

# X線1分子追跡法を用いたタンパク質分子内部動態観測

一柳光平

東京大学大学院新領域創成科学研究科 〒277-8561 千葉県柏市柏の葉 5-1-5  
(現所属：高エネルギー加速器研究機構 〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1)

関口博史

高輝度光科学研究センター SPring-8/JASRI 〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

佐々木裕次

東京大学大学院新領域創成科学研究科 〒277-8561 千葉県柏市柏の葉 5-1-5

## 要旨

X線1分子追跡法 (Diffracted X-ray Tracking: DXT) は、白色硬 X 線とナノ結晶標識により個別タンパク質分子の内部運動をミラジアン精度でその場観測することで、タンパク質分子内の機能性や揺らぎを明らかにするのに極めて強力な計測手法である。現在まで DXT が考案されてから位置決定精度や時間分解能の改良が行われ、タンパク質内部の精密な運動計測とその大量データの統計解析へと広げつつある。ここでは新たに開発した光誘起 DXT, 広角度域 DXT とその解析手法について例を挙げながら紹介する。

## 1. はじめに

計測技術の進歩により1分子計測法の空間分解能は、可視光の「回折限界」を超え、超解像となるナノメートルのサイズまで迫りつつある<sup>1-3)</sup>。本稿で紹介する X 線1分子追跡法 (Diffracted X-ray Tracking: DXT) と通常の1分子測定と違う点は、プローブに硬 X 線 ( $\lambda = 1 \text{ \AA}$  程度) を用いている点に他ならない。そのため DXT は、可視光の波長程度の空間分解能から一気にオンゲストROOMオーダーに到達することが可能になった。この DXT は、1998 年に佐々木裕次らにより提案され<sup>4,5)</sup>、白色 X 線とナノ結晶標識を組み合わせ、ナノ結晶標識からの回折点を追跡することでナノ結晶標識したタンパク質の分子内部運動をミリ秒からマイクロ秒の時間精度でリアルタイムに追跡することが出来るようになった。

Fig. 1 に DXT の基本原理を示す。目的のタンパク質を基板へ化学的に固定し、その固定したタンパク質に金ナノ結晶を標識する。白色硬 X 線 (8–20 keV) を用い金ナノ結晶からのラウエ回折点を2次元検出器により時間追跡する。観測される回折点1点の座標から金ナノ結晶1つの動きである傾き (tilting) の  $\theta$  方向と回転 (twisting) の  $\chi$  方向の2つ回転軸をミラジアン精度で決定することが可能である。標識されたナノ結晶は、被標識体のタンパク質分子内の微細な揺らぎや運動に追従する。原理的にナノ結晶の標識が可能であれば1分子でタンパク質分子内運動の *in situ* 計測だけでなく *in vivo* 計測も可能となる。

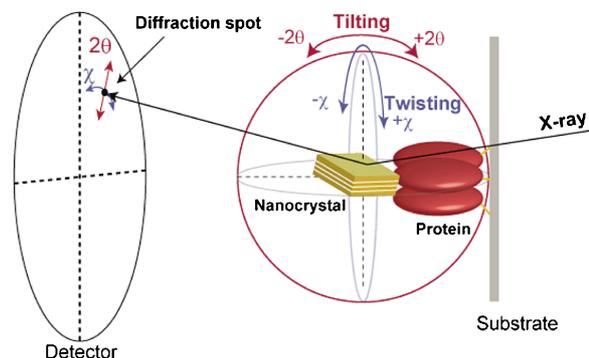


Fig. 1 (Color online) Schematic drawing of the principles of Diffracted X-ray Tracking (DXT). The marker is gold nanocrystal anchored to the protein. The movement of diffraction spot from Au 111 and 200 along the  $\theta$  and  $\chi$  directions follow the *in situ* motion of the individual protein in the solution.

さらに DXT の高度化に向けてポイントとなる点は、1タンパク質分子の機能的な分子内部運動変化のその場観測と揺らぎの統計的な解析である。タンパク質分子内部の揺らぎと運動は、タンパク質の機能性、構造変化や、タンパク質のフォールディング過程に非常に関係が深い。我々は、タンパク質の分子内部運動変化を観測するためにパルス光をトリガーとするナノ秒パルスレーザーと DXT を組み合わせた光誘起 X 線1分子追跡法の開発を行った。またタンパク質の1分子内運動の軌跡をより多く観測し分子内部運動を統計解析するためのエネルギー幅の広い X

線プローブを用いた広角度域 DXT を開発した。

本稿ではこの2つの手法について解説し、パルス光をトリガーとして用いたシャペロニン分子の回転運動観測とヒト血清アルブミン (Human Serum Albumin: HSA) 分子と2-アントラセンカルボン酸 (2-anthracenecarboxylic acid: AC) が錯体化した HSA/AC 錯体における DXT による分子内揺らぎ測定を例に紹介する。

また、タンパク質分子1分子の動態情報をいかにして本誌のような2次元紙面上に表現するかという基本的な新しい戦略例も紹介する。本 DXT 研究の最終目標は、超高速かつ超高精度3次元タンパク質1分子内部運動の網羅の時分割計測を実現することである。タンパク質分子を構成する数万以上の各原子における3次元情報の時間変位をすべて議論する。つまり、3次元プラス時間軸と言う4次元情報で各原子(数万点)の情報を議論対象にしなければならないことから、ビックデータを取り扱うような話になるであろう。我々はこの膨大な4次元データを、極座標表示した運動ヒストグラムの動画表示として表現できることに帰結した。最後にその例を示す。

