

## 生命科学領域

### 1. 実時間タンパク質結晶構造解析法の研究

#### 1.1 研究組織

三浦 圭子 (JASRI)

統括および結晶構造解析

勝部 幸輝 (JASRI)

結晶構造解析およびソフトウェアシステム開発

河本 正秀 (JASRI)

結晶構造解析データ収集および構造解析

濱田 賢作 (島根大学、理研)

同上およびソフトウェアシステム開発

長谷川智一 (理学電機株)

結晶構造解析に関する外部協力者

倉光 成紀 (大阪大学、理研)

結晶解析用蛋白質サンプル供給

#### 1.2 研究開発の目的

実時間 X 線結晶構造解析法 (Real Time Protein Crystallography System, 略称 RTPC システム) として、蛋白質 X 線結晶構造解析で利用される各種のソフトウェアおよびハードウェアを有機的に結合させて構築する高速簡便構造解析のための統合システムを作成すること。

#### 1.3 活動状況 実時間解析ソフトウェア開発

(1) 勝部らにより数年間構築していた、Windows 版 RTPC ソフトウェアを完成し、BL38B1を始めとしてインストール整備を行った。同ソフトウェアの基幹となっている位相計算ソフトウェア Phases についての一般ユーザーへのソフトウェア使用制限を無くすことを念頭に、Dr. Furey とライセンス契約を取り交わし、共用ビームライン (BL38B1, BL40B2, BL41XU) でのユーザーへの公開整備が整った。位相決定法として Phases base の MIR, SIRAS が Window ベースに操作しやすい環境で構築された。

特に MAD 位相決定および電子密度表示もビームライン PC で出来ることも含めて、X 線回折データ測定中に収集データによる構造解析可能性評価が出来るように動作確認を行った。評価データ測定および構造解析実績として、勝部により提供された外部共同研究サンプルを用い Zn の MAD データの 4 波長分を用いた構造解析が成功した。

#### (2) 構造解析システム整備

BL38B1の MAD データ測定を念頭においた機器整備を行った。セイコー EG & D 社の MCA7700の導入、光学調整システムを含めたサーバーシステム導入により、

MAD データ測定時の自動連続測定が可能になった。ゴニオメーター改造で導入した駆動式 X-Y-Z 軸を用いたリモートセンタリングシステムも整備し、結晶マウントからデータ測定までの所要時間短縮となった。

(三浦圭子)

### 2. タンパク質機能の時間分解 X 線解析法の研究

#### 2.1 研究組織

足立 伸一 (理研)

光反応性タンパク質結晶の時間分解結晶回折測定

八木 直人 (JASRI)

筋収縮の分子機構に関する時間分解 X 線回折測定

岩本 裕之 (JASRI)

筋収縮の分子機構に関する時間分解 X 線回折測定

井上 勝晶 (JASRI)

BL40XU の整備, 高度化と利用

岡 俊彦 (JASRI)

光受容体タンパク質の 2 次元膜の時間分解回折測定

加藤 博章 (理研)

光反応性タンパク質結晶の時間分解結晶回折測定

#### 2.2 研究開発の目的

本研究課題は SPring-8 の高フラックスビームライン BL40XU を利用し、タンパク質結晶, タンパク質溶液, 2次元膜, 筋肉組織などの生体試料中でサブナノ秒以上の時間領域で生じる過渡現象を、時間分解 X 線回折法, X 線散乱法により計測する方法を開発することを目的としている。BL40XU はアンジュレータ 1 次光を分光することなく高フラックス準単色光として利用できる世界でも類を見ないビームラインであり、この特長を生かして生体試料を利用した時間分解測定法を展開することを目指している。

#### 2.3 活動状況

2001年度は、従来 BL40XU で保有している高速回転シャッターをさらに高度化し、RF クロックを分周した信号に対してフェーズロックできる回転シャッターの導入を行った。この高速回転フェーズロックシャッターは最高 949Hz (バンチクロックの 220 分周) で回転するシャッターであり、チタン合金製の三角形回転ディスク, 磁気ベアリング式モータ, フィードバック制御回路からなる。最高速 949Hz 回転時の 1 回転あたりのシャッター開時間は約 0.5 マイクロ秒、基準クロックに対するジッターは ± 5 ナノ秒以下である。このシャッターを使い、フィリングモード 2 / 21 fill + 18 single bunch (シングルバンチ間隔 228.1 nsec)

のビームタイムを利用して、1個のバンチからのX線パルス安定に取り出すことに成功した。したがって、今後シングルバンチの時間幅に相当するX線パルス(50-100psec)を用いたポンププローブ実験が可能になる。2002年度以降、この高速回転フェーズロックシャッターを利用した、ピコ秒～サブナノ秒領域での時間分解X線回折実験の整備を進める予定である。

(足立伸一)

### 3. 高分解能X線バイオ・イメージング法の研究

#### 3.1 研究組織

梅谷 啓二 (JASRI)

イメージング装置の開発

山崎 克人 (JASRI)

撮影画像の臨床医学的な評価

上杉健太郎 (JASRI)

X線画像検出器の開発

香村 芳樹 (理研)

