のコヒーレント振動の直接観測」 第 30 回表面科学学術講演会 大阪大学 2010.11.4
21. 関口博史(東京大学)「X線1分子追跡法から見えてきた膜たんぱく質分子内運動」 11/4 第 30 回表面科学学術講演会 大阪大学 2010.11.4.

22. 石川晃(日本大学)、大崎暁弘(日本大学)、広畑泰久(日本大学)、佐々木裕次(東京大学)、Wet Cell SEM による水中の金ナノ結晶方位の EBSP 計測、日本顕微鏡学会 66 回学術講演会、名古屋、2010 年 5 月 23-26 日
23. Yuji C. SASAKI (University of Tokyo), "High-speed Observations of Intramolecular Brownian Motions on Functional Proteins using X-rays and Electrons" Biological Diffusion and Brownian Dynamics Brainstorm2. Heidelberg, Germany 2010.10.12
24. Kouhei Ichianagi (University of Tokyo), "Observation of laser excited self-Assembled gold nanocrystals by picoseconds time-resolved X-ray diffraction " The 6th International Workshop on Nano-scale Spectroscopy and Nanotechnology 神戸大学 10/29
25. K. Ichianagi(University of Tokyo), H. Sekiguchi (University of Tokyo), S. Nozawa, T. Sato, S. Adachi, and Y.C. Sasaki (University of Tokyo), "Lattice dynamics of laser excited self-assembly gold nanocrystals by time resolved X-ray diffraction", APS march meeting, Dallas, March 21-25, 2011.
26. T. Matsuo and N. Yagi. The effect of the change of the intracellular Ca²⁺ concentration and myosin crossbridges on the behavior of troponin during skeletal muscle contraction studied by x-ray fiber diffraction and Ca²⁺-indicator. 10th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation and 6th International Conference on Medical Applications of Synchrotron Radiation. Melbourne, Australia. 2010/02/15-18
27. T. Matsuo, H. Iwamoto and N. Yagi. Time-resolved measurements of troponin behaviors and intracellular Ca²⁺ concentrations during twitch contraction of frog skeletal muscle. 日本生物物理学会第 49 回年会、姫路、2011 年 9 月 18 日
28. Y. Yamada, T. Matsuo, H. Iwamoto and N. Yagi. Ca²⁺-induced conformational changes of calmodulin studied with a submillisecond time-resolved small-angle X-ray scattering. 日本生物物理学会第 49 回年会、姫路、2011 年 9 月 18 日

③ ポスター発表 (国内会議 42 件、国際会議 43 件)

1. Y. C. Sasaki (University of Tokyo), DYNAMICAL MOLECULAR INTERNAL OBSERVATIONS OF INDIVIDUAL MEMBRANE PROTEINS WITH X-RAYS, VII European Symposium of the Protein Society, Stockholm, Sweden, May12-16(2007).
2. Y. C. Sasaki (University of Tokyo), Observations of X-ray Radiation Pressure Force on Individual Gold Nanocrystals, X-ray Physics, Gordon Research Conferences, New London, NH, USA, August 5-10, (2007).
3. Y. C. Sasaki (University of Tokyo), High-Accuracy Dynamical Single Molecular Observations in Softmatter using X-rays, International Soft Matter Conference 2007, Aachen, Germany, October 1-4, (2007).
4. 日比野 浩、垣見重雄、石川 晃(日本大学)、湯本 昌:分析電子顕微鏡によるラット肝臓のアルミニウムの証明 新潟市朱鷺メッセ(新潟コンベンションセンター)日本顕微鏡学会 63 回学術講演会 2007.5.22
5. 小園晴生(東京理科大学):MHCII ペプチド交換反応におけるダイナミックな動きの検出 第 30 回分子生物学会年会、第 80 回生化学会大会 パシフィコ横浜、12 月 11 日~15 日
6. 小園晴生(東京理科大学):pH induced dynamics enables the peptide exchange of MHCII molecules、第 45 回生物物理学会年会、パシフィコ横浜、12 月 21 日~23 日
7. 石川 晃(日本大学)、大崎 暁弘(日本大学)、佐々木裕次(SPRING-8)SEM による金ナノ結晶 EBSP の動的計測法 日本顕微鏡学会 64 回学術講演会 2008 年 5 月 21 日
8. 小園晴生(東京理科大学)、蔣冬、東隆親、高親和性 TCR の作製、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会 神戸ポートアイランド、2008 年 12 月 9 日~12 日

