

SPring-8 NEWS

104

2021.6

研究成果トピックス

タンパク質は体の中でどのように動いて機能を発揮しているのか
SPring-8を用いて1分子の高速運動を明らかにする



SPring-8 NEWS アドレス

<http://www.spring8.or.jp/ja/sp8news>

登録施設利用促進機関

公益財団法人 高輝度光科学研究センター (JASRI)

SPring-8


タンパク質は体の中でどのように動いて機能を発揮しているのか SPring-8を用いて1分子の高速運動を明らかにする

生命活動を支えるタンパク質の動きをSPring-8でとらえる

人間の体は生命を維持するために、多様な機能をもっています。外の環境に反応して複雑な動きを実行したり、食物を消化してエネルギーに変えたり、体験を記憶したり、体の中に入ってきた病原体と戦ったりと、バラエティに富んだ活動が体の中で行われているのです。これらの複雑な機能を担っているのは、多種多様な無数のタンパク質です。タンパク質は生命活動の維持に欠かせない「精密部品」です。人間社会がさまざまな職業の人たちで成立しているように、人間の体も、さまざまなタンパク質が適切な位置で、適切に動くことで、生命活動が成り立っているのです。

東京大学大学院新領域創成科学研究科の佐々木裕次さんは、1998年にSPring-8のビームラインを使って1つの分子の動きをリアルタイムで計測できる「X線1分子追跡法 (Diffracted X-ray Tracking: DXT)」を開発しました。以来、DXTを用いて、タンパク質の機能に関わる動きを次々と明らかにしてきました。1つの分子を観測する方法はこれまでもいくつか存在していましたが、その多くは蛍光ラベルなどを用いた可視光による計測です。可視光より波長が短くSPring-8の高輝度なX線を用いるDXTは、ナノスケールのサイズのものの動きを1秒の100万分の1である1マイクロ秒単位で計測できます。このように小さい分子の素早い動きを観測できると、ということがわかるのでしょうか。佐々木さんは次のように説明します。

「タンパク質というのは細胞の中でダイナミックに動き、構造も変化しています。そして構造が変化することで機能を発揮するのです。これまで、タンパク質の結晶構造の解析や、細胞内での分布の研究は行われてきましたが、タンパク質の機能に関わるマイクロ秒オーダーの動きを

正確に計測した研究は全くありませんでした。タンパク質が体の中でどのように働いているのか、それを正確に理解するためには動きを知ることが欠かせないのです」

タンパク質の機能が解明されると、生命の神秘がまたひとつ解き明かされます。また、多くの病気はタンパク質がうまく働かないことによって起こるため、働き方を解明できれば、新たな治療法や新薬の開発にもつながります。

金ナノ結晶でタンパク質をラベルする

では、どうやってX線でタンパク質の動きを見るのでしょうか。DXTには2つのポイントがあります。1つ目のポイントは、見たい分子を金ナノ結晶でラベルすることです。X線の波長は短いので原子と原子の間を通り抜けます。ただし、原子核の周りには小さい電子には当たって跳ね返ったり散乱したりします。佐々木さんが観測しようとしている溶液中のタンパク質は結晶化しない状態では電子密度が低いので、X線はすり抜けてしまいますが、電子密度が高い金の結晶でラベルしておけば、X線が電子に当たって進む方向を変える「回折」という現象を観察できます。

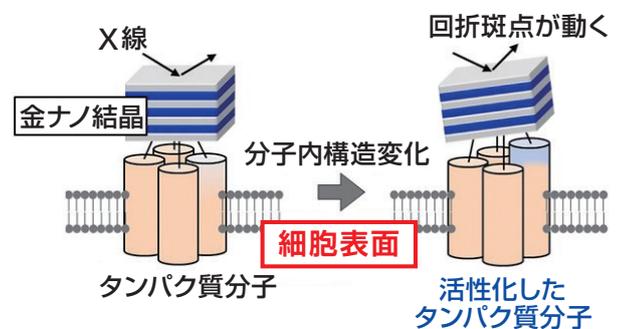


図1 DXTの仕組みの模式図。ラベルしたタンパク質の構造が変わると、金ナノ結晶の角度が変わり、X線の回折パターンが変化する。

DXTは、ナノサイズの金結晶を結合させたタンパク質が構造変化を“起こす前”から“起こした後”の回折パターンを比較することで、“どのように”タンパク質が動いたのかを知る方法なのです。