## 2. 金ナノ結晶の標識とサンプル基板の作製

### 2.1 金ナノ結晶標識

タンパク質の標識として金ナノ結晶のラウエ回折点を精度良く時間分解測定するところが本計測法の要になる。故に金ナノ結晶のラウエ回折点を S/N と S/B が良い状態で測定し、かつタンパク質の運動に及ぼす影響を最小限にするために金ナノ結晶を出来るだけ小さいものでなくてはならない。DXT による測定では金ナノ結晶の大きさと結晶性の制御が大きなポイントとなる。現在は主に NaCl (100) や KCl (100) の上にエピタキシャル成長させることで約20-40 nm の大きさの良質な金ナノ結晶を作製することが可能になった<sup>6)</sup>。金ナノ結晶標識は、目的のタンパク質に標識するために始めにイオン性結晶の基板上から剥離し、タンパク質の特定の部位に結合させる。1つの結晶から1つの{111}もしくは{200}の回折点を追跡する。水溶液中で金ナノ結晶を標識させるためタンパク質に対する金ナノ結晶の向きは制御出来ない。金ナノ結晶からの回折点は、白色 X 線のエネルギー幅での回折条件に合致した向きにある金ナノ結晶だけが DXT で観測することが出来る。

### 2.2 サンプル基板の作製

Fig. 2(a) に典型的な DXT のサンプルホルダーを示す。金蒸着したポリイミド基板に目的のタンパク質を固定した後金ナノ結晶を標識し、ポリイミドフィルムで蓋をする。サンプルを封入する水溶液の厚さは50 μm にする (Fig. 2(b))。この DXT 測定ホルダーで測定可能な窓の範囲は7×7 mm<sup>2</sup> であり (Fig. 2(c))、1回のラウエ回折動画測定で新しいサンプル面へと移動しながら X 線照射によ

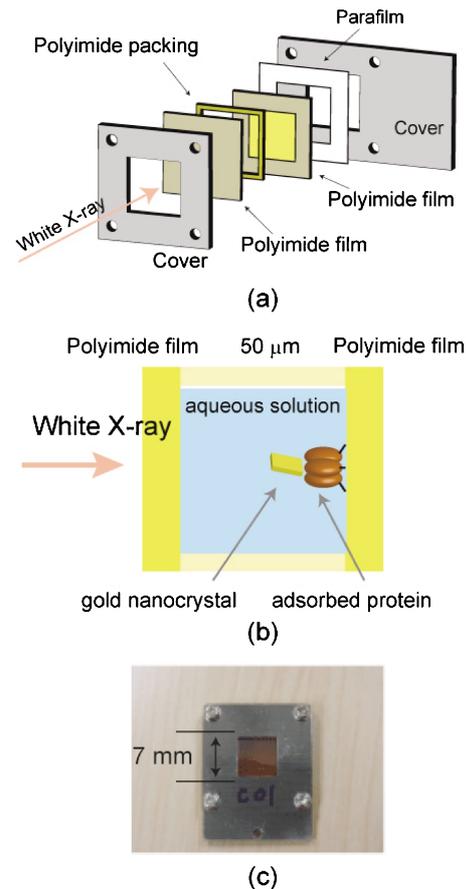


Fig. 2 (Color online) (a) Schematic views of the DXT sample holder. The buffer solution layer (about 50 μm thick) is held by polyimide films. Each protein is anchored to a gold deposited film through sulfur-gold bonds. (b) Side view of sample holder. The X-ray is irradiated in a direction perpendicular to protein anchored to the polyimide film of the downstream film. (c) Photograph of the DXT sample holder. The window size is 7×7 mm<sup>2</sup>.

るタンパク質の損傷を避けつつ、6×6回の測定を行った。1回のラウエ回折動画を測定における X 線露光時間は約 3.3 s (1 フレーム当たり 36 ms の場合) である。

## 3. パルスレーザーを用いた光誘起 X 線 1 分子追跡法の開発 (シャペロニンの回転運動観測を例に)

光応答性や ATP など特定のトリガーとなる光信号または分子が介在した状態におけるタンパク質分子の分子内部運動の変化は、X 線構造解析から推測することが可能であるが実験的に実証が困難である。そのためナノ秒レーザーパルスによるトリガーと、DXT を用いることで時間経過とともに変化する水溶液中のタンパク質の揺らぎ、構造変化やその運動方向変化を議論する必要が出てきた。分子内部運動変化を計測するための DXT とレーザーを組み合わせた計測技術開発は、高エネルギー加速器研究機構

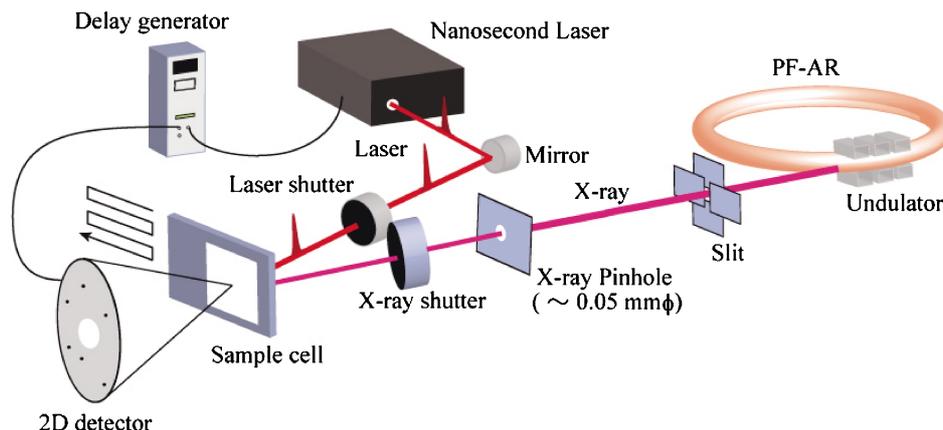


Fig. 3 (Color online) Schematic diagram of the laser-pumped DXT at beamline NW14A, PF-AR.

