X線回折動画からのタンパク質１分子内部動態計測

佐々木裕次 [1,2]，一柳光平 [1]，関口博史 [2]
[1] 東京大学大学院新領域創成科学研究科物質系専攻
[2] 公益財団法人 高輝度光科学研究センター SPring-8/JASRI

Single Molecule Observations of Protein's Internal Motions from X-ray Diffraction Movies

Yuji C. SASAKI[1,2], Kouhei ICHIYANAGI[1], Hiroshi SEKIGUCHI[2]
[1]Department of Advanced Materials Science, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo
[2] Research & Utilization Division, Japan Synchrotron Radiation Research Institute, SPring-8

Abstract

1998 年にX線 1 分子追跡法（Diffracted X-ray Tracking: DXT）を提案実現した。現在まで 15 年間に，マイクロ秒からナノ秒領域の高速性を達成し，１分子内部運動をピコメートル位置決定精度で計側でき，現存する 1 分子計測法としては，最高精度で最高速度を達成するまでに進展させることができた。DXT は標識法を適応しているために問題点も指摘されるが，その特性を利用して新たな可能性も生まれる。今日までの量子プローブ 1 分子計測法の技術的進展を総括し今後の展開を議論したい。

１．X線１分子追跡法の提案と進展

1976 年 T. Hirschfield [1] によって「基板上の蛍光分子は数えられる」という素朴な進歩から 1 分子計測技術は始まった。今は 1 分子生理学と呼ばれるまでに進展し，表面科学や高分子科学においてもその計測技術の利用が盛んにおこなわれている。T. Hirschfield のように可視光領域のプローブを用いた蛍光 1 分子検出法は，その計測精度の向上を目的として多くの工夫が成されてきた。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の高速性で，かつÅ以下の高精度性を持って 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。理想的には装置が実験室規模で，この究極的 1 分子計測システムの実現は，生命科学のように多様なサンプル系を研究対象とする場合には必須なモノとなる。素粒子研究のように世界に 1 台というコンセプトで開発してはいけない研究分野である。

Fig. 1 では 1 分子計測と顕微鏡の概念が基本的に違うことを示した。「回折限界」という光学常識から逸脱した「分子追跡概念」は当時としては画期的な発想であった。現在も 1 分子計測技術の基本であり，今は Super-Resolution（超解像）の基本発想となっている [2]。1998 年にその発想をX線領域に拡張して，ナノ結晶を標識するというアイデアを提案して実現したのがX線 1 分子追跡法 (Diffracted X-ray Tracking; DXT) である [3,4]。その原理を Fig. 2 に示す。DXT のアイデアは単純で直径数十 nm 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し，標識結晶からのX線回折斑点を指標に，着目したタンパク質

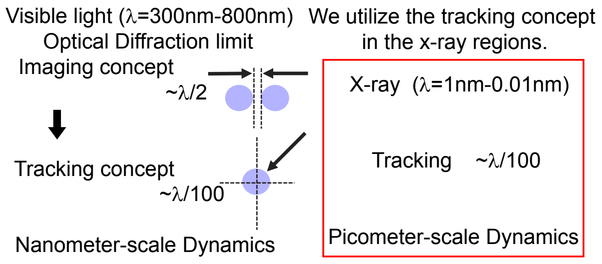


Figure 1
There is the difference between the imaging concept and the tracking one. The single molecule technology is usually applied to the tracking concept. Diffracted X-ray Tracking (DXT) methods are the first demonstration of single molecular detection systems to be adapted in the tracking concept in x-ray wavelength region.

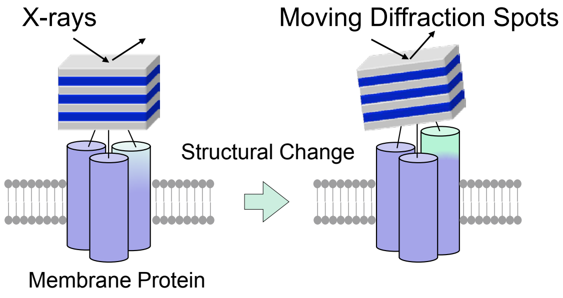


Figure 2
Schematic drawing of the single molecular detection system using x-rays. DXT monitors the behavior of a single special domain with the guidance of diffraction spots from the nanocrystal which is tightly coupled to the special domain. Additionally most of proteins or enzymes are composed of multi-domain proteins, such as dimer, trimmer, or higher-order structures. DXT can observe collaboration movements from this structural symmetry.

