

トピックス

X線1分子計測法を用いた DNA1分子のブラウン運動計測

奥村 泰章^{1,2}, 佐々木 裕次^{2,3,4}, 八木 直人²
足立 伸一⁵, 谷口 彬雄¹

¹信州大学大学院工学系研究科*

²高輝度光科学研究センター放射光研究所利用促進部門Ⅱ,

³科学技術振興事業団さきがけ研究21, ⁴大阪大学蛋白質研究所,

⁵理化学研究所播磨研究所

Brownian Motions of Single DNA Molecules on the Picometer-Scales Using Diffracted X-ray Tracking (DXT)

Yasuaki OKUMURA^{1,2}, Yuji C. SASAKI^{2,3,4}, Naoto YAGI²,
Shinichi ADACHI⁵ and Yoshio TANIGUCHI¹

¹Graduate School of Science and Technology, Shinshu University,

²Spring-8/JASRI, ³PRESTO, Japan Science and Technology Corporation,

⁴The Institute for Protein Research, Osaka University,

⁵The Institute of Physical and Chemical Research

All biological and chemical reactions are directed intramolecular structural changes. Macro molecular detection methods and crystallography cannot observe time trajectories and reaction pathways of individual molecules in a non-equilibrated system. We demonstrated direct observations of an individual DNA molecule labeled with a nanocrystal with the guidance of x-ray diffracted spots from nanocrystals itself. The new x-ray technique, which we call diffracted x-ray tracking (DXT), monitored Brownian motions of the single DNA molecule in real time and space. In this study, we confirmed that the detection limit of DXT is ~pm level.

1. はじめに

生命現象を分子レベルで理解するためには、静的なタンパク質分子の構造情報や、動的な機能発現メカニズムの解明が必要不可欠である。現在、放射光、NMRそして1分子可視化等、様々な手法を用い、上記の研究が活発に行われている。特に、動的情報は多分子系から得られる平均的情報の解析では制限があるために、1分子が有する動的特性を正確に計測・解析することが重要となる。可視領域の蛍光1分子法¹⁻⁶⁾は、全く新規の研究分野を創出し、1分子を直視・操作・計測するという偉業を成し遂げた。例を示せば、アクチンフィラメント上において、モーター系タンパク質であるミオシン1分子の運動をnmレベルで計測

可能にした等が挙げられる。しかし、上記に示す、現状の方法論では、特定の分子の移動や、分子間相互作用等は計測できるが、肝心の分子内構造変化計測は困難となる。なぜなら、様々な分子の機能発現時における分子内構造変化を1分子で計測するために必要な位置決定精度が、可視領域における蛍光の波長の限界を超えるからである。そのため、従来の1分子法では、本研究が目的とする、生体・機能性1分子の特定環境下における分子内動的構造変化実時間計測は不可能となる。

そこで、我々は可視域のプロープより二桁以上短いX線(~0.1nm)を用い、従来の1分子計測法とは全く異なる方法論である、X線1分子計測法(Diffracted X-ray

* 所属：信州大学大学院工学系研究科

現在の連絡先：高輝度光科学研究センター利用研究促進部門Ⅱ生物・医学グループ 〒679-5198 兵庫県佐用郡三日月町光都1-1-1
TEL: 0791-58-0802 (EXT.3940) FAX: 0791-58-2521 E-mail: oku@spring8.or.jp

Tracking (回折 X 線追跡法): DXT) を考案することにより、生体・機能性分子が有する機能発現 (分子内構造変化) を \sim pm (1/1000 nm) の精度で実時間計測することに成功した。

本稿では、X 線 1 分子計測法を用い、現在非常に注目されている分子の一つである DNA の、水溶液条件下における分子揺らぎ (ブラウン運動) 計測について報告する。DNA は、国際プロジェクトである全ゲノム解析計画 (Structural Genomics) においてその重要性が特に再認識されており、また塩基数・塩基種の設計・合成が比較的容易に行えるため、任意にその分子長を決定することが可能である。従って、本計測法の原理実験として、塩基数・塩基種の異なる DNA 分子を用いることにした。