9. Ogawa N., Takase M., Kozono H., Sasaki Y., Kanagawa O. (RIKEN) Molecular un-stability of peptide/MHC complex and activation of T cell. 第 38 日本免疫学会総会・学術集会 国立京都国際会館、2008 年 12 月 1 日～3 日
10. Y. C. Sasaki (JASRI/SPring-8), T.Sagawa, Quantifications of Simplified X-ray Radiation Pressure Force on Individual Gold Nanocrystal, The 52st Annual Meeting of the Biophysical Society (2008), Long Beach USA. 2008/2/2-6
11. Y. C. Sasaki, K. Ichiyangi (University of Tokyo), Atomic and Molecular Motions from High-speed X-ray Diffracted Tracking, X-ray Science, Gordon Research Conferences, (2009) New London, NH, USA. August 2-7,2009
12. K. Ichiyangi, Y. C. Sasaki (University of Tokyo), Laser-heating lattice dynamics of Gold nanocrystals, The 10th International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation(SRI09) , Australia, 27 Sept-2 Oct.
13. 小川直樹(理研)、Molecular un-stability of peptide / MHC complex and Activation of T cell, Biophysical Society 53rd Annual Meeting, Boston, 2009.3.4
14. 石川 晃(日本大学)、大崎暁弘(日本大学)、佐々木裕次(Spring8)、SEM による金ナノ結晶 EBSP の動的計測法、日本顕微鏡学会 63 回学術講演会、京都、2008 年 5 月 21 日
15. 小園晴生、小川直樹、佐川琢麻、東隆親、佐々木裕次、金川修身 (東京理大・生命研、理研・RCAI、SPring-8/JASRI) MHCII ペプチド交換反応におけるダイナミックな動きの検出、第 30 回分子生物学会年会、第 80 回生化学会大会、パシフィコ横浜、平成 19 年 12 月 11 日～15 日
16. 小園晴生、小川直樹、佐川琢麻、東隆親、佐々木裕次、金川修身 (東京理大・生命研、理研・RCAI、SPring-8/JASRI) pH induced dynamics enables the peptide exchange of MHCII molecules、第 45 回生物物理学会年会、パシフィコ横浜、平成 19 年 12 月 21 日～23 日
17. 小園晴生、蔣冬、東隆親 (東京理大・生命研) 高親和性 TCR の作製、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会、神戸ポートアイランド、平成 20 年 12 月 9 日～12 日
18. T. Matsuo and N. Yagi (JASRI). Measurements of structural changes of troponin molecules caused by crossbridge formation in live frog muscle during contraction. 日本生物物理学会第 46 回年会、福岡、2008.12.3-12/5
19. N. Yagi and T. Matsuo (JASRI). Ca-induced structural changes of regulatory proteins in skeletal muscles. XXXVI International Conference of Physiological Sciences. Kyoto, 2009/7/27-8/1
20. T. Matsuo and N. Yagi (JASRI). Simultaneous measurements of the troponin structural change and the intracellular Ca²⁺ concentration during skeletal muscle activation. 日本生物物理学会第 47 回年会、徳島、2009.10.30-11/1
21. 一柳光平(東京大学)「時間分解 X 線回折を用いたナノ構造体の光応答観測」 第 24 回日本放射光学会年会 つくば 2011.1.10
22. 鈴木祥仁(東京大学)、関口博史(東京大学)、中川あゆみ、守谷和騎、養王田正文、佐々木裕次(東京大学)「10P166 X 線 1 分子追跡法を用いた AChBP の分子内運動計測」 第 24 回日本放射光学会年会 つくば 2011.1.10
23. 関口博史(東京大学)、中川あゆみ、守谷和騎、養王田正文、佐々木裕次(東京大学)「10P168 X 線 1 分子追跡法による II 型シャペロニンのねじれ運動観察」1/10 第 24 回日本放射光学会年会 つくば 2011.1.10
24. 関口博史(東京大学)、中川あゆみ、守谷和騎、養王田正文、佐々木裕次(東京大学)、 「ATP-induced Dynamic Motion of Group II Chaperonin Detected by Diffracted X-ray Tracking」 9/20 第 48 回日本生物物理学会 東北大学 2010.9.20
25. H.Sekiguchi (University of Tokyo), “Internal Dynamics Investigations of Individual Single Membrane Proteins Using X-rays and AFM”, 6/27-7/2 Gordon Research Conferences, Single