分子の動きを時分割的に追跡する。目的1分子の一部に構造変化が起こるとその部位に標識されているナノ結晶が分子内部の構造変化と同期し方位が変化しナノ結晶からの回折斑点の位置が動く。次元性としては，θ方向とχ方向を全く独立な次元として測定されるので，極座標表示と考えれば3次元的な運動へ帰属することも可能である。タンパク質分子が基板やメンブレンに垂直に固定した場合は，その垂直方向に平行に微小振動している運動（tilting）がθ方向に回折スポットが運動する方向で，タンパク質の面内に（垂直方向に対して垂直な面（細胞膜面内）おける回転運動 (rotating) に帰属されるのがχ方向の回折スポット運動に対応する。標識されたナノ結晶は，非標識体のタンパク質分子の微細な運動様式を追随して運動してくれるという当時の勝手な仮定は，水溶液の粘性抵抗を考慮した妙案だったと自負する。しかし，仮定は仮定で，それを証明するためのＸ線回折現象の定量性の利用は（後述），今後の標識法の標準的評価法として活用できる。

２．DXT の最難関技術はナノ結晶作製にある

Ｘ線計測技術としては，謎の物体に標識されたナノ結晶の方位依存性をラウエ回折法で時分割計測しているだけにすぎない。技術的にはそれほど難しく新規性もなかったかもしれない。DXT を実現する最大の難関は標識する金ナノ結晶の結晶性向上にあった。1998 年前後の考案当初は，市販されている直径 10-40 nm の金コロイドを利用した DXT を考えていた。それまでの多くの論文で金コロイドの結晶格子の電子顕微鏡画像は色々なところで報告がされていたからだ。DXT の利用として 1 つだけ異なっている点があるとするならば，時分割的にラウエ回折を撮るので，例えば，ビデオレイト（33 ミリ秒積算）の動画撮影を必須としている点である。その時間内に精度良く回折位置を検出する必要があった。当時，多くの市販されていた金コロイド粒子を時分割ラウエ計測したが 30 ミリ秒レベルで回折斑点計測できる粒子は 1 つも無かった。

自作の試みは主に 2 通りの検討がなされた。1 つはエッチング装置を用いるもので，そのプロセスは非常に複

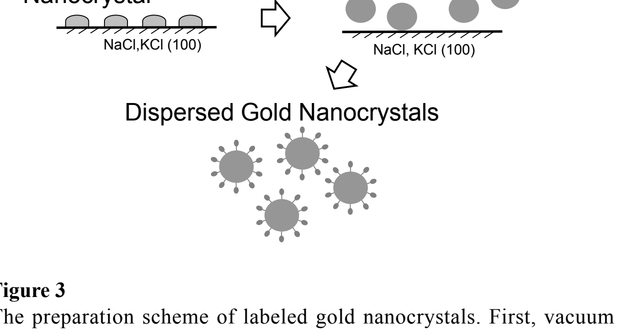


Figure 3
The preparation scheme of labeled gold nanocrystals. First, vacuum evaporation was used to deposit a super thin layer of gold on a cleaved NaCl(100) or KCl(100). The deposited gold formed islands on the substrate and grew epitaxially. Then, to disperse the deposited gold nanocrystals in aqueous solutions without aggregation, the substrate was dissolved by adding the detergent solutions.

雑なために初期の DXT の実験での適応のみとなっている [3,4]。もう 1 つの方法は Fig. 3 のようにイオン結晶系上のエピタキシャル成長を利用している。この作製法はプロセスがシンプルで大量生産に向いている。加えて，NaCl(100) や KCl(100) 上の金の薄膜成長過程に関する研究は 1950 年台から極めて詳細に研究がされており，その蒸着速度や基板表面の清浄性が極めて重要であることが指摘されていた [5]。

可視光を用いた 1 分子計測技術においても，蛍光を発光する分子等が良く利用されている [6]。当初はその分子の大きさが小さい事より，Cy3 や Cy5 等の比較的小さな分子が利用されていたが，より高速性の必要性が議論され始め，数ミリ秒レベルやマイクロ秒レベルが必要な 1 分子計測の場合は，直径数〜数十 nm の Quantum Dot（量子ドット）[7] の利用が現在主流となってきた。その意味からも金ナノ結晶の作製目標サイズは，量子ドットと同様サイズの直径 5-10 nm サイズに設定している [8]。しかし，現在に至るまで，このサイズでの良質金ナノ結晶の作製には成功していない。今のところの最小サイズは 20 nm である。その原因は金蒸着時のイオン結晶表面の清浄性が一番に考えられる。上記の薄膜形成過程の純粋な研究目的と異なる点は，比較的大量に作製しなければならない点と，作製されたナノ結晶はその後にタンパク質分子に化学的に標識させなければならないので，ナノ結晶の最終工程において，水溶液中で安定に分散状態にならなければならない点である。つまり，エピタキシャル成長できる基板は，後に金ナノ結晶から剥離させなければならないし，その工程はシンプルにしなければタンパク質分子への化学的な悪影響を回避できない。現在は Fig. 3 のように水溶液上で簡単に NaCl(100) 面や KCl(100) 面から金ナノ結晶を剥離することができる。現在も多くの蒸着条件を精密に決定し，より小さくてより結晶性の良い金ナノ結晶作製技術が確立してきているので，直径 5-10 nm サイズの作製も時間の問題であろう。このサイズになると色々な生物組織に挿入することが可能となるので，DXT の測定対象がより大きな *in vivo* 系へと適応できるはずである。