(KEK) の Photon Factory Advanced Ring (PF-AR) の時間分解 X 線測定ビームライン NW14A で行い<sup>7)</sup>, パルスレーザーを組み込んだ光誘起 X 線 1 分子追跡法 (Laser-pump Diffracted X-ray Tracking: Laser-pump DXT) の開発をした。NW14A はこれまでピコ秒時間分解のポンプ・プローブ X 線測定を主とした測定法開発と光誘起構造・スピンドYNAMIXの研究で成果を上げてきた<sup>8-10)</sup>。そのレーザー計測と量子ビームの融合計測技術を応用し, DXT と組み合わせた Laser-pump DXT) の開発を行った。

これまで通常の DXT では, 標識したナノ結晶の回折点の動きを撮影するため 1 フレーム当たり 36 ms で 90 枚撮影をしてきた。現在では, CMOS 型の高速度 CCD カメラを用いることで同じラウエ回折像を 100  $\mu\text{s}/\text{frame}$  で撮影出来るようになってきている。ここでは 36 ms/frame でのレーザーと DXT を組み合わせた Laser-pump DXT について説明する。

Fig. 3 に Laser-pump DXT 装置を示す。ナノ秒レーザーパルスは X 線の光軸に対して約 20 度程度の角度で照射し, X 線の集光サイズは 400  $\mu\text{m}$  (H)  $\times$  80  $\mu\text{m}$  (V), また X 線照射領域をカバーするように約 1 mm $\phi$  でレーザーパルスを集光した。光トリガーは, ナノ秒 Nd : YAG レーザー (Powerlite 8000, Continuum 社製) の第 3 次高長波である 355 nm, パルス幅 8 ns, 10 Hz 発振のレーザーを用いた。Fig. 4 にナノ秒パルスレーザーと DXT のタイミングチャートを示す。プローブである白色硬 X 線は, ピークエネルギーは 18 keV, エネルギー幅は  $\Delta E/E = 15\%$  の白色 X 線を用いた。DXT におけるミリ秒からサブミリ秒までの測定は, X 線パルスとの同期はせずにパルスレーザーの 10 Hz 信号をマスタークロックとしてナノ結晶のラウエ回折動画を撮影した。パルスレーザーに入れる同期信号である 10 Hz 信号とゲート信号に同期したレーザーシャッターと, CCD の外部トリガーを遅延パルス発生器 (DG535, Oxford 社) により制御することで任意のフレームに 355 nm のレーザーパルスを照射することができる。

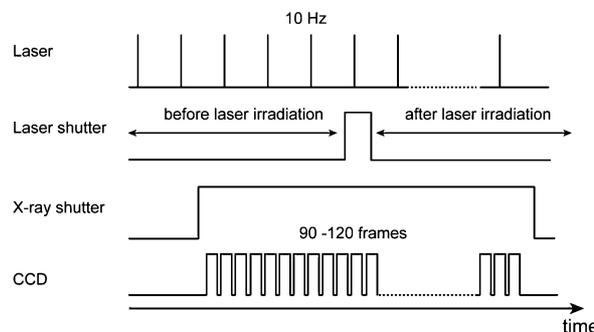
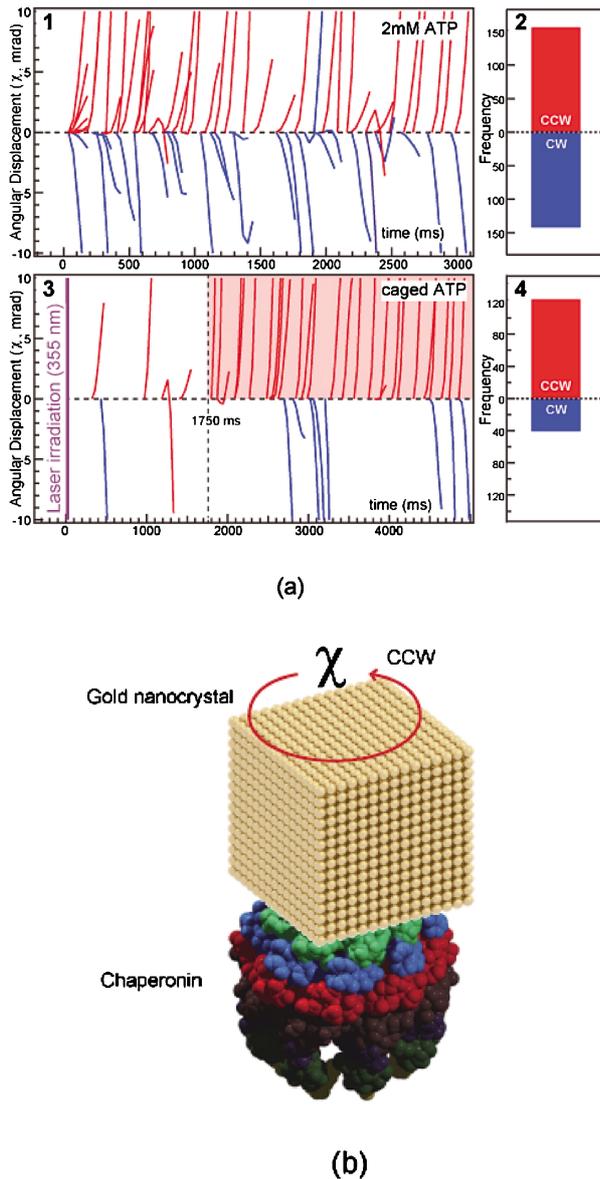


Fig. 4 Timing chart of the synchronization system of laser-pump and DXT measurement.