更に、現在進行しているポストゲノム (functional genomics) 計画においては、ゲノム上にある遺伝子部分の機能解明、また遺伝子情報により合成されるタンパク質分子の構造及び機能解析が重要となる。本稿に示す、X 線 1 分子計測法は、特定分子が有する動的情報を 1 分子で、且つ他の計測法では不可能な pm オーダーの実時間計測が可能であるため、上記国際プロジェクトにおいても、大きく貢献するだろう。

2. X 線 1 分子計測法の原理

X 線 1 分子計測法の概念図を Figure 1 に示す。X 線 1 分子計測法とは、まずナノ結晶を目的 1 分子にその機能活性を損なわないように化学修飾する。次に X 線を照射することによりナノ結晶からの回折 X 線スポットが得られ、このスポットを指標に目的 1 分子のダイナミクスを ms オーダーで時分割トレースする計測法である。

本計測法を実現するためには、以下の 3 つの条件を満たさなければならなかった。

- i) ms 以下での高速追跡を可能にするための高輝度 X 線光源
- ii) あらゆる入射角において回折 X 線斑点を連続的に得るための白色 X 線
- iii) 1 結晶体からの高強度の信号

まず、i), ii) については大型放射光施設 SPring-8 の構造生物学 II ビームライン BL44B2 の白色 X 線を利用す

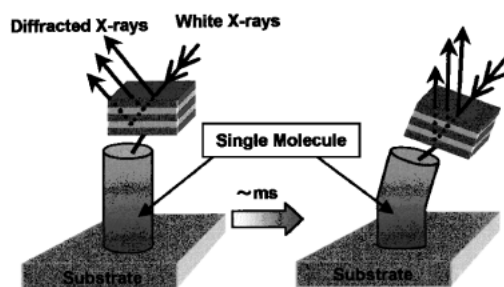


Figure 1. Principle of Diffracted X-ray Tracking (DXT).

ることにより実現した。本計測法が白色 X 線を利用する理由は、目的分子のダイナミクスを時分割トレースすることにある。つまり、回折 X 線斑点を得るためには (2-1) 式に示す Bragg の反射条件を充たす必要があるが、ナノ結晶は目的 1 分子に連動して常に動いているため、X 線の入射角 θ は $\theta_1, \theta_2, \theta_3 \dots$ と時々刻々と変化する。そのため、 θ に対応した入射 X 線の波長 λ ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3 \dots$) が必要となる。

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad \text{<Bragg 条件>} \quad (2-1)$$

d: 格子面間隔, θ : X 線の入射角, λ : 入射 X 線の波長

iii) については、周期構造体 (例えば結晶体) からの反射された X 線が互いに干渉することにより高強度の信号を得ることができる X 線回折の利用、更には X 線 2 次元検出器 (Image Intensifier と CCD Camera の組み合わせ) により X 線回折斑点の高感度検出を実現する。さらに、試料環境下において X 線を回折するような結晶状態で存在する物質が存在しない場合は、非常に低バックグラウンドが実現する。

上記条件を満たし実現した X 線 1 分子計測法は、4 つの大きな特徴を有する。

- ① 波長が短い X 線を用いることにより、目的 1 分子の pm レベル・数 mrad の極微な分子内構造変化計測が可能。
- ② 高輝度 X 線を用いることによる数 ms 以下での高速計測が可能。
- ③ 溶液・溶媒中、更には *in-vivo* 計測が可能。
- ④ 数十 nm ~ 数 pm の幅広いダイナミックレンジ実現。

特に④に示した特徴については、本研究により作製を試みている三次元ナノ結晶と、一次元ナノ結晶を使い分けることで、実現する。つまり、使用する X 線エネルギーが 7~30 keV のとき、三次元ナノ結晶は、金属ナノ結晶 (d-space = \sim 0.1 nm) を用いるため、回折角 (2θ) は数 10 度と非常に高角度を示す。従って、数 10 nm ~ 数 nm のダイナミクス計測が可能となる。また、一次元ナノ結晶は、スパッタリングにより作製した多層膜 (d-space = 数 nm) に微細加工を施すことにより作製するため、その回折角 (2θ) は数度以下と非常に小さくなる。従って、計測された回折斑点から、数 nm ~ 数 pm オーダーのダイナミクスを非常に高精度で計測可能にする。

