

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 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

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

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)

主たる共同研究者

八木 直人 ((財)高輝度光科学研究センター利用研究促進部門 副部門長)

石川 晃 (日本大学文理学部物理学科 教授)

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)(~平成 23 年 3 月)

小園 晴生 (東京理科大学生命科学研究所 准教授)

久保 泰 ((独)産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門 首席評価役)(平成 20 年 4 月~)

3. 研究実施概要

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、Å 以下の精度で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。本研究では考案したX線1分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking: DXT)を現状のミリ秒からマイクロ秒レベルまで高速化する。電子線1分子追跡法(Diffracted Electron Tracking: DET)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計測を行なった。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、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た。

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。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。次に非常にダイナミックな分子運動が予想されている Group II chaperonins の ATP 結合に伴う分子内構造変化においては、これまでのモデル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。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。市販金

コロイドの利用が可能になったことは汎用化の道を拓くものである。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

本研究は、世界的に見てユニークなタンパク質の内部構造変化の計測方法の開発とそれによるいくつかのタンパク質系の測定となっている。X線を使ったDXTでは、10 μ secの時間分解能まで改良し高速高精度で分子内運動の計測を可能にした。その結果、nAChR、AChBPの開閉運動に伴う構造変化を計測して分子内運動の可視化に成功するなど顕著な成果を得た。また、TCR/peptide/MHC系でpeptide/MHC相互作用や分子内運動と機能性が比較され、免疫システムに興味ある結果が得られた。一方、走査型電子顕微鏡で電子線を使って新しい計測法が可能になったこと、市販の金コロイドが使えるようになったことで、これまでの大型放射光装置による計測から研究室で汎用的に使える手法へ新しい展望が開かれた。この独創的な手法を実際の計測まで可能にしてきたことは大いに評価される。

本研究期間中の研究に関して研究代表者自身の原著論文はまだない。その評価に関してはアドバイザーの間で意見が2分した。真に独創的な仕事は手間隙かかり、論文を書く暇もなかなか作れない上、有力誌がそう簡単に新計測法による新しい解釈を受け入れるはずはない。研究と論文発表の間にタイムラグもある。この研究の意味、オリジナリティーは十分理解できる、という意見と、やはり発表が出なければ成果は顧みられないし、インパクトも出ない、展開も望めない、という意見があった。

また、知財出願がなかった。知財出願がないことに関して、特に汎用化を目指す電子顕微鏡を使うDETに関しては出願の努力をしておくことが望まれるとの意見が多くあった。今後実用化、製品化の可能性も考えて特許取得が必要かと思われる。

チームは、研究代表者の独創性を推進力にして押し進められた。代表者はそれをリーダーシップにして、ここまでもってきているのだと思う。1分子計測技術の開発、分子間相互作用(Tcell、B-cell)計測、およびシナプス膜タンパク質分子計測と3つの分野で戦略的に研究が進められ、成果を出すことができた

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

1分子計測技術の成果は優れており、特に高速化と共にデータの質が増して様々に議論の可能性が広がったことは印象的である。海外に類似の研究がなくオリジナルな研究であることは高く評価される。電子後方散乱回折像(EBSP)の取得に成功し、また市販金コロイドの使用可能性、タンパク質を使っての計測を確認できたことは大きな成果である。潜在的な科学的技術的インパクトは高いと言える。成果が発表されることで、そのインパクトを現実のものとしてほしい。

将来的に放射光を使う計測では、時間分解能を更に上げて速いダイナミクスが見えてくるだろうか、電子顕微鏡を使う計測では3次元動画計測が確認でき、汎用的装置が実現できれば、多くの研究者が使用することにより、広い展開が期待される。

1分子計測による構造変化の知見が神経情報伝達機構や免疫機構の理解を深めることに大きく貢献することを期待する。特にリガンド依存性のアロステリックな受容体複合体結合体の構造変化は昔からの重要なテーマあり、インパクトは高い。しっかり取り組むことにより展開が望まれる。

非常に独創的な研究ではあるが、現状では基礎研究の域を出ていない。戦略目標に照らして、この研究が重要であるかまだ見えてきていない。この手法でしか見えてこない分子内運動があり、それが実際に見えてくることは興味深い。それが生命現象の理解のために貢献するものであってほしい。生物的に顕著な結論が得られるような計測になるためにはまだ何らかのブレイクスルーが必要であり、次につながるための絵を描くことが必要だろう。

in vivo システムに近づけるべく努力が必要と思われる。生命現象の解明のために膜にはまった状態と異なる状態で計測しているので、生体中とは違うという問題が依然として疑問として残っている。*in vivo* で直接計測することはできないのか。

4-3. 総合的評価

本研究では全く新しい独自の発想のもとに世界のどこにもない計測法の開発が進められ、タンパク質1分子内の様々な形体の運動を区別して高速度・高精度計測することが可能になったことは高く評価される。さらにX線を使った大型装置のみならず、電子線を使ったラボレベルの装置の開発も可能性が広がり汎用化への道が拓かれた。免疫システムや膜系タンパク質に対し興味ある結果が得られているが、この手法が生命現象の解明に重要な計測となるかどうかは、今後更なる研究によって試されることになる。現在蓄積されている結果を確実なものにすると同時に、その生物学的意味を明確にして、世界に発信することが必要とされている。技術的にもまだ改良の余地が残されているようであり、このような独創的な意欲的な研究が着実に進行できる研究環境が整えられるよう希望している。