X線顕微鏡の開発

今井 茂樹 (川崎医科大)

撮影画像の臨床医学的な評価

山下 武則 (川崎医科大)

動物実験

#### 3.2 研究開発の目的

10 $\mu$ m程度以下の生体組織構造のX線による画像化を目的として、静止および動態画像用の分解能5 $\mu$ m程度のX線バイオ・イメージング装置を開発し、悪性腫瘍が増殖のため自身の回りに形成する10～100 $\mu$ m径程度の新生血管を、X線で画像化する方法を確立する。また、撮像デバイスを光学顕微鏡と組み合わせ、分解能1 $\mu$ m程度での生体構造の画像化を目的とするための予備実験を行う。

#### 3.3 活動状況

##### (1) 分解能5 $\mu$ m程度の動態画像用撮影装置の開発

X線を直接に電荷信号へ変換して検出するX線直接変換型撮像管サチコンを使ったカメラで、既存のカメラの改造により撮影視野が9.5mm角で、2048 $\times$ 2048画素の撮影を可能にした。厚さ5 $\mu$ mの金膜にパターンを形成した空間分解能測定チャートを、20keVの単色X線で撮影した画像を図1に示す。写真の中の数字がパターン幅を示し、写真で黒い部分が金膜部分であり、2048 $\times$ 2048画素では6 $\mu$ mパターンまで画像化できた。評価に用いた分解能測定チャートは厚さ5 $\mu$ mであり薄く、X線吸収が少ないためチャート自体のコントラストが低いが、厚さ20 $\mu$ m程度のチャートが製作可能であれば5 $\mu$ mパターンまで画像化可能であろうと予測される。

##### (2) 腫瘍移植動物の動態画像観察

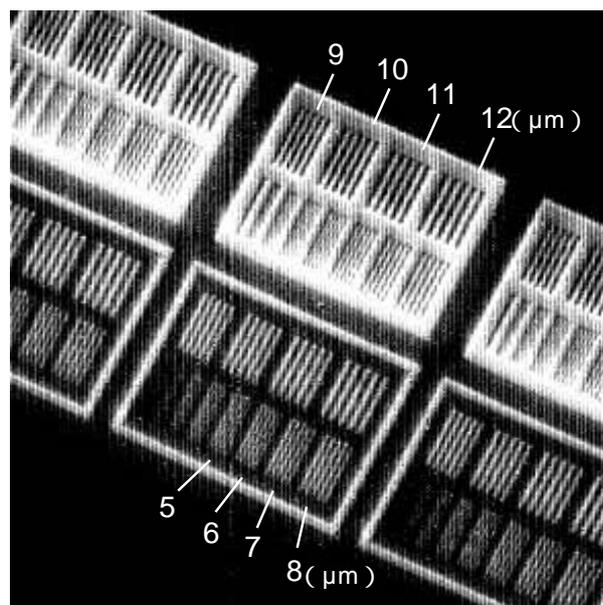


図1 厚さ5 $\mu$ m金膜製の解像度チャートの撮影画像

腫瘍は強い増殖力を維持するために、正常組織に比べ血液から多くの栄養や酸素の供給を必要とし、増殖に伴い自身の周りに新たな血管網(新生血管)を形成する。ウサギにはVX2と呼ばれる固有の悪性腫瘍があり、これを耳介に移植し増殖過程の観察や、抗癌剤の薬効評価を行った。増殖過程の観察において、移植後1～7日の撮影画像で、直径20～30 $\mu$ mの血管まで造影により画像化され微小な新生血管が描出された。また、腫瘍移植後3日のウサギで抗癌剤シスプラチンの薬効評価を行い、抗癌剤注入前、注入後30分経過、注入後60分経過した後で撮影を行った。抗癌剤注入後30分、60分と経過するに従い、新生血管が消失していく様子が観察できた。

##### (3) 光学顕微鏡利用技術の予備実験

早期の実用化を優先し、既存技術の改良で対応できるX線間接変換型検出器を選んだ。間接型はX線を蛍光板で可視光像に変換し、この可視光像を高感度撮像デバイスで検出する。平成12年度に開発した800万画素CCDを高倍率拡大光学系と組み合わせ、図1と同じ分解能チャートの撮影を画素サイズ1.35 $\mu$ mで行い、撮影画像で3 $\mu$ m幅のパターンまで画像化できた。このため、光学レンズの拡大率をさらに2～3倍増せば、分解能1 $\mu$ m程度が達成可能である。(梅谷啓二)