このように、従来の方法論では全く計測不可能であった様々な現象を計測可能にする X 線 1 分子計測法は、1 分子の動きとその機能の相関を解析できる現在唯一の計測手段であると言える。

3. 実験 (DNA 1 分子の分子揺らぎ計測)

本実験で用いた、DNA は 18 塩基と 36 塩基の 2 種である。18 塩基における塩基配列は、5' にチオール基を導入した

5'-SH-CAGTCAGGCAGTCAGTCA-3' と、それに相補的であり、5' にアミノ基を導入した 5'-NH₂-TGACTGAC TGCCTGACTG-3' である。また36塩基においては、18塩基と同様5' にチオール基を導入した 5'-SH-CTTGAC-TA GTCCTTGAGCAGTCAGGCAGTCAGTCA-3' と、それに相補的で5' にアミノ基を導入した 5'-NH₂-TGAC-TGACTGC CTGACTGCTCAAGGACTAGTGCAAG-3' を用いた。また、ナノ結晶としては、数 nm ~ 数 pm のダイナミクス計測を可能にする Mo/Si 多層膜ナノ結晶 (直径25 nm) を用いた。

3.1 一次元 (Mo/Si 多層膜) ナノ結晶の作製法

X 線 1 分子計測法 (DXT) を実現可能にした最も大きな要因の一つに、目的分子に直接ラベルするナノ結晶の作製が挙げられる。ナノ結晶は、目的 1 分子にラベルするため、非常に微小で、且つ X 線回折現象を発生させるための高い結晶性を必要とする。そこで、最初に我々が着目したナノ結晶は、現在では数 nm での作製が可能である Au コロイドであった。しかし、結晶性は期待するほどに良くなく、X 線回折現象を示すほどの結晶性を有していないことが分かった。そこで、本研究では三次元結晶 (Au ナノ結晶) と、一次元結晶 (Mo/Si 多層膜ナノ結晶) の二種の異なるナノ結晶を、従来とは全く異なる観点から作製を行っている。特に本稿では、本実験に用いた一次元ナノ結晶の作製法について示す (Figure 2)。まず、基板の上に水溶性である PVA (polyvinylalcohol) 層をコートする。次に高反射率多層膜構造をマグネトロンスパッタリングにより作製する。このとき、Mo/Si 多層膜の周期構造は、膜厚比が Si : Mo = 5 : 2, d-space = 5 nm, そして多層膜全膜厚 = 11.4 nm (2.5 周期) である。次に、ナノ結晶を目的 1 分子に特異的に化学修飾させる目的で、Au 層を抵抗加熱により蒸着し、直径40 nm の SiO₂ ビーズを基

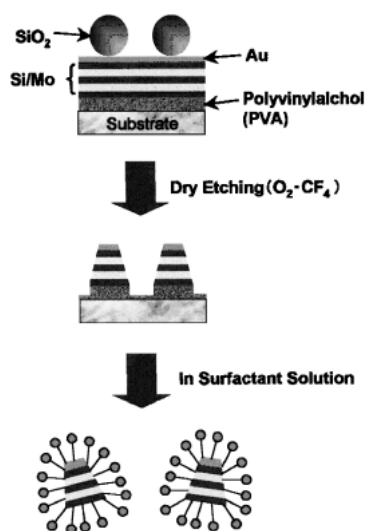


Figure 2. Fabrication of one-dimensional nanocrystals.