ナノ結晶の結晶性やサイズの評価は非常に重要である。DXT 測定前にすべてを評価し，最小サイズの良質金ナノ結晶の作製条件において，タンパク質分子への化学的標識を行う。DXT 前評価法としては，イオン結晶上からメンディングテープによって剥がしたサンプルからのラウエ回折と，大気中の AFM 評価，溶液中の DLS 評価が主である。これらによって，結晶性とサイズ，そして水溶液中の分散性が評価できる。最近加えた評価法に SEM による電子後方散乱回折 EBSD（Electron Backscattering Diffraction）評価がある。これは後述する電子線 1 分子追跡法 (Diffracted Electron Tracking;DET) の原理として利用している [9]。Fig. 4 は，ある条件下で作製した金ナノ結晶のラウエ回折パターンと EBSD パターンである。Fig. 4(A) はラウエ回折では明確な回折斑点が計測できていないのに，EBSD で非常に明確な結晶パターンが得られている。Fig. 4(B) はその逆

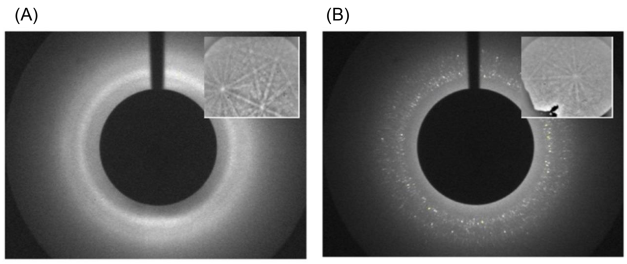


Figure 4
Characterizations from Laue pattern and EBSD profile. (A) The crystallinity of the gold nanocrystal is good only in the surface region. (B) The crystallinity of the gold nanocrystal is good except for the surface region.

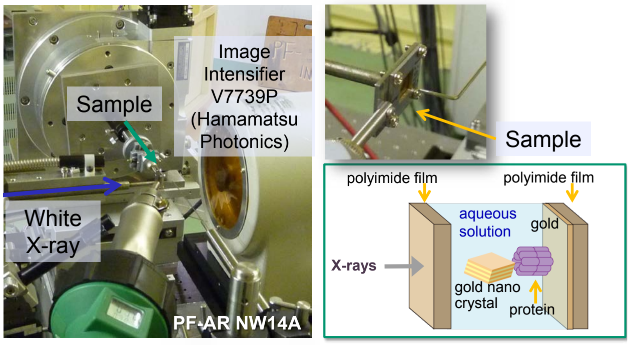


Figure 5
A photograph of the instrumental arrangements for DXT at PF-AR NW14A. The sectional view of the DXT sample is shown. Although X-rays have penetrability, there is a limit in the thickness of an aqueous layer (5-10micro-meter).

で，ラウエ回折では明確な回折斑点が計測できているのに，EBSD では Fig. 4(A) よりも不鮮明な結晶パターンが得られている。EBSD は金ナノ結晶の表面部位のみの結晶性を評価し，DXT はナノ結晶全体の結晶性を評価していると考えられる。

Fig. 5 は DXT の装置配置写真（KEK PF AR NW14A）である。後述するシャペロニンの ATP 結合に伴う 1 分子内部回転運動計測 [10] では，caged ATP の利用が必須であった。時分割ラウエ回折法とレーザー光励起（YAG レーザー使用）を併用して実験できる装置配置が得意とする本ビームラインでなければ不可能な実験であった。

3．標識法とＸ線による追跡法の特異性を有効利用

1 分子内部における動態挙動を高精度に高速計測し，機能性タンパク質分子の機能発現メカニズムの素過程を計測することに異論を唱えられることはない。それも，無標識でそのままの姿で 1 分子構造動態評価できることが最終目標である。無標識 1 分子計測の最近の成果としては，高速 AFM の実現がある [11]。現状でも数十ミリ秒の高速性と数 nm 以下の高精度性を誇る。AFM が登場した当初を考えると極めて画期的な成果である。しかし，多くのタンパク質分子の構造動態評価は，マイクロ秒以下の高速性でかつ 1 Å以下の高精度性を必要としている。これを実現するためには，現在の 1 分子計測技術群の中で検討すると，何らかの標識法を採用するしかない。可視領域では量子ドットを使い，Ｘ線領域では DXT にようにナノ結晶を標識利用する。標識法が毛嫌いされるのは，その標識することによる観察分子への影響である。無標識との動態特性が定量的に評価できるのであれば，標識法にも市民権が得られるはずであるが，今のところ同等の分子構造動態情報を無標識で得ることはできない。