この Laser-pump DXT による計測法の開発により, 安定的にタンパク質分子のレーザー照射前の分子内部運動と照射後の分子内部運動変化を直接観測し比較することが可能になった。

シャペロニンを変性タンパク質と直接相互作用し, 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構成されたリング構造を, 2 つ背中合わせに重ねた円筒状構造を取る。ATP 依存的なリング構造の開状態から閉状態への構造変化を通して機能することが知られているが, その反応機構は明らかでない。ナノ秒パルスレーザーと量子ビームを組み合わせた Laser-pump DXT と, 紫外線照射により ATP を遊離する Caged-ATP を用いて, II 型シャペロニン分子の ATP 取り込み時の構造変化について直接観測を行った。Fig. 5 (a) に  $\chi$  方向の運動の時間変化を示す。ATP 存在下では  $\chi$  方向の運動が CW と CCW 両方存在していたが, Caged-ATP を用いた場合, 紫外線パルス照射後約 2 秒で CCW 方向にねじれることを示す (Fig. 5 (b))。これらの結果は, シャペロニンリングが, 開状態から閉状態へ移行する際に, 少なくとも 2 つの運動 (ナノ結晶の  $\theta$  および  $\chi$  方向の運動に反映) を経ること, また CCW 方向のねじれ運動

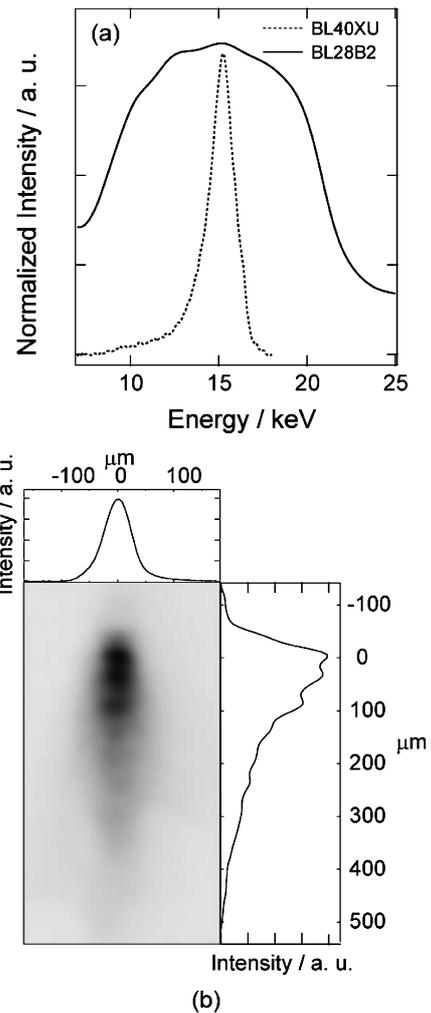


**Fig. 5** (Color online) (a) Rotational position trajectories along  $\chi$  direction are shown as a function of time in the presence of 2 mM ATP (1) and 5 mM caged-ATP after laser pulse irradiation (2). The histogram in 2 and 4 show the frequency of the initial direction, either clockwise (CW) or counterclockwise (CCW), respectively. (b) Schematic illustration of a group II chaperonin attached the gold nanocrystal, which was produced from ref. 11 with modification.

が1分子レベルで明らかになった<sup>11)</sup>。Laser-pump DXTで得られた知見は、ストップフロー蛍光測定といったアンサンブル測定結果と矛盾しない。詳細は文献11)を参照されたい。

#### 4. X線トロイダルミラーを用いた広角度域DXT測定法の開発

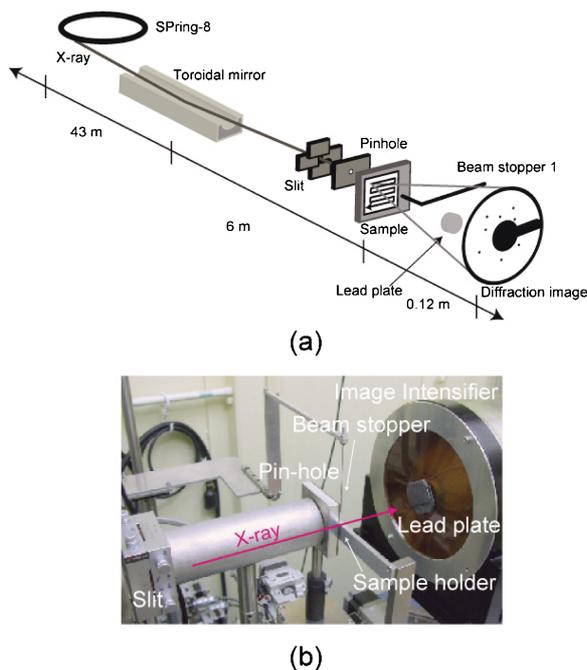
これまで我々のグループは、従来のDXT実験を行うの



**Fig. 6** (a) X-ray spectra measured for the BL28B2 beamline (solid line) and for the BL40XU beamline (dotted line) at the sample position. Intensity of both spectra are normalized. The X-ray signal obtained after focusing the X-ray was measured using a Si X-ray detector (XR-100CR, Seiko EG&G Co., Ltd, Japan). (b) Image of X-ray beam and focusing size at the sample position.