板上に塗布する。そして、Reactive Ion Etching (RIE) を用い微細加工を施した後、水溶液中に浸すことにより水溶性である PVA を溶解させ、基板から一次元ナノ結晶を剥離させる。多層膜ナノ結晶の剥離で、最も注意すべき点は多層膜ナノ結晶の凝集効果である。そこで、PVA 溶解液として界面活性剤である CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl) dimethyl-ammonio]propanesulfonic acid) (25 mM) 溶液を使用した。界面活性剤は疎水部に相互作用し水相に可溶化させる機能を持つため、結晶表面で疎水結合し、その立体障害により凝集を抑制する機能を有する。基板から多層膜ナノ結晶を剥離後、この溶液には PVA が溶解しているため CHAPS (25 mM) 溶液で透析を行い、安定な多層膜ナノ結晶水溶液が完成する。

現在のところ、Mo/Si 多層膜の微細加工、ナノ結晶状態での高反射率の確保等を考慮し、最終的に直径25 nm の高反射率多層膜ナノ結晶の作製に成功している。

3.2 DNA 分子の基板配列

DXT は、目的 1 分子に化学修飾したナノ結晶からの回折斑点を時分割トレースすることにより、そのダイナミクスを pm オーダーの非常に高い精度で計測する全く新しい 1 分子計測法である。そのため、基板への目的分子の修飾、及び目的分子へのナノ結晶の修飾は、よりタイトに行う必要がある。そこで、Figure 3 に示すように、DNA の 5' に導入したアミノ基と、ガラス基板表面に蒸着した Au 層とを、架橋材である N-succinimidyl 3-(2-pyridyl-dithio)propionate (SPDP) を用いて反応させ、DNA 分子

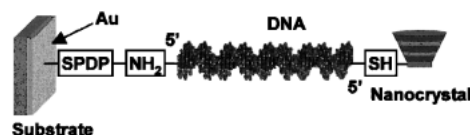


Figure 3. Molecular arrangement of DNA on the substrate.

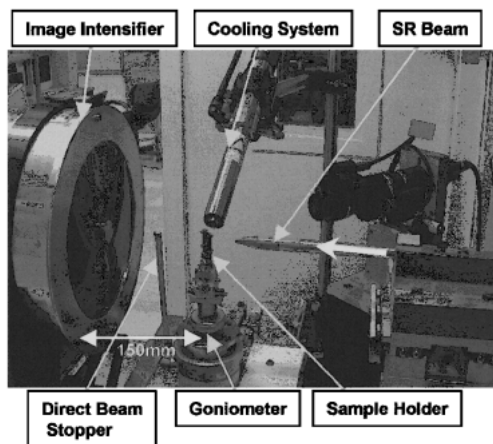


Figure 4. Instrumentation.

を希薄に基板上に吸着させた。

3.3 DNA への多層膜ナノ結晶の修飾

多層膜ナノ結晶と DNA の化学修飾は、DNA の 5' に導入したチオール基と多層膜ナノ結晶に導入した Au の共有結合を利用した。そのため、DNA と多層膜ナノ結晶は、ダイレクトに、且つ非常に強固な結合となる⁷⁾。

3.4 装置構成

作製した多層膜ナノ結晶からの X 線回折斑点の観測は、SPRING-8 のビームライン BL44B2 を利用した。BL44B2 から得られる X 線は波長 = 0.04 nm ~ 0.21 nm (7-30 keV)、ビーム径 = 200 μ × 200 μ、Photon Flux = 10¹⁵ photons/sec/mm² である。Figure 4 に、本実験で用いた装置、及びその装置構成について示す。BL44B2 から得られる白色 X 線が多層膜ナノ結晶に照射され、その回折斑点を 150 mm 後方に設置した X 線 Image Intensifier (I.I.) によりモニターする。さらに、X 線のダイレクトビームを遮断するための Direct Beam Stopper、サンプルの温度を任意に決定できる Cooling System、そしてサンプルの位置を移動させることにより、X 線の照射位置を変えるため Goniometer を使用した。

3.5 解析法

個々の分子のブラウン運動は、様々な 1 分子計測法により直接観測が行われ、(3-1)式に示す Einstein-Stokes の定理により、分子の拡散運動と顕微的な粘性が関係付けられている⁸⁻¹¹⁾。

$$D = kT/6\pi\eta r' \quad (\text{Einstein-Stokes}) \quad (3-1)$$

D : Diffusion Constant	(m ² /s)
k : Boltzman's Constant	(1.38 × 10 ⁻²³ J/K)
T : Temperature	(K)
η : Solvent Viscosity	(Pa·s)
r' : Molecular Radius	(m)

