

「マイクロ秒 X 線 1 分子追跡法によるイオンチャネル・分子内協同性の可視化」

高輝度光科学研究センター 利用研究促進部門

関口 博史

1 研究の背景と目的

大腸菌遺伝子にコードされるタンパク質の 80%がダイマーやトリマーなどの多量体を形成し(Goodsell et al., Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2000)、また創薬ターゲットの大半を占める膜タンパク質もそのほとんどは多量体タンパク質である。これらの分子はサブユニット間の協動的な構造変化を通して機能すると考えられ、その分子機構を探るためには分子レベルでの機能に密接した動的な構造変化に関する情報が必須である。このような情報取得には、NMR や Cryo-EM といった手法が有力だが、NMR は 50kDa 以上といった分子量の大きい分子が不得意であること、また Cryo-EM では動的な挙動の直接観察は不可能である。今回、1 分子レベルでタンパク質分子内運動が取得可能な X 線 1 分子追跡法(図 1)に着目し、イオンチャネルの分子内運動を基盤とした協同性を、実時間スケールで取得するための手法開発を行う。

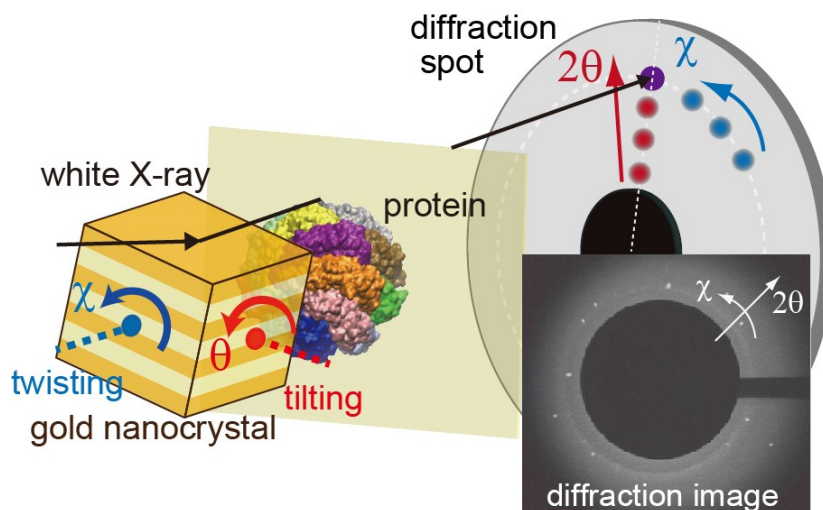


図 1：X 線 1 分子追跡法模式図。標的となるタンパク質分子に微結晶を標識し、標的分子の内部運動に連動した微結晶の動きを微結晶からの回折斑点の動きとして見積もる。

2 研究方法・研究内容

本研究課題の基盤となる計測技術は X 線 1 分子追跡法である。本手法は 1990 年代後半に SPring-8 にて開発された手法で(Y. S. Sasaki et al., Phys. Rev. E, 62:3843, 2000)、ナノ結晶を標的タンパク質分子に標識し、標的分子の運動をナノ結晶の結晶方位変化として検出し、図 1 に示すようなタンパク質のねじれ運動( $\chi$  方向)と傾斜運動( $\theta$  方向)の回転運動を評価する。今回、高速で動作すると見込まれるイオンチャネル・膜タンパク質をターゲットにダイナミクス計測を効率よく行うにあたって、入射光のマイクロビーム化を試みた。従来の X 線 1 分子追跡法のビーム径は  $150 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$  程度であるが、 $10 \mu\text{m}$  程度に微細化し、X 線の微細化はピンホールスリット 2 枚を適切に配置させて実現する。今回、上流側にビーム系を決めるピンホールとして  $50 \mu\text{m}$  直径、 $25 \mu\text{m}$  直径、 $10 \mu\text{m}$  直径 (ともにタンタル  $50 \mu\text{m}$  厚、レーザー穿孔)の 3 種類のピンホールを治める治具(3 連ピンホールホルダ)を製作し、任意にビーム径を変更可能にした。実験は大型放射光施設 SPring-8 の BL40XU にて行い、入射 X 線はエネルギー幅 14.0~16.5keV、15.2 keV にピークを持つ