にSPring-8のBL40XUビームラインを主に利用してきた。BL40XUはヘリカルアンジュレーターを設置した高フラックスビームラインである<sup>12)</sup>。エネルギーバンド幅は約 $\Delta E/E = 1.8\%$ であり、回折点を追跡するためにアンジュレーターから得られるスペクトルをエネルギー幅がなるべく広くなるよう調整してDXTに使用してきた (Fig. 6(a))。測定を効率良くするためには、1つのナノ結晶からの回折点を長く追跡するためによりエネルギー幅の広い白色硬X線源を用いることが理想である。

これまでにない広い角度域で回折点追跡が可能な広角度域DXT (wide-angle DXT) の測定装置の立ち上げをSPring-8のBL28B2で行った (Fig. 7(a))。我々は、偏光電磁石を光源とする白色X線ビームラインであるSPring-8のBL28B2<sup>13)</sup>の光学ハッチ2にRh蒸着したSi(111)湾



**Fig. 7** (Color online) (a) Schematic diagram of the wide angle DXT measurement system at the BL28B2 beamline. (b) Photograph of the wide angle DXT measurement system in optical hutch 3 of the BL28B2 beamline.

**Table 1** Parameter of the X-ray source for the BL28B2 with a toroidal mirror and for the BL40XU

Attribute	BL28B2	BL40XU
X-ray energy bandwidth ( $\Delta E/E$ ) (%)	82	12
Width of tracking angle of Au 111 (degree)	14.3–36.9	18.8–21.2
Time Resolution (ms)	1–36	0.005–36
Insertion device	Bending magnet	In-vacuum undulator
Energy range (keV)	>5	8–17

曲円筒型の X 線トロイダルミラーをインストールし、XZ 自動ステージにより光軸に対して横方向と反射角度の調節を行った。また X 線トロイダルミラーからサンプルまでの集光距離は、6 m であるため測定は BL28B2 の光学ハッチ 3 で行った (Fig. 7(b))。偏光電磁石の光源からの白色硬 X 線を X 線トロイダルミラーで集光することで、BL40XU と比べて約 7 倍のエネルギーバンド幅を用いた広角度域 DXT による測定が可能になった (Table 1)。Fig. 6(b) に集光位置における X 線のエネルギースペクトルと集光サイズを示す。ミラーの収差によりサンプル位置での集光サイズは垂直方向に伸びてしまう。そのため下流の X 線スリットにより  $50 \mu\text{m}(\text{H}) \times 100 \mu\text{m}(\text{V})$  程度になるように集光サイズをサンプル位置で調節した。

金ナノ結晶のラウエ回折画像は、イメージインテンシファイア付き CCD 検出器 (浜松ホトニクス社製, V7739P,

C4880-10) によりラウエ回折動画の撮影を行った。本稿で例を上げる HSA 系の広角度域 DXT による測定は、1 フレーム当たり 36 ms で 90 フレームの回折動画測定を行った。

## 5. 回折点の追跡法と 2 軸分子内運動ヒストグラム (HSA と HSA/AC 錯体を例に)

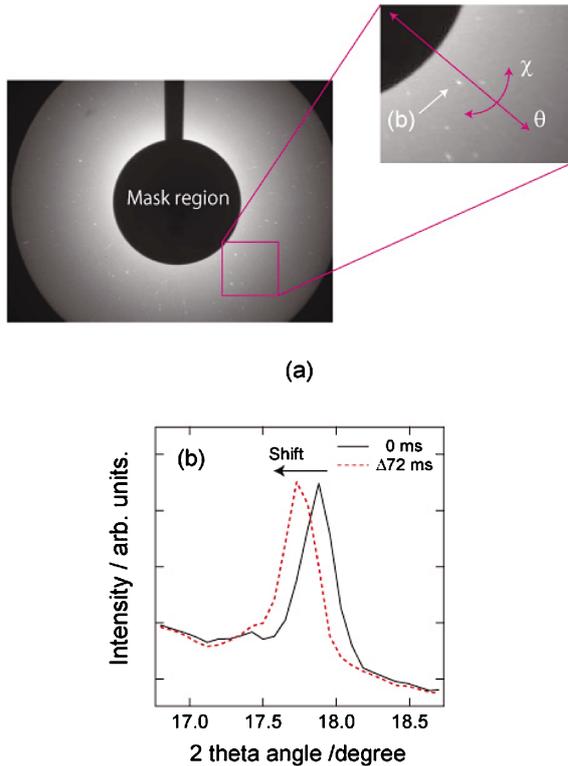
### 5.1 Human serum albumin (HSA) について

輸送タンパク質分子として知られている HSA は、AC と反応し錯体化することが知られている。元来血清アルブミンは、結合サイトである内因性と外因性の各種化合物を包接する複数の独立した疎水性のポケットのような空間を持っている。HSA は疎水性の空間はキラリティーを持ち、そのポケットに入った AC を光によりキラルな AC 二量体を不斉合成することが出来るキラル超分子である<sup>14-17</sup>。ホストとなる生体超分子の安定性などを議論するために、HSA 分子のみと HSA 分子と 10 個の AC 分子を反応させた HSA/AC 錯体の分子内ブラウン運動を広角度域 DXT により比較し両者の分子内部運動の検討を行った。