「タンパク質もナノサイズですから、同じくらい大きさの金ナノ結晶がラベルとしてくっついていて状態になりますが、ラベルのせいで動きが変わらないことは、金ナノ結晶のサイズを変えた定量的な実験で確認しています。もちろん、ラベルがない状態で観測できればいいのですが、その場合X線の強度を上げる必要が出てきて、そうするとタンパク質が壊れてしまいます」

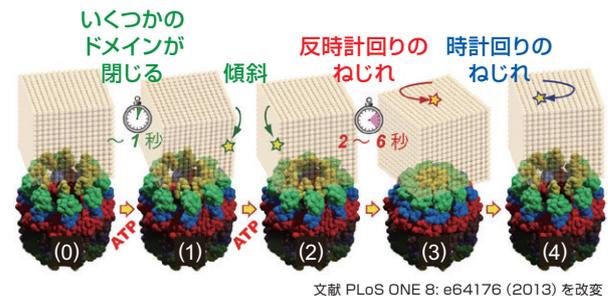
実験に用いる金ナノ結晶は、佐々木さんが自ら作製しています。塩化カリウムの単結晶基板に金粒子を付着させ、20-80 nm程度に成長させ、その後、基板から外し、金ナノ結晶同士が溶液中で凝集しないような表面処理を行います。できあがった金ナノ結晶は、アミノ酸のメチオニンもしくはシステインと結合しやすい性質を持っています。そのため、実験するタンパク質の観察したい部位にこれらのアミノ酸があればその場所をラベルできます。なければメチオニンやシステインなどのアミノ酸を人工的に挿入した組換えタンパク質を作って、ラベルします。実験手法は論文に公開していますが、ところどころ細かいコツが必要で、世界でもDXTのラベル用金ナノ結晶を作製できる人は、佐々木さんの他にはいないそうです。

エネルギー幅の広いX線で 動態をとらえる

DXTの2つ目のポイントは、SPring-8の高フラックスビームライン・BL40XUを用いることです。BL40XUは分光器を用いず、エネルギー幅の広い高輝度なX線を利用できるビームラインです。タンパク質へのダメージを最小限に抑え、高い精度で測定するためにはSPring-8の利用が欠かせません。

「実験室にある通常のX線装置だと、数百秒から分程度の遅い運動しか観測できません。

SPring-8の場合は、マイクロ秒単位の観測や、うまくやればナノ秒単位の観測も可能です。タンパク質の動きを観測するのに一番面白いのはマイクロ秒レベルの観測です。たとえば、細胞内でタンパク質の形を作る手伝いをするシャペロニンを観測したときは、最初に構造変化が起きたあとに全体をねじるようにしてふたを閉じるという複雑な動きがわかりました」



文献 PLoS ONE 8: e64176 (2013) を改変

図2 DXTで観測したシャペロニンの動き。ATPが結合するとふたの一部が閉まり始め、反時計回りに回転しながら閉じ、時計回りに回転して開く。

他にも佐々木さんは、細胞同士の情報伝達を担う「アセチルコリンレセプター」が信号を受け取ったときに構造を変える様子も突き止めました。また、タンパク質分子が異常に凝集する現象がどのように起こるのかも世界で初めて観察しました。タンパク質分子の異常凝集は、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経系疾患だけでなく、Ⅱ型糖尿病などの内分泌疾患など、さまざまな病気の原因になっていることがわかっています。この凝集プロセスを防ぐことができれば、新しい治療戦略となるでしょう。

佐々木さんのもとには他の研究者から共同研究の依頼が続々と来ます。自分の研究しているタンパク質が、細胞内でどう動いているのか、それを見ることができるDXT計測は、研究者にとって非常に魅力的な手法なのです。しかし、1つのタンパク質の動きを解析するのに「長いもので7年かかったこともある」と佐々木さんは話します。

「7年というのは私の中で最長記録です。解析するタンパク質の種類にもよりますし、共同研究者のこだわりでも変わってきます。実験は1つのタンパク質に対して100個ほどサンプルを用意して、6時間かけて測定します。3日間、SPring-8