- Molecule Approaches to Biology, Gordon Research Conferences, Single Molecule Approaches to Biology (June 27–July 2, 2010, Il Ciocco Hotel and Resort, Italy)
26. H. Sekiguchi (University of Tokyo), A. Nakagawa, K. Moriya, M. Yohda, and Y. C. Sasaki, “Twisting Motion of Protein Investigated by Diffracted X-ray Tracking”, The 6th International Workshop on Nano-scale Spectroscopy and Nanotechnology (October 25–29, 2010, Kobe University Centennial Hall, Japan)
 27. Yasuhiro SUZUKI, H. Sekiguchi, and Y. C. Sasaki (University of Tokyo) “LIGAND-INDUCED INTERNAL MOLECULAR DYNAMICS OF NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR ANALYZED BY DIFFRACTED X-RAY TRACKING” 3/5 Biophysical Society 55th Annual Meeting, Baltimore, USA, 2011.3.5
 28. H. Sekiguchi (University of Tokyo), A. Nakagawa, K. Moriya, M. Yohda, and Y. C. Sasaki (University of Tokyo), “DIRECT OBSERVATION OF TORSIONAL MOTION OF GROUP II CHAPERONIN”, 55th Annual Meeting of Biophysical Society (March 5–9, 2011, Baltimore Convention Center, Maryland, USA) 2011.3.5
 29. Yuji C. Sasaki (University of Tokyo), Yasuhiro Suzuki, Hiroshi Sekiguchi, Noboru Ohta, Tatsuhito Mastuo, Naoto Yagi “OBSERVATIONS OF X-RAY RADIATION PRESSURE FORCE USING HIGH-SPEED DIFFRACTED X-RAY TRACKING” 3/5 Biophysical Society 55th Annual Meeting, Baltimore, USA, 2011.3.5
 30. Akira Ishikawa (Nihon University), Yasuhiro Hirohata (Nihon University), Yuji C. Sasaki (University of Tokyo), Dynamical Observation of Motion of Gold Nano-Crystal in Water using Diffracted Electron Tracking (DET) with Use of Wet Cell SEM, Proceedings of 17th International Microscopy Congress, Rio de Janeiro, Brazil, 2010.10.13
 31. Haruo Kozono (Tokyo University of Science), Naoki Ogawa (Nihon University), Osami Kanagawa (University of Tokyo), Yuji Sasaki (University of Tokyo). PEPTIDE EXCHANGE OF MHC II WITH INCREASED FLEXIBILITY AT ACIDIC PH 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan August 22–27, 2010
 32. T. Matsuo and N. Yagi. Simultaneous measurements of the troponin structural change and the intracellular Ca²⁺ concentration during skeletal muscle activation. 日本生物物理学会第47回年会、徳島、2009.10.30–11/1
 33. 八木直人、松尾龍人、佐々木裕次、上杉健太郎、星野真人、世良俊博 CMOSカメラを用いた高速X線実験 第23回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、姫路、2010年1月6日～9日
 34. 松尾龍人、八木直人 高速CMOSカメラを用いたバンチ観察 第24回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム つくば国際会議場 2011/1/7–10
 35. 八木直人 ラット大脳の部位による脂質成分の違い 第24回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム つくば国際会議場 2011/1/7–10
 36. SEM用の極薄隔膜 wet cellの開発、石川 晃、佐々木裕次、柳原利成、鈴木清一 日本顕微鏡学会 63回学術講演会 2007年5月22日／新潟
 37. SEMによる金ナノ結晶 EBSPの動的計測法、石川 晃、大崎 暁弘、佐々木裕次 日本顕微鏡学会 64回学術講演会 2008年5月21日／京都
 38. Wet Cell SEMによる水中の金ナノ結晶方位のEBSP計測、石川 晃、大崎 暁弘、広畑 泰久、佐々木裕次、日本顕微鏡学会 65回学術講演会 2009年5月29日／仙台
 39. Wet Cell SEMによる水中の金ナノ結晶方位のEBSP計測、石川 晃、大崎 暁弘、広畑 泰久、佐々木裕次、日本顕微鏡学会 66回学術講演会 2010年5月25日／名古屋
 40. Wet Cell SEMによる水中の金ナノ結晶粒子のブラウン運動の計測、石川 晃、小川直樹、広畑泰久、佐々木裕次、日本顕微鏡学会 67回学術講演会 2011年5月18日／博多
 41. Haruo Kozono, Naoki Ogawa, Osami Kanagawa, Yuji Sasaki. PH INDUCED DYNAMICSENABLES THE PEPTIDE EXCHANGE OF MHCII MOLECULES Biophysical Society 54th Annual Meeting San Francisco, CA February 20–24, 2010