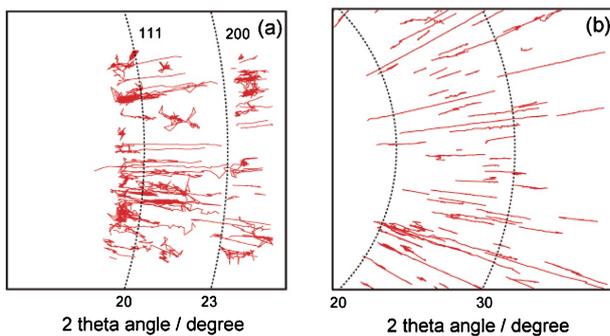
### 5.2 標識した金ナノ結晶の回折点の軌跡解析

典型的な HSA 分子に標識した金ナノ結晶のラウエ回折像を Fig. 8(a) に示す。X 線のダイレクトビーム付近は基板と水の散乱の強度が高いため鉛板によりマスクをしている。金ナノ結晶 {111} の回折点は、タンパク質に対してランダムな方向で標識されており、回折条件に合致したナノ結晶のみが回折点として観測される。追跡する回折点は、 $\theta$  方向と  $\chi$  方向の角移動量やその角加速度、また二つの角度変化の時間相関性を取ることで分子内揺らぎと機能的な分子内部運動を回折ピークの移動距離から算出する (Fig. 8(b))。回折点は、各時間フレームの回折点をガウス関数でフィッティングすることによりその  $\theta$  と  $\chi$  の位置と強度を算出する。その後、各フレームの回折点が軌跡となるよう関連を付ける。

Fig. 9 に HSA 分子に標識した金ナノ結晶の回折点の軌跡を示す。Fig. 9(a) と (b) はそれぞれ BL40XU と BL28B2 を用いた HSA の DXT 測定になる。BL40XU では X 線のエネルギーバンド幅が狭いため金の面心立方格子構造における {111} と {200} の回折ピークが分離することが出来る。BL28B2 では X 線のエネルギーバンド幅が広いいため {111} と {200} は分離出来ないが、回折条件の角度域が検出器の  $2\theta$  方向の測定範囲とほぼ同等であるため、長い時間回折点を追跡することが可能になった。DXT では、どの標識結晶の格子面を観測するかは問題としない。追跡した軌跡を多数解析することで、タンパク質 1 分子の構造変化や揺らぎに伴う金ナノ結晶の時間角度変化のみを抽出し統計的な解析を行う。おおよそ 100 以上の軌跡を追跡し統計的な移動量データとしてその頻度や二つの角の時間相



**Fig. 8** (Color online) (a) Typical diffraction image of gold nanocrystals attached to the surface of a HSA/AC complex. The center of the image is masked using a lead plate to eliminate the X-ray scattering from buffer solution and two polyimide films. Diffraction spots appear randomly in the area detector. (b) The position of each diffraction spot is tracked along the  $\theta$  and  $\chi$  directions using Gaussian function fitting. The diffraction spots from the gold nanocrystals shift over time.

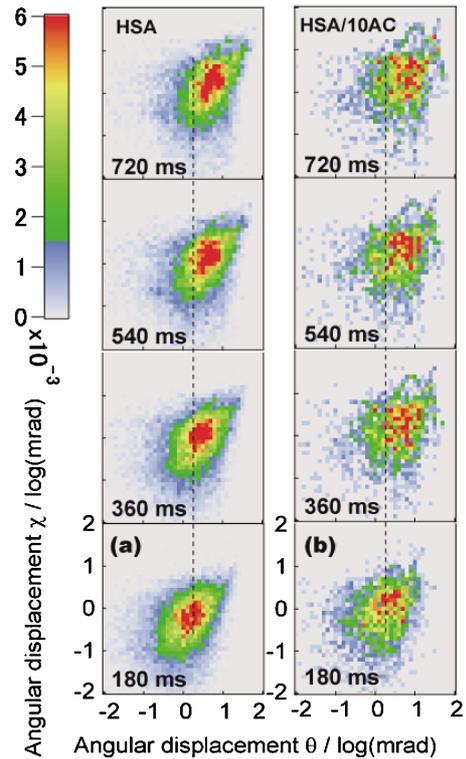


**Fig. 9** (Color online) About 100 trajectories of diffraction spots from the gold nanocrystals attached to the HSA molecules. Diffraction peaks from Au 111 and 200 using the BL40XU (a) and the BL28B2 (b). Frame rate was 36 ms/frame.

関性などを議論した。

### 5.3 時間分解二軸分子内部運動ヒストグラム

これまでの DXT による測定は、カリウムイオンチャンネルである KcsA タンパク質やシャペロニンのように大き



**Fig. 10** (Color online) Two-dimensional histogram of the motion of X-ray diffraction spots from the gold nanocrystals attached to (a) HSA and (b) HSA/AC complex at time interval of 180, 360, 540, and 720 ms in an aqueous buffer solution. The dotted lines are guides showing the peak center at 180 ms. Frequency of each two-dimensional histogram was normalized.