にこもって、5-10種類くらいは測定します。その後、データ解析に1か月かかり、うまくいってなければやり直し。年に5回はSPring-8に通っています」

生きている生物や工学研究にも応用

現在、佐々木さんは、DXTをタンパク質の観測以外にも応用しています。たとえば、培養細胞や、線虫やクマムシなどの生物の体内物質の動きも生きたまま観測可能になりました。また工学系の材料研究にも応用が可能になっています。さらには、実験室レベルのX線装置で計測可能な「Diffracted X-ray Blinking: DXB」という手法も開発しました。SPring-8のビームラインBL40XUのX線は、エネルギー幅が広いため分子の動きを追いかける(=Tracking)ことがで

きますが、実験室レベルのX線装置は、エネルギー幅の狭い単色光のため、狭い隙間から覗き見ることしかできません。つまり、その狭い瞬き(=Blinking)の間の動きを観測する方法です。

「SPring-8の放射光の輝度は実験室の装置の10億倍ですから、それに比べると見えるものは限られています。ですが、動きの方向性と速度は知ることができるので、予備的な実験としては十分に役に立つと考えています。」

DXT誕生から24年。観測対象も観測方法も大きく広がりました。佐々木さんの研究活動の勢いは止まりません。現在は、新型コロナウイルスが細胞内に取り込まれる仕組みについても研究しているそうです。体の中で懸命に働いている小さなタンパク質の姿が見えてきたら、病気や生命に対するイメージも変わってくるかもしれません。

Column コラム

佐々木さんとSPring-8はどのようにして出会ったのでしょうか。

「SPring-8が建設された当初、私はSPring-8を利用する気はありませんでした。学生時代に所属していた研究室の教授が、放射光が大嫌いで、『あんなでかい装置を使わないとできない実験はサイエンスじゃない』なんて言っていたのです。若い頃の私は、研究室のX線や電子顕微鏡を使ってできる実験だけを行っていました」

ところが、大学院修了後に就職した日立製作所の基礎研究所で、高エネルギー加速器研究機構(KEK)放射光実験施設Photon Factoryを利用する機会があり、放射光の面白さに目覚めました。1997年にSPring-8の利用が開始されたときは、できたばかりということもあって、佐々木さんは様子をうかがっていました。しかし、佐々木さんの当時の上司は「どうせ実験するなら、『新車』の方がいいに決まってるじゃないか」とSPring-8の利用をさっそく開始したのです。

「私もその上司のあとを追いかけてSPring-8まで来ました」と笑って話す佐々木さんは、その後、高輝度光科学研究センター(JASRI, SPring-8)の研究員になりました。SPring-8を利用して多くの成果を出したのち、大阪大学蛋白質研究所の客員教授などを経て、2008年から現職についています。

今後の展望について尋ねると、佐々木さんは「文章を書くのが好きなので、科学の面白さを伝えることも是非やっていきたいですね」と答えてくれました。高校生に対して行う出前講義も楽しんでるという佐々木さんから、いったいどんな本が生まれるのか楽しみです。



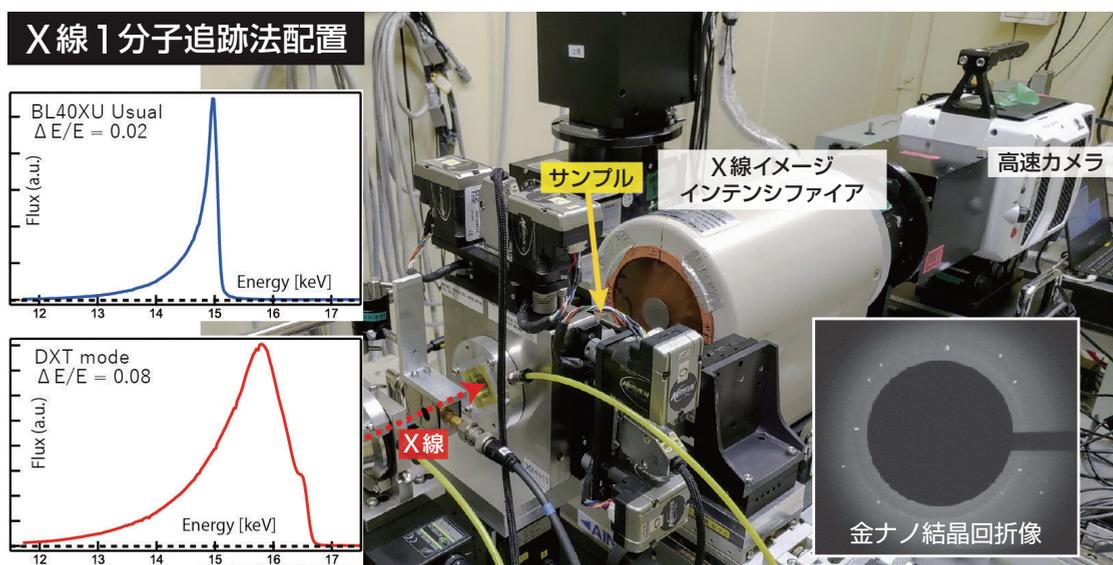
佐々木さんの研究室がある東京大学柏Ⅱキャンパスにて
(東京大学新領域創成科学研究科 基盤科学研究系物質系専攻 佐々木研究室HPより)
(<https://www.k.u-tokyo.ac.jp/materials/sasaki/index.html>)