42. Naoki Ogawa, Haruo Kozono, Yuji C. Sasaki, Osami Kanagawa. EFFECT OF MOLECULAR SWAY ON THE RECOGNITION OF PEPTIDE/MHC COMPLEX BY T CELLS Biophysical Society 54th Annual Meeting San Francisco, CA February 20-24, 2010
43. Kozono H., Ogawa N., Kanagawa O., Sasaki Y. Peptide exchange of MHC II with increased flexibility at acidic pH. 14th International Congress of Immunology August 22-27, 2010 Kobe, Japan
44. Haruo Kozono, Naoki Ogawa, Yuko Kozono, Noboru Ohta, Hiroshi Sekiguchi, Osami Kanagawa, Yuji C. Sasaki, Brownian motions of peptide/MHC complex define the activation of T cells, 8th European Biophysics Congress, Budapest, Hungary, 23-27 August 2011
45. Haruo Kozono, Naoki Ogawa, Kentaroh Hoshisashi, Hiroshi Sekiguchi, Yuko Kozono, Osami Kanagawa, Yuji Sasaki, Dynamic motion of Peptide in MHC groove is crucial for recognition and activation of certain T cells. Biophysical Society 56th Annual Meeting San Diego, CA February 25-29, 2012
46. 小園晴生, 小川直樹, 佐川琢麻, 東隆親, 佐々木裕次, 金川修身 (東京理大・生命研、理研・RCAI, SPring-8/JASRI) pH induced dynamics enables the peptide exchange of MHCII molecules、第 45 回生物物理学会年会、パンフイコ横浜、2007 年 12 月 21 日～23 日
47. Kozono H., Azuma T., Sasaki Y., Kanagawa O. Observation of structural fluctuation of MHC protein upon peptide exchange. 第 30 回日本分子生物学会年会 横浜、2007 年 12 月 11 日
48. Ogawa N., Kozono H., Sasaki Y., Kanagawa O. Molecular un-stability of peptide/MHC complex and activation of T cell. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、国立京都国際会館、2008 年 12 月 1 日～3 日
49. 小園晴生, 蔣冬, 東隆親 (東京理大・生命研) 高親和性 TCR の作製、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会、神戸ポートアイランド、2008 年 12 月 9 日～12 日
50. 小園晴生, 星指健太郎, 小園裕子, 小川直樹, 関口博史, 佐々木裕次, 金川修身. T 細胞活性化におけるペプチド/MHC の動的挙動解析. 第 11 回日本蛋白質科学会年回、ホテル阪急エキスポパーク、2011 年 6 月 7 日～9 日
51. Functional expression and characterization of ACh-binding protein from the CNS of *Aplysia kurodai*, 小林 寿珠子 (AIST)、野口 悠紀 (AIST)、福田 枝里子 (AIST)、Bong-Kiun Kaang (Seoul National University)、久保 泰 (AIST), CREST「生命現象」平成 21 年度中間報告会・終了報告会、大阪、2009/11/23
52. Molecular dynamic analysis of the interaction between ACh-binding protein and nicotinic ligands, Cai Weiyan (AIST)、小林 寿珠子 (AIST)、下山 佳子 (AIST)、佐々木 裕次 (東京大学、CREST)、久保 泰 (AIST), CREST「生命現象」平成 21 年度中間報告会・終了報告会、大阪、2009/11/23
53. Single molecular dynamics of the interaction between ACh-binding protein and nicotinic ligands, Cai Weiyan (AIST)、小林 寿珠子 (AIST)、下山 佳子 (AIST)、佐々木裕次 (東京大学、CREST)、久保 泰 (AIST), さきがけ・CREST 研究報告会、東京、2010/01/13
54. Ligand-induced single molecular dynamics of acetylcholine-binding protein: Analysis by diffracted X-ray tracking method, 久保 泰 (AIST)、小林 寿珠子 (AIST)、関口 博史 (東京大学、CREST)、Cai Weiyan, 下山 佳子 (AIST)、佐々木 裕次 (東京大学、CREST), Biophysical Society 54th Annual Meeting, サンフランシスコ、2010/02/24
55. パパアピグミーマルガスネック由来新規生理活性ペプチド p-mulgin 1, 2, 3 の同定, 稲垣 英利 (AIST)、山内 瑤子 (AIST)、鳥羽通久 (日本蛇族学術研究所)、久保 泰 (AIST), 日本農芸化学会 2010 年度大会、東京、2010/03/28
56. 無細胞翻訳系合成タンパク質の迅速な精製技術とそのタンパク質間相互作用解析への応用, 福島 貴之 (埼玉大学)、小林 寿珠子 (AIST)、鈴木 美穂 (埼玉大学)、西垣 功一 (埼玉大学)、久保 泰 (AIST)、根本直人 (埼玉大学), 第 10 回日本蛋白質科学会年会、札幌、2010/06/16