最近 DXT では，この無標識と標識の間隙を定量的な解析で埋めることを提案した。自作した金ナノ結晶はイオン単結晶上のアニーリング温度やアニーリング時間を制御することで Fig. 6(A) のように，10 nm から 100 nm までその直径を制御作製することができる。また，検出している回折スポットは位置情報以外にＸ線回折点強度も定量的に解析できる。Fig. 6(B) は，タンパク質分子に標識された金ナノ結晶の回折強度から算出した粒径サイズと，ある機能性タンパク質分子のナノ結晶からの回折斑点の運動速度の関係を示す。赤線は 100 点程度の回折スポットの平均運動速度であり，それぞれほぼ正規分布を持っている。各サイズの点を結ぶとほぼ直線関係(赤線)が得られる。この傾向は，大きいナノ結晶を標識すると若干ではあるが分子の運動量が減少することを示している。1 分子レベルの運動特性を考えると，この運動速度減少は，金ナノ結晶の質量と言うよりもサイズからの局部粘性抵抗の増大を示すと考えられる。その効果はより小さいサイズにおいても連続的な変化が推測される。従って，この直線関係から，y 切片にあたるナノ結晶サイズ「ゼロ」時の運動速度を求めることができる。Fig. 6(B) において求めることができるが，Fig. 6(B) の中間レベルのナノ結晶サイズと比べて数％程度の運動速度の増大が示されており，標識の影響はそれほど大きくないことが定量的に示すことができた。もちろん，この強度評価では双晶のような 2 つのドメインが 1 つの標識ナノ結晶に存在する場合は，サイズによる効果を大きめに評価してしまう。しかし，AFM や EBSD のデータから考えると，直径 20-60 nm の金ナノ結晶は双晶を取っておらず，ほぼ 1

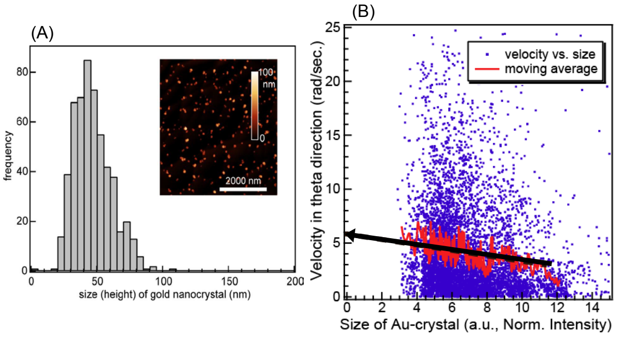


Figure 6
Sized effect of gold nanocrystal on proteins. AFM image of the gold deposited 2.0 nm thick at substrate temperature 420°C on the cleaved KCl (100) substrate. The size of gold nanocrystals ranged from 20 to 80 nm. The observed angular velocity of the labelled gold nanocrystal has a relation linear between the normalized intensity (estimated size) of the diffraction spot.

つの結晶粒として考えることができるとの評価をしている。

以上のような定量評価は，可視領域で用いている量子ドットでは不可能で，定量的な解析を得意とするX線計測技術に軍配が上がる。もちろん，量子ドットからのX線回折スポットを計測できるのであれば，その標識評価も可能であるが，現在まで多くの市販されている量子ドット（直径5-20 nm）ではビデオレイトレベルの積算ではX線回折スポットを測定することに成功していない。しかし，これに成功できたならば，量子ドットを標識プローブとして用いることができ，可視領域とX線領域の1分子計測が同時測定可能となり，DXTがより汎用的な方法論として利用されるようになるかもしれない。標識は量子ドットだけで，全く違う波長における1分子同時計測法は，より多面的な動的挙動を明らかにしてくれることであろう。

DXTのもう1つの特徴は追跡法であることだ。これは検出器系において思わぬ利点があった。X線検出には，回折記録用X線イメージインテンシファイア（X-II）を用いている。検出器入射窓でX線を電子に変換し，それを高電圧下で加速し，出力窓の蛍光体に当てて，その蛍光を可視光用のカメラで観察する。入射窓ではベリリウム（0.5 mm厚）の真空側に厚さ0.15 mmのCsIが蒸着してあり，これによってX線は可視光に変換される。CsIの真空側にはフォトカソードが蒸着してあり，これによって可視光は電子に変換される。印加されている高電圧によって電子は加速され，出力面の蛍光体に当たって強い蛍光を生じる。この際に電子レンズが入力面の電子の分布を縮小して出力面に投影するため，入力面のX線像を増倍して可視光像として観察することが可能となる。像が縮小されるため，可視光用カメラでレンズを通して出力画像を観察することが容易になる。この場合，X-IIの残光特性を決めるのは蛍光体である。入力面の蛍光体であるCsIは数マイクロ秒の残光を持つと言われる。出力面の蛍光体には一般には発光量の多いP43 (GADOX/GOS, Gd_2O_2S:Tb) が使用されるが，P43は数ミリ秒の残光を持つと言われている。P46 (YAG, $Y_3Al_5O_{12}$:Ce) の残光はマイクロ秒オーダーで減衰するので，高速撮影に適していると考え，シングルショットをマイクロ秒で計測する高速DXTは，この蛍光体P46で当初測定していた。しかし，X線回折の信号強度が思うように

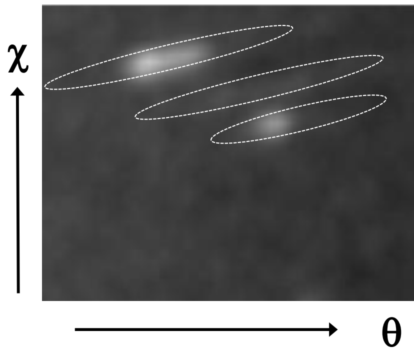


Figure 7
Typical observed Laue diffraction pattern from high speed DXT technique. It can check that the spots has spread.