な開閉を伴うタンパク質の動的運動計測に威力を発揮してきた<sup>11,18)</sup>。さらに詳細な分子内の揺らぎ運動を解析するためには  $2\theta$  方向や  $\chi$  方向のどちらか一方の運動に着目するのではなく、両回転軸に対して統計的な解析を加えた時間相関を取ることで、分子内部の揺らぎの中にある複雑な機能的構造変化を抽出することが可能になる。

## 6. 分子内部運動マッピングから見る HSA 分子と HSA/AC 錯体の分子内部運動の比較

Fig. 10(a) と (b) に HSA と HSA/AC 錯体の DXT による測定から得られた 180 ms から 720 ms までの 2 軸分子内部運動ヒストグラムを示す。各軌跡から移動時間毎の  $\theta$  と  $\chi$  の移動角の対数ヒストグラムを取ると、各ヒストグラムとも  $\theta$  方向と  $\chi$  方向について対角線上に相関性があり、その回折移動角が時間と共に増大することが明らかになった。これは DXT から HSA と HSA/AC 錯体の揺らぎを比較した場合、AC 分子が HSA 内外に取り込まれた場合、分子内部の揺らぎの角度変化分布に広がりを持つことが分かる。これは AC 分子が HSA 分子の疎水性のポケットに入ることで HSA のポケットと AC 分子との相互作用

により HSA 分子の全体構造が僅かに柔らかくなったことを示唆している。これらの結果は、各角度軸の平均二乗変位 (Mean Square Displacement: MSD) の時間変化とも良く一致した。X線 1 分子追跡法による 1 分子内運動データの統計的な解析を施すことにより、これまで観測不可能であったタンパク質分子内部の揺らぎ分布について明らかにすることが可能になった<sup>19)</sup>。

## 7. おわりに

DXT の高度化と解析手法について ATP 存在下におけるシャペロニンの回転運動観測や HSA と HSA/AC 錯体の分子内揺らぎ計測の研究を例に挙げて紹介した。DXT は、タンパク質分子内部運動をその場観測する唯一の手法である。本稿で紹介したパルスレーザーと DXT の組み合わせによる詳細な光トリガーによるタンパク質分子内部運動変化や、測定装置の高度化にともなって僅かな構造の違いによる分子内揺らぎの変化をミラジアン精度で観測することが可能になった。また解析手法を工夫により 2 軸 ( $\theta, \chi$ ) の分子内運動ヒストグラムや軌跡解析の精度を向上させ、DXT による計測により揺らぎや複雑な機能的運動を分布図として明確に可視化することが出来るようになった。DXT は X 線構造解析による静的な構造情報と生体内の機能性のかけ橋となる 1 分子動態計測法として今後期待できる。また高度化した DXT の測定装置は、多くのタンパク質の運動性と機能性を明らかにし、正常なタンパク質の運動性と異常なタンパク質の運動性の区別もしくは統計解析に基づいた定量的議論が可能になるであろう。

さらに検出器の高速化に伴い金ナノ結晶の速い回転運動を計測することが可能になってきた。本稿では紹介しなかったが高速化した DXT による計測手法は、単にタンパク質の分子内運動を観測するというだけではなく、感度の良いナノ結晶をマーカーとしてミクロな場の粘性測定、力場計測<sup>20,21)</sup>や、また粒子追跡流速測定 (Particle Tracking Velocimetry) としてマイクロ流路などの流れ計測にも応用することが可能になってくるであろう。

## 謝辞

広角度域 DXT の測定開発は主に SPring-8 の BL28B2 において行われた。X 線トロイダルミラーの設計にご尽力いただいた JASRI の大橋治彦博士、仙波泰徳博士に感謝申し上げます。本研究の BL28B2 における広角度域 DXT 測定にあたり JASRI の梶原堅太郎博士、星野真人博士、八木直人博士にご協力していただいた。また本研究の HSA と HSA/AC 錯体の議論して頂いた大阪大学の井上佳久教授と西嶋正樹助教に感謝申し上げます。また PF-AR の NW14A における Laser-pump DXT の測定開発にあたり協力して頂いた高エネルギー加速器研究機構の足立伸一教授、野澤俊介准教授、佐藤篤志博士、富田文菜

博士に感謝申し上げます。本研究の成果は、SPring-8 の研究課題 (2011A421, 2011B1299, 2012A1399, 2012A1484) と PF の研究課題 (2009G510, 2011G608) によるものである。