ような設定にした。プローブとなる金ナノ結晶は KCl あるいは NaCl 単結晶基板上にエピタキシャル成長させて作製した(Thin Solid Films 471, 91-95, 2005)。50  $\mu\text{m}$  厚のポリイミドフィルムで構成する溶液セルを自作し、溶液セル内側に蒸着した金表面にイオンチャネル(アセチルコリン受容体: nAChR)を固定後、nAChR( $\alpha$  サブユニット)抗体を介して金ナノ結晶をラベル化し、作動薬(アセチルコリン、ACh)や拮抗薬( $\alpha$ -ブンガロトキシン, BTx)を実験溶液中に加えて、その影響を調べた。また、今回は金ナノ結晶作製にあたって、金の蒸着量やアニリング温度、時間を調整することで、粒径を数 10nm から 1  $\mu\text{m}$  程度まで制御し、計測される回転角速度の金ナノ結晶・粒径依存性についても調べた。金ナノ結晶からの回折斑点の検出には X 線イメージングインテンシファイア(V5445P, 浜松ホトニクス)と CMOS カメラ(FASTCAM SA 1.1, Photron)を用いた。

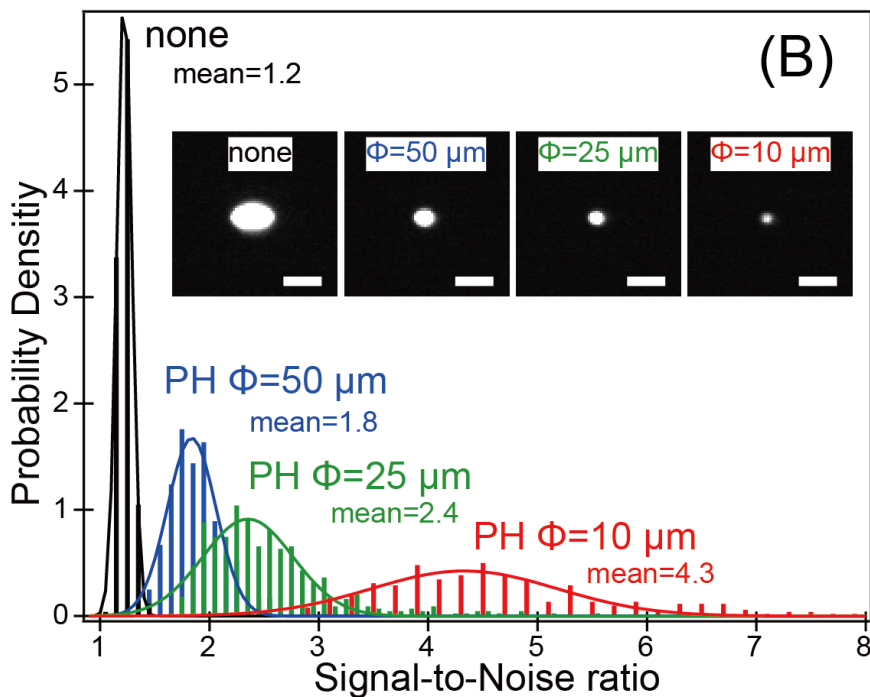
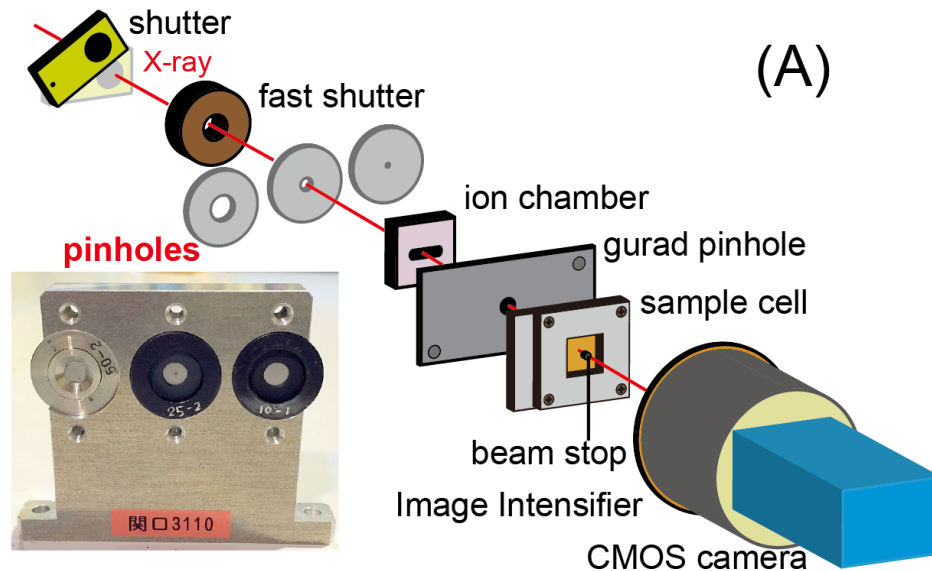


