

X線1分子計測による細胞膜動的機能解析

X線で原子の1/100の運動が見えた！

佐々木 裕次

([財]SPring-8/高輝度光科学研究センター、[兼]大阪大学蛋白質研究所)

1. 研究のねらい

X線を用いて生体1分子内の実時間運動計測に成功した。X線1分子計測は、金属ナノ結晶を分子の目的部位に1個修飾し、その分子の局所的な運動を、ナノ結晶からの回折斑点を追跡することで実現した。本法によって、原子サイズの1/100の精度で、タンパク質分子内の運動を実時間計測することが可能となった。また、本法は細胞内でも、1分子機能発現に伴う分子内運動の可視化が可能であり、生命科学全領域で使用される新規計測手段へと発展するであろう。

2. 研究結果及び自己評価

これからのタンパク質科学では、タンパク質分子の静的な構造情報だけではなく、動的な構造情報がより重要になる。動的情報を正確に計測するには原理的に1分子計測以外ない。しかし、現状の可視光による方法では、タンパク質分子の移動や分子間相互作用は計測できるが、機能発現に伴う分子内構造変化の計測は難しい。つまり、分子内部位の位置決定精度や時間分解能が不足している。そこで、私は現状の可視域光を使用する1分子法ではなく、それよりも2桁以上短い波長であるX線を使う1分子計測を提案し、実際~pm(1/1000nm)レベルの精度で位置決定能力があることを、DNA分子やミオシン分子の実験を通して確認した。多くの研究者は、“X線を用いて1分子を検出できるのか？”という疑問を持つ。それは、物質と電磁波との断面積の大きさは、波長に比例するという常識からの当然の疑問である。無論、X線の発光、吸収、散乱現象を用いて1分子を検出することは、大型(第3世代)放射光施設を用いても不可能である。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線回折を利用する時間分割型回折X線追跡法(Diffracted X-ray Tracking: DXT)を考案した(図1)。原理は、まず直径数nm程度の極微ナノ結晶を、タンパク質分子にその機能を損なわないように標識する。そして、極微ナノ結晶からのラウエ斑点を指標に、着目したタンパク質分子の動きを時間分割(~ms)追跡する。実験は大型放射光施設SPring-8(BL-44B2)にて行った。検出器はX線イメージンシファイヤーを使用し、数ミリ秒の積算時間で1秒間(ビデオレート)の連続計測を行った。

筋肉の主成分であるミオシン分子によるATP加水分解に関する構造変化計測結果について説明する。石英基板上に、取りはずし可能な化学法で固定化したミオシン分子(図1)に、直径20nmの金極微ナノ結晶をラベルし、溶液内にATP分子、ADP分子、及び核酸非存在下の各条件下でnmレベル以下の1分子内運動の実時間計測を行った。1分子全体が(1粒子として)溶媒中をブラウン運動しながら拡散して行く現象は数多く確認されている。

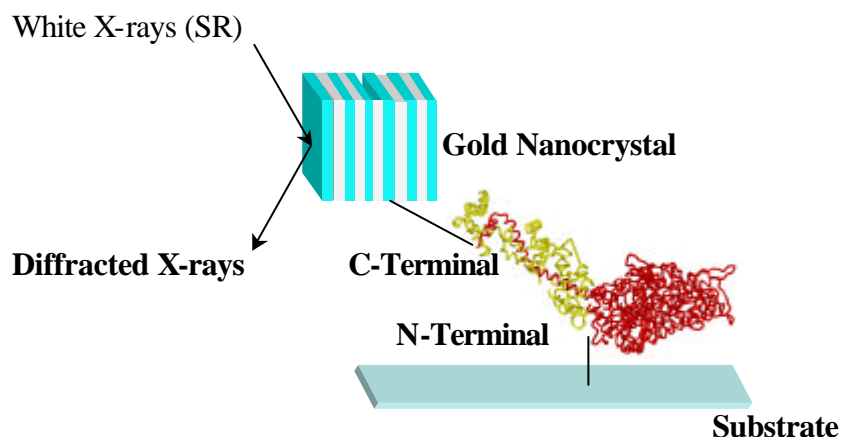


図1 DXTの原理

しかし、分子内の任意に選択できる特定の部位、この場合は筋肉力発生メカニズム解明の中心的存在であるレバーアーム部位において、各溶液条件下での1分子内運動の計測に成功した例はない。具体的には、ミオシン分子のレバーアーム部位は核酸非存在下、及びMg-ADP分子存在下では、全く自由な拘束されないブラウン運動をしていた。また、Mg-ATP存在下では、回折X線斑点は1秒間に5～6回、100-150 mradの領域内で反復振動していた。これは、明らかに核酸非存在下の際に確認されたブラウン運動に帰属された斑点運動とは異なっており、解析結果から、推定拘束面積1.1 nm²程度の空間内に拘束されたブラウン運動であることが確認された。

これは生化学で常識的な“Mg-ATPはATP加水分解の阻止剤として働く”という現象を、1分子の分子内動的情報と合致させた非常に重要な計測結果であると考えている。また、本計測法でpm精度の能力を持っていることを証明するために、サンプルにDNA分子を用いた実験を行った。結果的には、基板に吸着されたDNA分子は自由なブラウン運動をしていることが確認され、計測限界も4.5 pmという数字を得た。

人間のDNA塩基配列が決定し、そのゲノムが設計しているタンパク質分子の機能発現メカニズムを正確に理解するためには、最終的には機能を具現化している細胞内で、どのように運動しているのかを実時間計測する必要がある。そのためにも、一刻も早く細胞内実時間1分子計測の完成を目指し、X線1分子計測を発展させていかなければならない。

自己評価

X線1分子計測法という新しい概念を持った計測手法を世に問うことが出来て非常に幸運であった。3年間の研究計画であげた内容は、5割程度しか完成しなかったが、この研究の“勢い”がJST/CREST採択へと結びついたと思う。また、この研究期間に異分野の研究を自分の研究に取り込む“コツ”のようなものを取得できたのは、さきがけ研究の同じ領域のアクティブな研究者達に囲まれたおかげである。

3. 領域総括の見解

様々な生体分子間の反応や干渉は、究極的には分子間の親和性の変化で説明される。その実体としてDNA上の特異的認識配列、またタンパク質の機能ドメインとして表現されている。これを超えた機構については物理学の世界であり、分子生物学では答えられない。本研究者の意図するところは、この問題についてのブレークスルーであり、具体的にはタンパク質の1分子計測を課題としている。幸いにもSPring-8の優れた装備に恵まれて成果を挙げることができた。しかし、その大きな部分は当人の素質と意欲によるものである。

4. 主な論文

1. Sasaki, Y. C., Suzuki, Y., Yagi, N., Adachi, S., Ishibashi, M., Suda, H., Toyota, K., and Yanagihara, M. and Yagi, N. (2000). Tracking of individual nanocrystals using diffracted X rays. Phys. Rev. E. 62, 3843-3847.
2. Sasaki, Y. C., Okumura, Y., Adachi, S., Suzuki, Y., and Yagi, N. (2001). Diffracted X-ray tracking: new system for single molecular detection with X-rays. Nucl. Instrum. Methods A, in press.
3. Sasaki, Y. C., Okumura, Y., Adachi, S., and Yagi, N. (2001). Picometer-scale dynamical X-ray imaging of single DNA molecules. Phys. Rev. Lett., 87, 248102-248105.