取れなかった。P46は残光が短いがそれは積算的な感度で考えると悪くなるのは当然である。しかし，良く考えるとDXTは追跡法である。明暗の明確な画像を撮りたいわけではない。回折スポットの中心座標が決まるだけで良い。それでP43に戻しシングルショットを十マイクロ秒で測定すると，ちょっと大きめではあるが，直径70-80 nmの金ナノ結晶からの明確な回折スポットを得ることができた。良く回折斑点を見るとFig. 7（10μ秒積算）のように検出された回折斑点が少々長いストリークを持っている（点線で囲っている3か所に線状の回折点が見える）。これは残光が長いためである。しかし，最終的には回折位置の決定に何も支障はなかった。このように検出器系の心臓部の蛍光体を高速型にしないために，その高感度性を維持できるのはDXTならでは利点と言える。

4．高速DXTによるアロステリック効果の観察（シャペロニンを例として）

シャペロニンは変性タンパク質と直接相互作用し，その折れたたみを促進させるタンパク質である。シャペロニンは複数のサブユニットから成るリング構造を背中合わせに2つ重ねた筒状構造をとり，ATP依存的にその構造を変化することで機能するが，そのダイナミクスは明らかでなかった。高精度の分子内運動計測を実現するDXTを用いて，II型シャペロニンの構造変化をDXTで1分子計測した。様々なATP濃度条件およびcaged-ATP存在下における光照射前後での測定を比較した結果，シャペロニン・リングはATP結合後，非協同的な閉運動後，リング上方からみて反時計回りに約10度ねじれることが判明した [10]。

Fig. 8は2 mM ATP濃度条件および2mM caged-ATP存在下における光照射前後での測定を比較した結果を示している。2 mM ATP存在下では，CWとCCWの両方向に回

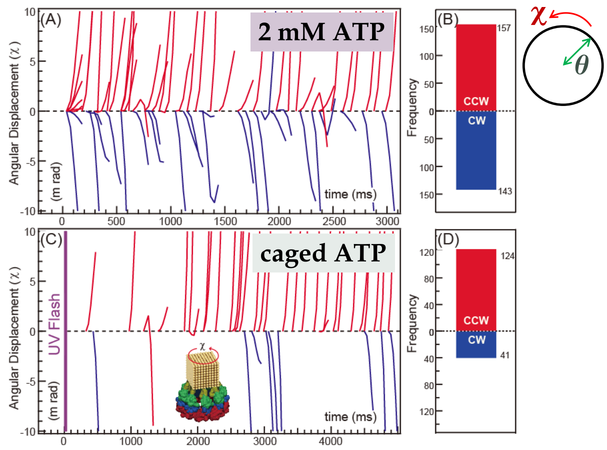


Figure 8
ATP-triggered twisting directional analysis of the group II chaperonin in the χ axis. Rotational position trajectories are shown as a function of time in the presence of 2 mM ATP (A) or 5 mM caged-ATP after a UV flash (C). The histograms in (B) and (D) show the frequency of the initial direction, either clockwise (CW) or counterclockwise (CCW), in the presence of 2 mM ATP or 5 mM caged-ATP, respectively.

転していたが，Caged ATP 存在下ではほぼ CCW が最初の回転方向であることが計測できた。つまり，CCW 方向が ATP の結合した際に連動して起こる回転運動であることが分かったのだ。また，ATP が結合してから構造変化するまでに少々のタイムラグがあることも別に行ったストップドフローの蛍光測定で判明し，その時は χ 方向の回転ではなく，θ 方向の運動で，かつ極めて早い運動であることが確認された。また，CCW 方向と CW 方向の回転運動速度が異なることも判明した。これを説明するためには，もう少し実験しなければならないが，今のところ，CCW は 1 ステップで回転し，CW は 2 ステップで回転しているので，それが原因で CCW の方で少々回転速度が速いのではないかと考えている。この結果は DXT 測定法ならではの定量的な成果である。

機能性タンパク質分子の多くは，複数ドメイン構造を取っている場合が多く，対称性としてはヘテロ型やホモ型がある。今回，測定したシャペロニンもホモ 8 量体でリング構造を形成するが，金ナノ結晶を化学固定するために Cys や Met を遺伝子導入する。従って，1 個のナノ結晶に 8 個の Cys サイトが反応することになり，しっかりと固定してタンパク質分子との運動同期性を上げたい DXT の目的には合致するが，反応サイトが多すぎると空間的な拘束性が出てきて，本来の分子内部運動を再現できなくなると本末転倒の事態となる。ナノ結晶のサイズ効果 Fig. 6(B) とは違った標識する際の注意点となる。実際，このシャペロニン系において，その回転運動を電子顕微鏡で断片的に捉えた研究があるが，最大回転角は DXT データよりも 2 倍程度であった。勿論，ホモ型であっても遺伝子導入に工夫を凝らせば，その Cys 導入総数を 8 カ所から減らすことは可能でその実験は現在進行中である。