図 2: マイクロビーム X 線 1 分子追跡法。(A) マイクロビーム X 線 1 分子追跡法のセットアップ模式図。(B) 金ナノ結晶のシグナルノイズ比の入射 X 線のビーム径依存性。

### 3 研究成果

#### [マイクロビーム X 線 1 分子追跡法]

X 線 1 分子追跡法のプローブである微結晶からの回折斑点のシグナル・ノイズ比向上とバックグラウンド低減を実現するために、入射する X 線のマイクロビーム化を行った。SPring-8 BL40XU、縦  $50\mu\text{m}$ 、横  $150\mu\text{m}$  に 10 の 15 乗のフォトンフラックスが得られ、図 2-A に示すように光路上に 2 つのピンホール(ビーム径を決めるものと寄生散乱を除去するもの)を用いることで高密度なマイクロビーム X 線を得ることが可能となった。X 線 1 分子追跡法のプローブとなる金ナノ結晶をカプトンテープに写しとり、ビーム径を変えてその回折斑点を評価した。金ナノ結晶の粒径は均質でなく最適条件においても  $40\text{nm}\sim 80\text{nm}$  と広く分布するため、各スポットに対してシグナル・ノイズ比を取得し、その頻度分布を調べたのが図 2-B である。回折斑点のシグナル・ノイズ比はピンホールを導入しない条件(none)と比較し、 $50\mu\text{m}$  ピンホール使用時に 1.5 倍、 $25\mu\text{m}$  ピンホール使用時に 2.0 倍、 $10\mu\text{m}$  ピンホール使用時に 3.6 倍向上し、輝点追跡が容易になった。ただし、ビーム径を制限すると、取得する回折点数が少なくなり実験効率落ちることとなる。今回の助成金で製作した 3 連ピンホールホルダーを用いることで、サンプルの状態に応じて任意にビーム径を変更可能となったので利便性は大きく向上した。

#### [ナノ結晶サイズ依存のタンパク質の内部運動解析]

本研究課題では大きさの異なる金ナノ結晶を作製し、nAChR の分子内運動計測を行い、そのサイズ効果を検証した。図 3-A はアセチルコリン受容体の  $\alpha$  サブユニットに金ナノ結晶をラベルし、アセチルコリン存在下でのねじれ方向の  $100\mu\text{s}$  あたりの角度変化を規格化した回折斑点強度に対してプロットしたものである。回折斑点強度の規格化は、入射 X 線エネルギープロファイルと回折斑点観察角度( $\theta$ )位置から見積もった。相対回折斑点強度の範囲を区切ってヒストグラム化すると、ほぼどの範囲においても 1 つのガウス分布を示し、その中心値は相対回折斑点強度と相関することがわかった。アセチルコリン受容体のアセチルコリン存在下で誘起する平均角速度は、大きいナノ結晶で  $1.0\text{ rad/ 秒}$  程度、小さいナノ結晶で  $4.0\text{ rad/ 秒}$  を中心に分布し(図 3-A)、ゼロ外挿することで本来(ラベル無し)の角速度は  $10\text{ rad/ 秒}$  程度と見積もることが可能である。同様の解析を作動薬(ACh)や拮抗薬(BTx)存在下、および非存在下(Free)で行い、傾斜方向( $\theta$ )およびねじれ方向( $\chi$ )についてそれぞれヒストグラム中心点をプロットしたのが図 3-B および図 3-C である。各々の条件で、ゼロ外挿した値について比較すると、特にねじれ方向( $\chi$ )の運動に相違があり、ゼロ外挿値は、ACh 存在下で  $9.4\text{ rad/s}$ 、BTx 存在下で  $2.3\text{ rad/s}$ 、緩衝液のみでは  $7.8\text{ rad/s}$  と見積もられた。これらの結果は、nAChR のねじれ運動が、作動薬存在下で活性化され、拮抗薬存在下で不活性化されるという従来の知見(Unwin and Fujiyoshi, J. Mol. Biol. 422:617, 2012)と矛盾しない。角速度の金ナノ結晶サイズ依存性をしらべることで、金ナノ結晶がラベルされないタンパク質分子の本来の動きを見積もるための指針を得たことは意義がある。