## 参考文献

- 1) E. Betzing, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz and H. F. Hess: *Science* **313**, 1642 (2006).
- 2) A. Sharonov and R. M. Hochstrasser: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 18911-18916 (2006).
- 3) A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman and P. R. Selvin: *Science* **300**, 2061 (2003).
- 4) Y. C. Sasaki, Y. Okumura, S. Adachi, H. Suda, Y. Taniguchi and N. Yagi: *Phys. Rev. Lett.* **87**, 248102 (2001).
- 5) Y. C. Sasaki, Y. Suzuki, N. yagi, S. Adachi, M. Ishibashi, H. Suda, K. Toyota and M. Yanagida: *Phys. Rev. E*. **62**, 3843 (2000).
- 6) Y. Okumura, T. Miyazaki, Y. Taniguchi and Y. C. Sasaki: *Thin. Solid. Film* **471**, 91 (2005).
- 7) S. Nozawa, S. Adachi, J. Takahashi, R. Tazaki, L. Guerin, M. Daimon, A. Tomita, T. Sato, M. Chollet, E. Collet, H. Cailleau, S. Yamamoto, K. Tsuchiya, T. Shioya, H. Sasaki, T. Mori, K. Ichiyangi, H. Sawa, H. Kawata and S. Koshihara: *J. Synchrotron. Rad.* **14**, 313 (2007).
- 8) K. Ichiyangi, H. Sekiguchi, S. Nozawa, T. Sato, S. Adachi and Y. C. Sasaki: *Phys. Rev. B* **84**, 024110 (2011).
- 9) A. Tomita, T. Sato, K. Ichiyangi, S. Nozawa, H. Ichikawa, F. Kawai, S.-Y. Park, T. Yamato. S. Koshihara and S. Adachi: *PANS*, **106**, 2612-2616 (2009).
- 10) S. Nozawa, T. Sato, M. Chollet, K. Ichiyangi, A. Tomita, H. Fujii, S. Adachi and S. Koshihara: *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 61 (2010).
- 11) H. Sekiguchi, A. Nakagawa, K. Moriya, K. Makabe, K. Ichiyangi, S. Nozawa, T. Sato, S. Adachi, K. Kuwajima, M. Yohda and Y. C. Sasaki: *PLoS ONE* **8**, e64176 (2013).
- 12) K. Inoue, T. Oka, T. Suzuki, N. Yagi, K. Takeshita, S. Goto and T. Ishikawa: *Nucl. Instrum. Methods. Phys. Res. A* **467**, 674 (2001).
- 13) Y. Chikaura, S. Iida, S. Kawado, K. Mizuno, S. Kimura, J. Matusi, T. Ozaki, T. Shimura, Y. Suzuki, K. Izumi, K. Kawasashi, K. Kajiwara and T. Ishikawa: *J. Phys. D: Appl. Phys.* **34**, A158 (2001).
- 14) T. C. S. Pace, M. Nishijima, T. Wada, Y. Inoue and C. Bohne: *J. Phys. Chem. B* **113**, 10445 (2009).
- 15) M. Nishilima, T. Wada, T. Mori, T. C. S. Pace, C. Bohne and Y. Inoue: *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 3478 (2007).
- 16) M. Nishijima, T. C. S. Pace, A. Nakamura, T. Mori, T. Wada, C. Bohne and Y. Inoue: *J. Org. Chem.* **72**, 2707 (2007).
- 17) D. Feutealba, H. Kato, M. Nishijima, G. Fukuhara, T. Mori, Y. Inoue and C. Bohne: *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 203 (2013).
- 18) H. Shimizu, M. Iwamoto, F. Inoue, T. Konno, Y. C. Sasaki and S. Oiki: *Cell* **132**, 67 (2008).
- 19) K. Ichiyangi, H. Sekiguchi, M. Hoshino, K. Kajiwara, K. Hoshisashi, C. Jae-won, M. Tokue, Y. Matsushita, M. Nishijima, Y. Inoue, Y. Senba, H. Ohashi, N. Ohta, N. Yagi and Y. C. Sasaki: *Rev. Sci. Instru.* **84**, 103701-6 (2013).
- 20) Y. C. Sasaki, T. Higurashi, T. Miyazaki, Y. Okumura and N. Oishi: *Appl. Phys. Lett.* **89**, 053121 (2006).
- 21) N. Ogawa, K. Hoshisashi, H. Sekiguchi, K. Ichiyangi, Y. Matsushita, Y. Hirohata, S. Suzuki, A. Ishikawa and Y. C. Sasaki: *Sci. Rep.* **3**, 2201 (2013).

## 著者紹介

**一柳光平**

東京大学大学院新領域創成科学研究科物質系専攻 助教

E-mail: ichiyana@k.u-tokyo.ac.jp  
(\*kouhei,ichiyana@kek.jp)

専門：放射光科学，1分子計測学，光物性，高压科学

**【略歴】**

2006年3月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後期課程修了。博士（理学）。2006年4月高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所博士研究員，2008年4月JST ERATO 腰原非平衡ダイナミクスプロジェクト研究員，2009年2月東京大学大学院新領域創成科学研究科物質系専攻助教，\*2014年4月より高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所特任准教授。

**佐々木裕次**

東京大学大学院 新領域創成科学研究科物質系専攻 教授

E-mail: ycsasaki@k.u-tokyo.ac.jp

専門：1分子計測学，生物物理学，結晶科学

**【略歴】**

1991年3月東北大学大学院工学研究科博士過程修了。博士（工学）。1991年4月（株）日立製作所基礎研究所研究員，1997年12月高輝度光科学研究センター実験部門副主幹研究員，1998年10月JST さきがけ研究員，2001年10月JST 戦略的基礎研究推進事業「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」領域研究代表，2005年10月JST 戦略的創造研究推進事業「生命現象の解明と応用に資する新しい計測分析基盤技術」領域研究代表，2008年11月より現職。

**関口博史**

高輝度光科学研究センター 利用研究促進部門 研究員

E-mail: sekiguchi@spring8.or.jp

専門：生物物理

**【略歴】**

2004年3月東京工業大学生命理工学研究科博士後期課程修了，博士（理学）。2004年食品総合研究所博士研究員，同年東京工業大学生命理工学研究科助手，2007年から同・助教を経て2009年東京大学大学院新領域創成科学研究科特任助教。2012年より現職。

## Development of Diffracted X-ray Tracking (DXT) for monitoring intramolecular motions in individual protein molecules

**Kouhei ICHIYANAGI** Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, Kashiwa 277-8561, Japan

**Hiroshi SEKIGUCHI** Japan Synchrotron Research institute, Sayo, 679-5198, Japan

**Yuji C. SASAKI** Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, Kashiwa 277-8561, Japan

**Abstract** Diffracted X-ray Tracking (DXT) enables the intramolecular motions of protein molecules to be monitored using a highly brilliant X-ray source with a wide energy bandwidth. This technique uses gold nanocrystals markers combined with a synchrotron X-ray source that has a wide energy bandwidth to probe the tilting and twisting motions of single protein molecules in the solution. Additionally, we have developed the Laser-pump and DXT and wide-angle DXT methods. The laser-pump and DXT method can be monitored the *in situ* single molecular motion change after the laser pulse trigger. Then, the wide-angle DXT method can be tracked many diffraction spots from the individual gold nanocrystal attached to the individual protein molecules using bending magnet beamline at the SPring-8. We reported these experiments in detail and discuss the intramolecular motions of protein.