以上のような過剰な運動拘束を与えてしまう多点結合式ナノ結晶標識にも有効利用できる現象がある。それはアロステリック効果である。局部的な構造変化がどのように分子全体に伝播するかは，協奏モデルか逐次モデルかの判断が可能になり，機能発現のメカニズム解析においても是非計測したい分子内部運動の 1 つである [12]。今回のシャペロニンは ATP 結合サイトが多いので観測結果は複雑であったが，アロステリック効果を 1 分子内部構造動態の連鎖運動として計測することが，この多点結合式ナノ結晶標識で可能となる。対象分子の基板吸着させる方向を定義できる系において，分子の右回りや左周りを特定できるように，リガンド結合時の構造変化の後にどのような構造変化が連鎖するのかは，多点で 1 つのナノ結晶を標識することで検出できる。また，この連鎖運動は大きなドメイン間の運動であることを考えると，ナノ秒レベルの超高速な運動というよりも，マイクロ秒レベルの分子内部運動と考えられるので，マイクロ秒 DXT で多点結合式ナノ結晶標識を用いれば十分可能であると期待している。

5．他の量子プローブ 1 分子計測法への波及と今後の 1 分子計測の行方

DXT は，分子に標識したナノ結晶からのＸ線回折斑点の動きを連続的にトレースする。現在，ピコメートルの位置決定精度でマイクロ秒の高速性を実現し，世界最高精度最高速度 1 分子計測法となった。しかし，DXT 最大の欠点は，Ｘ線プローブ源として大型放射光施設を利用することである。そこで X 線よりも試料との相互作用の大きい電子線を用いて，実験室規模で常時高精度 1 分子計測できる汎用性の高い 1 分子運動追跡装置の開発を行った。加えて現状の DXT では，Ｘ線ビームを原子サイズにできないため，放射線照射による試料ダメージが問題点となっているが，Å サイズの電子ビームを用いることでこのダメージの問題を解決できるようになった。本開発装置では，EBSD 検出器を装備した走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope; SEM）を用い，生体分子に標識したナノ結晶の結晶方位の変化を，原理的に生体分子へのダメージを与えることなく，高速時分割計測を実現した。この開発装置では，電子線 1 分子追跡法（DET）の原理検討として，金コロイド粒子の動的挙動を計測対象とした [9]。

DET の基本装置構成を Fig. 9 に示す。溶液中の試料を観察できる SEM 用の環境試料室（Wet Cell）を薄膜カーボン製（厚さ 10-20 nm）の隔膜を用いて，生体分子に標識したナノ結晶の結晶方位の変化を EBSD パターンで高速時分割計測できるコンパクトなラボサイズの高精度電子線 1 分子（粒子）追跡法である。SEM を用いて，水溶液中に存在する直径 40 nm の金コロイド粒子の運動をピコメートル（原子サイズの 1/100）精度で 60 ミリ秒の高速性で 2 秒間動画の計測をすることに成功した。また，測定により DET は DXT と異なり，市販の金コロイドを標識体として使用できることが新たに分かった。DXT は，非常に良質なナノ結晶を必要とし，その作製に関する研究に多くの時間が費やされる。一方で DET では，良質な結晶でなく，市販されている直径数十 nm の金コロイド粒子の方位を EBSD が敏感かつ高精度に検出できる。

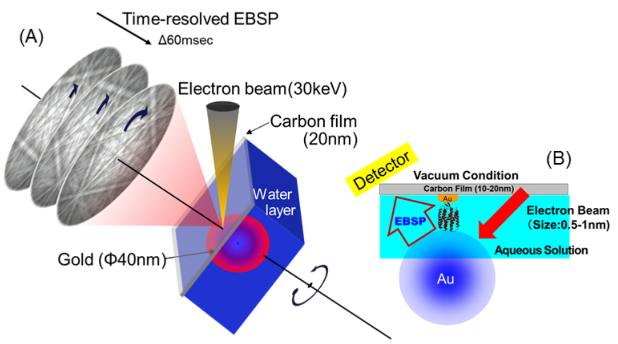


Figure 9
Conceptual diagram of Diffracted Electron Tracking (DET). This is the arrangement of our new dynamic single molecular detection system using the EBSD pattern from the labeled gold nanoparticles on the coating polymer film with wet-SEM. DET can observe 3D dynamical motions of the labeled gold nanoparticles in the vacuum and aqueous solutions with the milli-second time scale.