文：チーム・パスカル 寒竹 泉美

利用者のみなさまへ

高フラックスビームラインBL40XUの紹介

高フラックスビームライン・BL40XUは、その名の通り、毎秒 10^{15} フォトン (X線エネルギー12 keVのとき) といった高輝度のX線が利用できるビームラインです。分光器を用いずにヘリカルアンジュレータの基本波を準単色光として利用することで高輝度ビーム利用を実現しています (図 青実線スペクトル エネルギー分解能 $\Delta E/E = 0.02$)。このようなビーム特性を活かして、主に高時間分解をキーワードとして多様な利用実験が行われています。BL40XUには2つの実験ハッチがあります。実験ハッチ1では、高時間分解の小角散乱実験やマイクロビーム回折・散乱実験などが、そして実験ハッチ2では、微小単結晶構造解析やシングルバンチを利用した高時間分解のX線吸収コントラストイメージングなどが行われています。今回の記事で取り上げられているX線1分子追跡法実験は、実験ハッチ1で行われています。X線1分子追跡法 (DXT) は ナノ結晶からの回折斑点の動きを1フレーム当たり0.1 msといった高時間分解能で測定するため、高輝度かつエネルギー幅が広いX線入射 (図 赤実線スペクトル $\Delta E/E = 0.08$) が必要となります (Jpn J. Appl. Phys. 58:120501, 2019)。BL40XUの特徴を最大限に活用した測定法といえるでしょう。



図：BL40XU・X線1分子追跡法配置。ナノ結晶からの回折点の動きを時間分解回折像から取得します。高速計測するために低残光型・X線イメージインテンシファイアと高速カメラを組み合わせた検出器を利用します。入射するX線エネルギー幅は用途によって使い分けて入射します ($\Delta E/E = 0.02, 0.08$)。

高フラックスビームを利用するには、サンプル損傷や検出器選択に注意しなければなりません。サンプル損傷対策としては、不必要なX線露光を防ぐためにサブミリ秒で開閉するガルバノ式X線シャッタを用いたり、回転シャッタ・タイミングとガルバノ式X線シャッタを同期させたマイクロ秒オーダーの露光時間制御などを行っています。検出器については、高フラックスが故に、現状では回折・散乱実験で広く利用される光子計数型・二次元半導体検出器がほとんど利用できません。低残光型のX線イメージインテンシファイアと可視光・高速カメラを整備し (図)、数マイクロ秒オーダーの時分割回折・散乱実験を実現しています (J. Alloys and Compounds 856:157968, 2021)。

BL40XUは、広角回折実験からカメラ長3.5 mまでの小角散乱実験など、多目的に利用されています。装置の持ち込みや試験的な測定は大歓迎です。BL担当者 (関口 sekiguchi@spring8.or.jp) にお問い合わせください。

第20回：東京大学大学院 新領域創成科学研究科 物質系専攻 佐々木 大輔さん

今回は東京大学大学院 新領域創成科学研究科 博士課程1年の佐々木さんです。佐々木さんは今回のNewsで紹介した佐々木先生の研究室の学生さんです。

また、2019年の“第19回SPring-8 夏の学校”にも参加されていました。

Q. 現在の大学での研究内容を教えてください。

A. 現在、新型コロナウイルス感染症の原因ウイルスであるSARS-CoV-2が、生物の細胞内に侵入する際のナノ領域における1粒子内部動態について「X線1分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking: DXT)」を用いて計測しています。