特に、蛍光 1 分子計測法の場合では、拡散定数である D 値は、個々の 1 分子蛍光シグナルからの 2 次元軌道もしくは、3 次元軌道をモニターすることにより決定している。その点、DXT は個々の分子の位置をモニターすることは不可能であるが、ナノ結晶からの X 線回折斑点により、個々の分子の回転運動を高感度に検出可能である。そこで、DXT により観測可能である回転運動を 2 次元表面の並進運動として捉えることにより、(3-1)式を利用し解析を行った。

2 次元運動における拡散定数 D は、 $D = (\Delta z^2)/(4\Delta t)$ で表すことができる^{12,13)}。このとき、 Δz^2 はタイムラグ $\Delta t = (t_i - t_j)$ における変位二乗平均 (Mean Square Displacement: MSD) であり、また、 Δz^2 は $(\Delta z^2) = (1/$

$\sum_{\Delta t = (t_i - t_j)} \sum_{\Delta t = (t_i - t_j)} (z_{(t_i)} - z_{(t_j)})^2$ と表すことができる。また、DXT により観測可能な回転運動を、二次元の並進運動として捉えたとき、観測した回折角 $\Delta\theta$ と変位二乗平均である Δz^2 との関係は、(3-2)式で表すことができる。

$$(\Delta\theta)^2 r^2 = \Delta z^2 \quad (3-2)$$

このとき r は基板から多層膜ナノ結晶の距離を指す。従って、DXT から得られた $\Delta\theta$ から二次元運動の拡散定数である D 値が決定可能となり、(3-1)式から、(3-3)式で表すことができる。

$$D = (\Delta\theta)^2 r^2 / (4\Delta t) = kT/6\pi\eta r' \quad (3-3)$$

このとき、r' は分子半径であり、r は基板からナノ結晶の距離である。Stokes の定理において、分子半径 r' を有する拡散分子は溶液条件下でフリーな状態であるとみなしている。しかし、本計測法においてナノ結晶、及び DNA は固定されている。そのため、Navier-Stokes の定理により、分子半径である r' は基板からナノ結晶の中心距離 r とみなしている。従って、DXT により計測した回転運動から、拡散定数 D' は(3-4)式で表すことができる。

$$D' = 4 kT/6\pi\eta r^3 \quad (3-4)$$

D' : Diffusion Constant	(mrad ² /s)
k : Boltzman's Constant	(1.38 × 10 ⁻²³ J/K)
T : Temperature	(K)
η : Solvent Viscosity	(Pa·s)
r : Distance from Substrate to Center of Nanocrystal	(m)

また、ナノ結晶から得られた X 線回折斑点を、上記に示すように 2 次元の並進運動として捉え、タイムラグ (Δt) における平均 MSD ($(\Delta\theta)^2$) 曲線 ($(\Delta\theta)^2 - \Delta t$) を描いたとき、その運動モードが決定可能であることが知ら

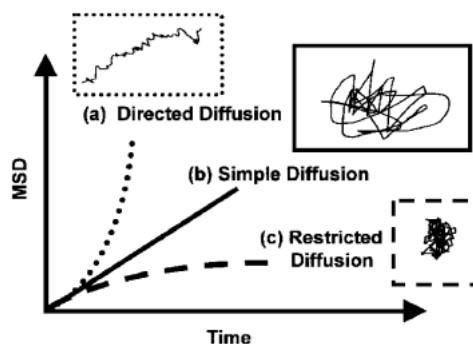


Figure 5. Determination of Brownian motion's mode by mean square displacement curve.