57. 受容体サブタイプ特異的な活性調節因子探索を目的としたセロトニン結合タンパク質の作製, 福田 枝里子(AIST)、金原 悠紀(AIST)、久保 泰(AIST), BIA Symposium 2010, 品川、2010/07/16
58. Novel Bioactive Peptides, SKTX 1, SKTX 2, and SKTX 3, from a Species of the Japanese Ant Genus *Strumigenys*, 稲垣 英利(AIST)、増子 恵一(専修大学)、久保 泰(AIST), 第53回 日本蟻類研究会, 館山、2010/08/29
59. Coupling of cell-free transcription/translation and in vitro evolution to convert three-finger neurotoxins to interleukin-6 receptor ligands, Naimuddin Mohammed(AIST)、小林 寿珠子(AIST)、根本直人(埼玉大学)、町田 雅之(AIST)、Gandhi Radis Baptista(Federal University of Ceara)、久保 泰(AIST), PIM 国際シンポジウム 2010, Matsuyama、2010/09/28
60. Identification and Functional Characterization of Kunitz Type Toxins from New Guinean *Pseudechis australis*, 稲垣 英利(AIST)、木本 光(AIST)、上野 悟(AIST)、山内 瑠子(AIST)、鳥羽 通久(日本蛇族研究所)、久保 泰(AIST), 5th International Peptide Symposium, 京都、2010/12/05
61. 膜タンパク質を認識するペプチドを創製する技術(PERISS 法)の開発, 木村 忠史(AIST)、小野 世吾(AIST)、久保 泰(AIST)、亀山 仁彦(AIST), TX つくばテクノロジーショーケース, つくば、2010/12/24
62. X線1分子追跡法を用いたAChBPの分子内運動計測, 鈴木 祥仁(東京大学、CREST)、関口 博史(東京大学、CREST)、小林 寿珠子(AIST)、Cai Weiyang(AIST)、下山 佳子(AIST)、久保 泰(AIST)、佐々木 裕次(東京大学、CREST), 第24回日本放射光学会年会, つくば、2011/01/10
63. Ligand-induced Internal Molecular Dynamics of nicotinic Acetylcholine Receptor: Analyzed by Diffracted X-ray Tracking, 鈴木 祥仁(東京大学、CREST)、関口 博史(東京大学、CREST)、小林 寿珠子(AIST)、Cai Weiyang(AIST)、下山 佳子(AIST)、久保 泰(AIST)、佐々木 裕次(東京大学、CREST), 第55回米国生物物理学会年会, Baltimore、2011/03/07
64. 分子膜タンパク質系AChBPの極微小回転運動計測, 鈴木 祥仁(東京大学、CREST)、関口 博史(東京大学、CREST)、星 指健太郎(東大、CREST)、小林 寿珠子(AIST)、Cai Weiyang(AIST)、下山 佳子(AIST)、久保 泰(AIST)、佐々木 裕次(東京大学、CREST), 第11回日本蛋白質科学会年会, 大阪、2011/06/07
65. 分子膜タンパク質 nAChR の極微小回転運動計測, 鈴木 祥仁(東京大学、CREST)、関口 博史(東京大学、CREST)、星 指健太郎(東大、CREST)、小林 寿珠子(AIST)、Cai Weiyang(AIST)、下山 佳子(AIST)、宮澤 淳夫(兵庫県立大学、CREST)、西野 有里(兵庫県立大学)、久保 泰(AIST)、佐々木 裕次(東京大学、CREST), 第49回生物物理学会年会, 姫路、2011/09/18
66. In vitro evolution of peptide neurotoxins directed to receptor ligands (2): Application of a newly developed PERISS method to generate m2 receptor ligands from a random peptide library with a ICK motif, Kubo, T. (AIST, CREST), One, S., Kimura, T., Kobayashi, S., Kondo, T., Fukuda, E., Haga, T., Kameyama, K., 9th Australian Peptide Conference, Hamilton Is., 2011/10/17
67. High-speed 2-Dimensional Observation of Stepwise Motions in Single nAChR and AChBP using Diffracted X-ray Tracking (DXT), Suzuki, Y. (東京大学、CREST), Sekiguchi, H., Hoshisashi, K., Kobayashi, S., Cai, W., Shimoyama, Y., Nishino, Y., Yagi, N., Ohta, N., Miyazawa, A., Kubo, T., Sasaki, Y. C., 56th Annual Meeting of Biophysical Society, San Diego, 2012/02/25
68. Development of the PERISS method to generate GPCR ligands/binders from a random peptide library with a spider neurotoxin scaffold, Kubo, T. (AIST, CREST), Ono, S., Kimura, T., Kobayashi, S., Kondo, T., Fukuda, E., Haga, T., Kameyama, K., 56th Annual Meeting of Biophysical Society, San Diego, 2012/02/25
69. Yuji C. Sasaki (University of Tokyo). IX European Symposium of The Protein Society, Stockholm, Sweden. 2011.5.22-26
70. 鈴木 祥仁(東京大学) 「1 分子膜タンパク質系 AChBP の極微小回転運動計測」 日本蛋白質科学会年会 ホテル阪急エキスポパーク、大阪府 2011.6.7-9