Q. 現在の研究室に入った経緯を教えてください。また、研究室は“どのような”雰囲気ですか。

A. 学部4年時に無機合成をしており、そこで合成したサンプルを現在の佐々木研究室の手法で計測しようと思い、この研究室を選択しました。研究室は、自分のやりたいことや意見を自由に言える雰囲気があります。自由闊達でノリよく笑いあいの、少人数ですが楽しい研究室です。

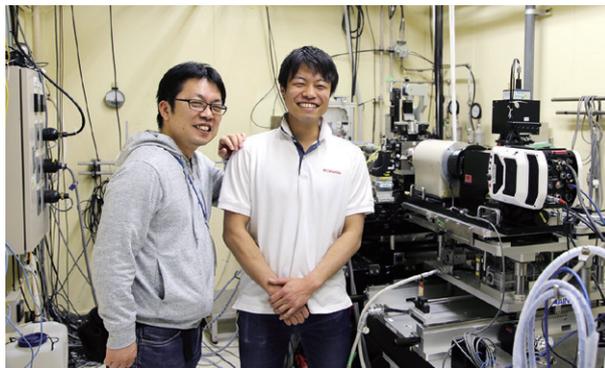
Q. なぜ理系の進路を選択し、博士課程まで行こうと決めたのですか。

A. 理系を選択した理由は、中学・高校時代から化学・物理学に興味があったからです。もともと論理的に物事を考える傾向があり、理系に進学することに迷いはありませんでした。その頃から、「他の人にはない特別な技能を身につけたい」という考えもありました。修士課程から博士課程への進学は、修士課程の前の学部3年の冬には自分の心に決めていました。その時には、「博士課程まで進学して、誰も知りえない独自の知識と技能を身につけよう」と思っていました。

Q. “SPring-8 夏の学校”に参加しようと思った“きっかけ”はなにですか。また、今後参加を検討している学生さんたちに“ひとこと”をお願いします。

A. 私は「SPring-8で測定する」計画があったので、施設を把握するためにも“SPring-8 夏の学校”に参加しました。実際に参加すると、分野を超えてSPring-8を使うであろう参加者たちと交流でき、自分でも新たな発見があったと思います。興味のある方は是非参加してみることをお勧めします。

料理が趣味と言う佐々木さん。最近はカレー作りにハマっており、スパイスなど色々揃えてカレーペーストから作っているとのこと。実は根底には「合成すること」があるのかもしれませんが、SPring-8の放射光が活用されている「X線1分子追跡法」。今後佐々木さんの手で、現在解析困難な現象を色々解明してもらいたいですね。



SPring-8 BL40XU内にて先輩（左：高輝度光科学研究センター 関口さん）と“はにかむ”佐々木さん（右）

行事予告

放射光を学びたいあなたに、第5回SPring-8秋の学校を開催します。

2021年9月5日(日)～8日(水)の日程で、第5回SPring-8 秋の学校が開催されます。秋の学校は、次世代の放射光科学に貢献する人材の発掘と育成を目的とし、SPring-8/SACLAのユーザー団体であるSPring-8 ユーザー協同体 (SPRUC) が主催となって企画されています。今回もコロナ禍の状況を踏まえた開催となります。“SPring-8 秋の学校”は“SPring-8 夏の学校”とは異なり、若い学部学生から、企業研究者などまで幅広く参加対象としており、かつ講義とグループ講習は、大学3年生が十分に理解できる水準に設定され、放射線作業従事者の登録がなくても参加できる形となっています。

興味のある方は「SPring-8 秋の学校」と検索してみてください。



第4回SPring-8秋の学校における集合写真



SPring-8 NEWS

No.104 June 2021
SPring-8 Document D 2021-007

編集 SPring-8 NEWS 編集委員会

発行 公益財団法人 高輝度光科学研究センター

Japan Synchrotron Radiation Research Institute

〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都1丁目1番1号

TEL (0791)58-2785 FAX (0791)58-2786

E-mail: jasri-event@spring8.or.jp <http://www.spring8.or.jp/>