上記 DET と DXT を比較することで明確化してきた点がある。1つはX線が結晶性について，電子線を用いた際と比較すると非常に感度が悪い点である。電子線を利用したならば，結晶性が良いとは言えないナノ結晶の表面部分だけの結晶性を高感度に検出できた（例えば Fig. 4 のように）。溶液状態における環境資料室の利用等の全く別のハードルはあるが，結晶方位を検出情報と考えると電子線が最適である。しかし，電子線によるダメージは深刻で電子線プローブが直接タンパク質分子に照射されていない状況を作ったとしても，今後より一層の工夫が必要となる。もう1つはプローブ径の威力である。X線は 100 μm 程度の大きい直径でサンプルに照射されるので，測定時間中すべてX線が照射されてしまっている。全く情報を利用していないにも関わらずである。それに対して電子顕微鏡は数 Å のビーム径を実現しており，かつビーム走査をもう 1 つの情報とするならば，DXT で得ることが出来なかった並進運動も検出可能となる。

以上のように，DET は装置規模が研究室レベルであるという点を加えると，現状では DET 法の方が間違えなく魅力的である。しかし，DXT に拘るのは，得られる情報が表面近傍だけではなく，深部（~μm レベル）での計測が可能で，細胞を用いた *in vivo* 計測が実現できるからだ。タンパク質 1 分子の正確な機能発現メカニズムを計測するのが最終目的であるならば，細胞場という条件は最低守らなければならない。

DXT はそのプローブの波長性を高精度性の理由としているのであれば，量子ビームすべての 1 分子追跡法は試されるべきであろう。それらすべてを標識法で実現するならば，その標識効果を Fig. 10 のように推測することができる。今後の開発として，中性子 1 分子追跡法 (Diffracted Neutron Tracking; DNT) は避けては通れない計測である。また，電子顕微鏡を用いて標識なしで分子の動態観察に最近成功しているが [13]，その観察情報を利用して，標識法からの無標識構造動態測定をできる点は非常に有効で，これらX線，電子線，そして中性子を用いた量子ビーム 1 分子追跡法の確立は実現するべき方法論と考えている。DNT の魅力的な点を一つ述べるならば，*in vivo* 計測において，その計測場が細胞から組織へ移行して行った場合，その必要な計測時間はより一層長時間必要となる。その（例えば数日）間を連続的に測定できるほどの非破壊性を持っているプローブでなければならないことは自明であり，中性子が最適と判断できる。

この 15 年間に DXT は順調にその特性を生かし，多義に渡るサンプル系の新しい動態情報をじっくりと計測してきた [14,15]。今後も例えば，細胞内チャネルタンパク質分子の構造動態計測，パッチクランプ法との併用 DXT 計測，可視 1 分子計測との DXT 同時計測，天然変性タンパク質分子の動態挙動計測，局部的な粘性特性の変化する過飽和現象計測，ミクロ流体に係る動的挙動現象等，未知なる現象を高速に高精度に計測して行く予定である。今回，DET を新たに開発することで，DXT の欠点も明確化された。

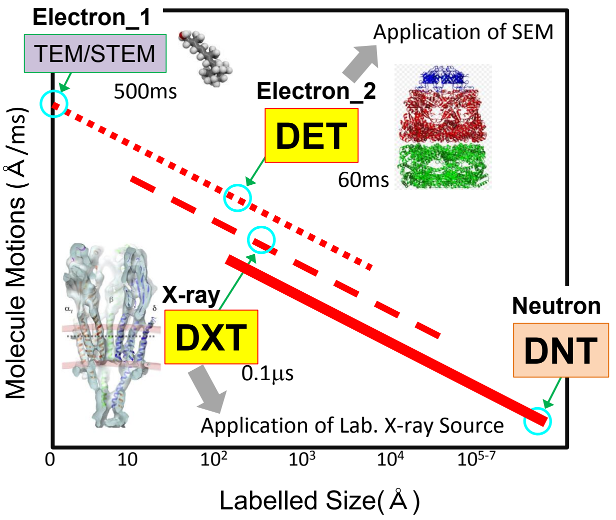


Figure 10
Relationship between DXT, DET, and DNT. Single molecule detection systems using quantum-beam (X-ray Electron, and neutron) are characterized by sized effect of labelled gold nanocrystals. TEM/STEM can observe single-molecule dynamical observations with a non-labelling method.

新たに DNT を実現する過程で，DXT や DET にとってプラスになる要因の発見もあるだろう。例えば，Fig. 6(B) を逆方向に考えるならば，実験室レベルのX線光源を用いた DXT も現実味を帯びてくる。X線のナノプローブが手軽に利用できるようになれば，ラウエ回折計測の S/N も現状よりも格段に向上するであろう。DXT はX線回折現象を高速に利用しているだけである。他にも，X線干渉現象やX線全反射現象時に起こるエバネッセント波発生は新しい 1 分子計測の原理として非常に魅力的である。その利用の際に，「高速性」と「高感度性」さえ実現できるならば，1 分子計測への道は開かれるに違いない。