71. 星指健太郎(東京大学)「超微細1分子内ブラウン運動とMHC分子安定性の相関」日本蛋白質科学会年会 ホテル阪急エキスポパーク、大阪府 2011.6.7-9
72. 関口博史(東京大学)「X線1分子追跡法によるグループII型シャペロニンのねじれ運動解析」日本蛋白質科学会年会 ホテル阪急エキスポパーク、大阪府 2011.6.7-9
73. 張幸源(東京大学)「生体超分子不斉合成反応における錯体内1分子運動計測」日本蛋白質科学会年会 ホテル阪急エキスポパーク、大阪府 2011.6.7-9
74. Hiroshi SEKIGUCHI (University of Tokyo). Torsional Motion Analysis of Group II Chaperonin at Single Molecular Level Using Diffracted X-ray Tracking. 25th Annual Symposium of Protein Society. Boston, U.S.A. 2011.7.23-27
75. Kentaro HOSHISASHI (University of Tokyo). Angstrom-sized Internal Brownian Motions Determine MHC Molecular Stability. 25th Annual Symposium of Protein Society. Boston, U.S.A. 2011.7.23-27
76. 張幸源(東京大学)「生体超分子不斉光化学反応における錯体内1分子運動計測」第28回PFシンポジウム、つくば、2011.7.12
77. 星指健太郎(東京大学)「X線放射圧によるナノ結晶の動的挙動変化」第28回PFシンポジウム、つくば、2011.7.12
78. 鈴木祥仁(東京大学)「機能性タンパク質AChBPの一分子回転運動」第28回PFシンポジウム、つくば、2011.7.12
79. K.Ichivanagi, 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, Aug 2011, Quebec, Canada.
80. Hiroshi SEKIGUCHI (University of Tokyo). "Torsional Motion Analysis of Group II Chaperonin Using Diffracted X-ray Tracking". 8th European Biophysics Congress, Budapest, 2011.8.23-27
81. 星指健太郎(東京大学)「X線放射圧による溶液中ナノ結晶の動的挙動計測」2011年秋季第72回応用物理学会学術講演会、山形大学 2011.8.29
82. Hiroshi SEKIGUCHI (University of Tokyo) "High-precision Torsional Motion Analysis of Group II Chaperonin using Diffracted X-ray Tracking" 第49回生物物理学会年会、兵庫県立大、2011.9.16
83. Yasuhito SUZUKI (University of Tokyo) "Single molecular rotational motion of membrane protein nAChR" 第49回生物物理学会年会、兵庫県立大、2011.9.16
84. 養王田正文, 中川あゆみ, 守谷和騎, 岡俊彦, 関口博史, 佐々木裕次, 真壁幸樹, 桑島邦博「超好熱性古細菌 Thermococcus strain KS-1 由来グループII型シャペロニンの反応機構」第63回日本生物工学会大会、東京農工大学、2011.9.27
85. Masafumi Yohda, Ayumi Nakagawa, Kazuki Moriya, Toshihiko Oka, Hiroshi Sekiguchi, Yuji C. Sasaki, Koki Makabe, and Kunihiro Kuwajima "ATP dependent conformational change and protein folding mechanism of group II chaperonin" The 11th KIAS Conference on Protein Structure and Function, Seoul, Korea. 2011.10.6