### 4. X線1分子計測のためのナノ結晶作製技術の開発

#### 4.1 研究組織

佐々木裕次 (JASRI) 実験総括

山崎 克人 (JASRI) タンパク質分子ラベル実験

岩本 裕之 (JASRI) タンパク質分子ラベル実験

奥村 泰章 (JASRI) ナノ結晶評価実験

足立 伸一 (理研) ナノ結晶評価実験

香村 芳樹（理研） ナノ結晶評価実験  
 岡 俊彦（JASRI） タンパク質分子ラベル実験

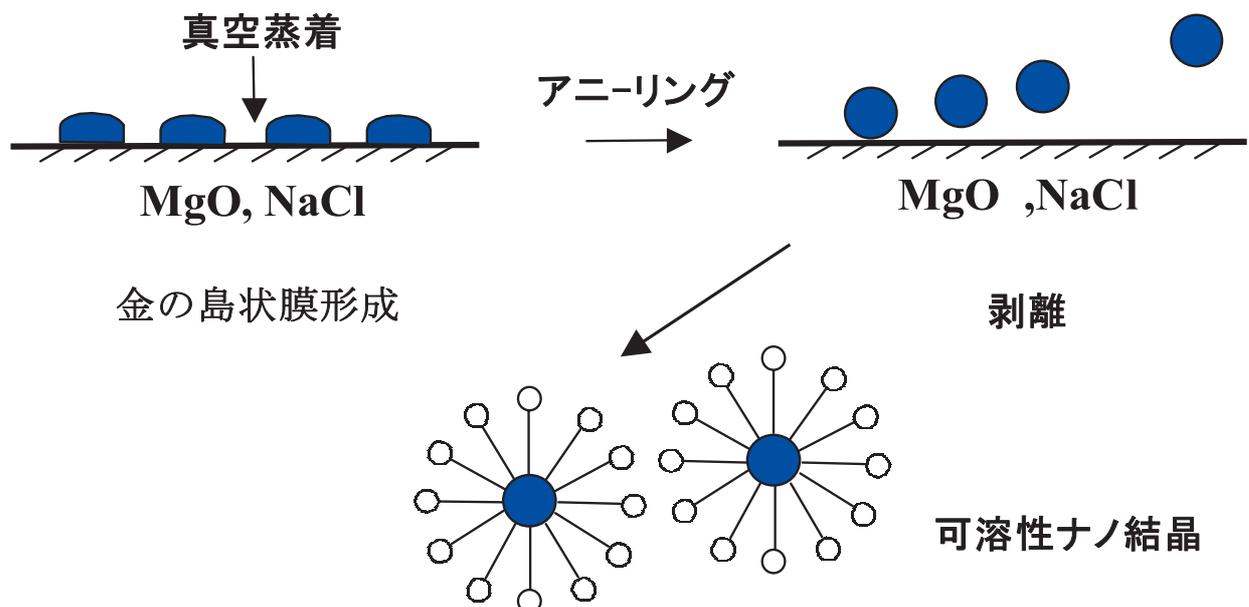
4.2 研究開発の目的

X線1分子計測法を高精度計測手段として完成させるため、本計測手段の主要技術であるナノ結晶の作製技術を確認することが本研究開発の目的である。X線1分子計測とは、私が考案した新規計測手段で、目的1分子にナノ結晶1つを標識し、そのラウエ斑点を時分割トレースする方法である。2年前に原理実験に成功し（Phys. Rev. E, 62 (2000) 3843）、その後DNA1分子のブラウン運動計測に成功し（Phys. Rev. Lett., 87(2002) 248102）、最近、筋肉の主成分ミオシン分子のレバーアームと呼ばれる部位が、ATP分子の有無で運動モードを全く変化させてしまうことを明らかにし、他の多くのATP分解系においても同様の運動モードがあることが明らかになった。これまでの実験でX線1分子計測の鍵は、目的タンパク質1分子にソフトに標識するナノ結晶の性質にあることが分かっている。本研究の具体的な目標としては、(1)直径15nmのナノ結晶の安定的作製法確立(2)ナノ結晶の水溶液中安定化(3)ナノ結晶の反応指向性の向上である。

4.3 活動状況

(1) 直径15nmのナノ結晶の安定的作製法確立に成功。

抵抗加熱法とスパッター蒸着法で、最小直径が15nmのナノ結晶作製実現。基板はNaCl、MgO、そしてマイカ。各基板のエピタキシャル成長を利用してAuナノ結晶を作製。アニーリングは、真空中とガス（アルゴン）雰囲気中に行っている。現在のところ、アルゴン雰囲気中で作製されたナノ結晶が非常に良質であることが判明。



参考図：金ナノ結晶の水溶液中安定化処理プロトコル

(2) ナノ結晶の水溶液中安定化に成功。

真空中で作製したナノ結晶を水溶液中で安定に取り扱うことは難しい。普通はナノ結晶の表面が疎水的な性質を持ってしまうので、水溶液中ですぐに凝集してしまう。ここでは膜蛋白質の可溶化に使用されている界面活性剤の使用を試みた。その結果、一部の界面活性化剤が有効にナノ結晶の安定的可溶化を実現した。

(3) ナノ結晶の反応指向性の向上。

ナノ結晶を上記各基板上でアニーリング（最適温度780-800）する際に、金原子の表面拡散現象を微妙にコントロールするために、クロムを同時蒸着することを試みている。クロムが共存することで金表面の他の物質への物理的吸着特性がやや弱くなり、また目的反応残基であるSH基への反応選択性を向上させている効果もあるらしい。（佐々木裕次）

利用研究促進部門

三浦 圭子・足立 伸一  
 梅谷 啓二・佐々木裕次