謝辞

シャペロニン系の DXT 計測は主に KEK PF AR NW14A において行われた。本ビームラインの建設，そしてその広域的普及利用にご尽力されてこられた足立伸一氏，野澤俊介氏，佐藤篤志氏に深く感謝する。本 DXT 研究は，初期段階（1998 年から）において JST 個人研究推進事業さきがけ研究 21(JST/PRESTO) の研究助成により推進された。また，2001 年から JST 戦略的基礎研究推進事業（JST/CREST）において 5 年間× 2（合計 10 年間）の研究助成をいただいた。SPring-8/JASRI の八木直人氏と鈴木芳生氏には DXT アイデア当初から深い議論をしていただいてきた。今回のサンプル系において，養王田正文氏，桑島邦博氏，中川あゆみ氏，守谷和騎氏，真壁幸樹氏，山本陽平氏に，この場をお借りして深く感謝したい。養王田正文氏の極めて積極的な DXT 利用研究のスタンスがなければ，このレベルまで DXT の技術的進展は出来なかった。

引用文献

［1］ T. Hirschfeld, Appl. Opt., 15(12), 2965(1976).

［2］ A. Yildiz, P.R. Selvin, Acc. Chem. Res. 38, 574 (2005).

［3］ Y. C. Sasaki, Y. Suzuki, N. Yagi, S. Adachi, M. Ishibashi, H. Suda, K. Toyota, M. Yanagihara, Phys. Rev. E. 62, 3843 (2000).

［4］ Y. C. Sasaki, Y. Okumura, S. Adachi, H. Suda, Y. Taniguchi, N. Yagi, Phys. Rev. Lett. 87, 248102-1. (2001).

［5］ S. Ino, D. Watanabe and S. Ogawa, J. Phys. Soc. Japan 17, 1074 (1962).

［6］ S. Weiss, Science 283, 1676 (1999).

［7］ A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, P. G. Schultz, Nature, 382, 609 (1996).

［8］ B. A. Kairdolf, A. M. Smith, T. H. Stokes, M. D. Wang, A. N. Young, S.Nie, Ann. Rev. Anal. Chem., 6, 143(2013).

［9］ N.Ogawa, K. Hoshisashi, H.Sekiguchi, K. Ichiyanagi, Y. Matsushita, Y. Hirohata, S. Suzuki, A. Ishikawa, Y. C. Sasaki, Sci. Rep. 3, 2201 (2013).

［10］ H. Sekiguchi, A. Nakagawa, K. Moriya, K. Makabe, K. Ichiyanagi, S. Nozawa, T. Sato, S. Adachi, K. Kuwajima, M. Yohda Y. C. Sasaki, PLOS ONE 8(5) e64176 (2013).

［11］ T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, Ann. Rev. Biophys. 42, 393(2013)

［12］ J-P, Chaneux, Protein Science,20, 1119 (2011).

［13］ M. Koshino, T. Tanaka, N. Solin, K. Suenaga, H. Isobe and E. Nakamura, Science, 316, 853 (2007).

［14］ Y. C. Sasaki, Dynamical Observations of Soft Nanomaterials Using X-rays or High-energy Probes, p69-107, SOFT NAMOMATERIALS, American Scientific Publishers (2009).

［15］ Y. C. Sasaki, Picometer-scale Dynamic X-ray Imaging, 209-234, FUNDAMENTALS OF PICOSCIENCE, CRC Press (2013).

（原稿受付：2013 年 12 月 20 日）

著者紹介

佐々木裕次 Yuji C. SASAKI

東京大学大学院 新領域創成科学研究科
物質系専攻 教授
〒 277-8561
柏市柏の葉 5-1-5 基盤棟 609
TEL：04-7136-3856
FAX：04-7136-3857
e-mail: ycsasaki@k.u-tokyo.ac.jp

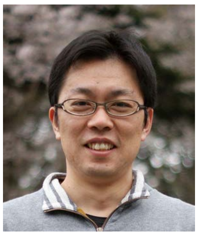
略歴：1991 年東北大学大学院工学研究科博士課程修了（工学博士）。
最近の研究：量子プローブを用いた新規 1 分子計測法の考案とその学融合的展開 。
趣味：メジャー雑誌に投稿して落ちまくること，科学啓蒙活動及び執筆。

一柳光平 Kouhei ICHIYANAGI

東京大学大学院新領域創成科学研究科
物質系専攻　助教
〒 277-8561
千葉県柏市柏の葉 5-1-5 基盤棟 609
TEL:04-7136-5550
FAX:04-7136-4297
e-mail: ichiyana@k.u-tokyo.ac.jp

略歴：2006 年東京工業大学大学院総合理工学研究科物質科学創造専攻博士課程修了（博士 (理学)）。
最近の研究：不可逆系構造ダイナミクスの時間分解Ｘ線測定技術の確立。

関口 博史 Hiroshi SEKIGUCHI



公益財団法人高輝度光科学研究センター
利用研究促進部門 研究員
〒 679-5198
兵庫県佐用郡佐用町光都一丁目 1 番 1 号
TEL 0791-58-0833
FAX 0791-58-0830
e-mail: sekiguchi@spring8.or.jp

略歴：2004 年 東京工業大学生命理工学研究科博士課程修了（博士 (理学)）。2012 年より現職。
最近の研究：タンパク質の分子内ダイナミクス計測。
趣味：自転車，野球全般