(4)受賞・報道等

①受賞

第21回日本IBM科学賞(物理部門)受賞(平成19年)

受賞テーマ:X線1分子追跡法の考案とその融合領域への応用

§ 7 結び

最終的な技術的な達成度には十分満足しているが、このように CREST 研究期間ギリギリになるまで完成しないとは思っていなかった。その原因は(1)高速カメラの組み合わせの設定に時間がかかった(2)ナノ結晶の作製が一時期完全に再現しなくなった(NaCl 基板の結晶性劣化?) (3)DETにおいて自作ナノ結晶が隔膜カーボン膜と全く相性が悪く、DET用のナノ結晶作製の条件を見つけることができなかつた、の3点が主な原因である。予想外の成果も得ることができた。X線の放射圧に合力的な発生が根本的に共存していること、AChBP 系の運動は予想をはるかに超えた面白い運動であったこと、DETで市販コロイドが実践的に使えることを証明できたこと、である。これらはすべて若い方が活躍した。放射圧はM1の星指君、AChBPはM2の鈴木君が異常なまでの粘り腰で今までのデータ及びデータ表記の限界を意識し提案して改良し発見に至った。また、5年前は数か月に1日程度のマシンタイムであったが、SP-8でのDXTの信頼度や期待度が増して、今は月に1週間というも珍しくない。そんな大量のデータ処理をそつなく可能にしたのが佐々木Gの関口さんで日々の努力に頭が下がる。素晴らしい。また、DETの市販コロイド利用の「大発見」は、助教の小川さん単独でなされた。もう私自身、DETは諦めようかと思っていた時の「大発見」と言える。これでDETはよりフレンドリーな測定法になり得た。DXTも見習いたいもので、その真似で色々な市販コロイドを試しているが朗報は今のところ全くない。以上の成果からも佐々木チームでの若手研究者は非常に活躍した。心から感謝したい。若手研究者への環境は日々厳しくなっているが、今後も研究を続けていけるようにしっかり応援するつもりである。研究遂行での反省点としては、私が中心で最終的に本研究はDXTかDETを測るので、チーム全体として集まる必要はないと考えていたが、私以外の研究者間の協力体制は薄かったかもしれない。そういう意味で金川Gから石川Gに移動した小川さんの存在は大きかった。良い交流ができたと思う。不幸中の幸いである。AChBPにしてもMHCにしてもDETにしてもかなり難しかったが、ここまで来れたのは幸運だったのかもしれない。活躍してくれた若手研究者の研究環境の今後の確保とDXT・DETのコンソーシアム化に向けた戦略的活動(これは科学的というだけでは無理かもしれない)に力を注ぎ、次世代DXTなる方法論の考案に最後の知恵を発揮できたらと思う。