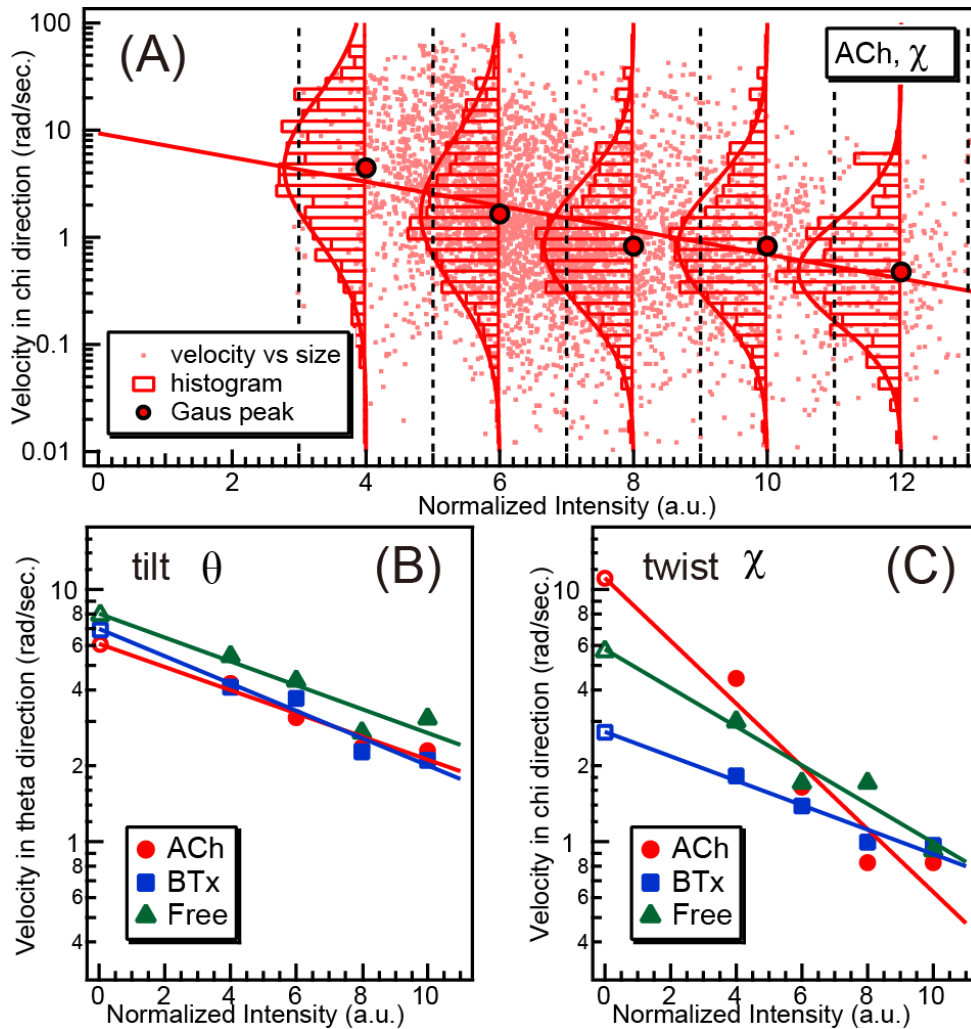


図 3：金ナノ結晶のサイズ効果解析。(A) アセチルコリン受容体のアセチルコリン存在下におけるねじれ方向の金ナノ結晶のサイズ効果。作動薬(ACh)や拮抗薬(BTx)の存在下および非存在下(Free)における nAChR のサイズ効果・解析の傾斜方向( $\theta$ 、B)およびねじれ方向( $\chi$ 、C)のまとめ。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究課題で取り組むX線1分子追跡法の高速度化および分子内運動情報の可視化が実現すれば、タンパク質分子の運動情報が原子スケール且つ、数マイクロ秒 $\mu$ sといった高時間分解で取得可能となる。このような実験的な運動情報は、近年発展が著しい計算科学分野で有効に利用され、同分野へ大きな貢献ができるものと確信する。創薬に結びつく膜タンパク質の分子内運動情報が蓄積されることで、「分子内運動抑制因子」といったような運動情報を基軸とした新しい創薬設計指針が提案可能となる。また、本研究課題ではX線1分子追跡法の高速度化を実現するために入射X線をマイクロビーム化するが、このマイクロビーム化技術はより小さい微結晶からの回折斑点の計測にも適用可能である。しばしばX線1分子追跡法結果を議論する上でプローブとなるナノ結晶のサイズ効果が問題視されるが、その影響を最小限に抑えることが期待できる。