れている^{12,13})。Figure 5 に 3 つの異なるダイナミクスによる $(\Delta\theta)^2 - \Delta t$ の変化を示す。

純粋なブラウン運動の場合、 $(\Delta\theta)^2 - \Delta t$ のグラフは、Simple Diffusion Mode として知られ、傾き $4D$ をもつ直線が得られる。このとき、 D は二次元の拡散定数であるため、(3-5)式で表すことができる。

$$(\Delta\theta)^2 r^2 = 4D(\Delta t) \quad (3-5)$$

そして、 $(\Delta\theta)^2 - \Delta t$ のグラフが、Parabolic であるとき、そのグラフは Directed Diffusion Mode として知られ、(3-6)式で表すことができる。

$$(\Delta\theta)^2 r^2 = 4D(\Delta t) + v^2(\Delta t)^2 \quad (3-6)$$

これは、拡散分子が拡散係数 D を有し、さらに一定の速度 v でブラウン運動していることを示す。

また、 $(\Delta\theta)^2 - \Delta t$ のグラフが Saturation を持つグラフであるとき、そのグラフは、Restricted Diffusion Mode として知られている。このとき、(3-7)式で表すことができる。

$$(\Delta\theta)^2 r^2 = (r_c^2) [1 - A_1 \exp(-4A_2 \Delta t / (r_c^2))] \quad (3-7)$$

このとき、 (r_c^2) は拘束範囲を示し、また A_1, A_2 は拘束の形状による定数である。つまり、DXT から得られた MSD 曲線 $((\Delta\theta)^2 - \Delta t)$ から、上記(3-5)、(3-6)、(3-7)式を用い Curve Fitting を行うことにより、それぞれのブラウン運動によるダイナミクスの詳細を知ることが可能となる。

4. 結果と考察

4.1 実験結果

Figure 6 に DNA18塩基からの回折斑点の移動を示す。この図に示す回折斑点の移動は76 ms 間隔であり、水溶液状態での分子揺らぎの速度は、 $2\theta/s = 190$ mrad/s である。つまり、DNA18塩基の分子長は約6.0 nm であるため、(3-2)式により $\Delta z/s = 0.57$ nm/s であることを示した。

Figure 7 は DNA36塩基 (12 nm) から得られた76 ms 間隔の回折斑点の移動を示す。36塩基における水溶液中での分子揺らぎの速度は、 $2\theta/s = 14$ mrad であり、 $\Delta z/s = 0.17$ nm/s を示した。

4.2 解析結果

Figure 8(a) に DNA18塩基から得られた回折斑点約50 スポットから、 χ^2 fitting¹⁴⁾ (Directed Diffusion Mode: $(\Delta\theta)^2 r^2 = 4D(\Delta t) + v^2(\Delta t)^2$) を行った。その結果、拡散定数 $D_{18bp} = 95$ mrad²/s、流体速度 $v_{18bp} = 0.69$ mrad/s を有する Parabolic であることが分かった。しかし、 v_{18bp} 値

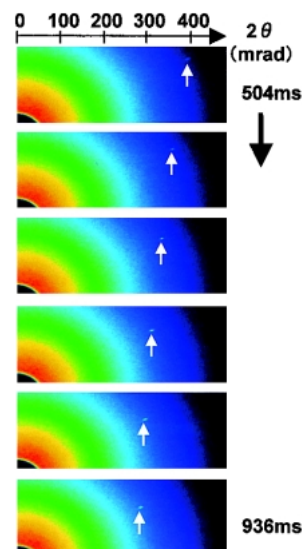


Figure 6. Tracing of diffracted spots for DNA 18 base pairs.

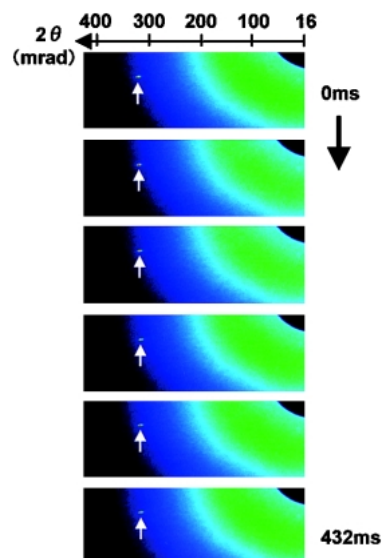


Figure 7. Tracing of diffracted spots for DNA 36 base pairs.

が極微小であることから、得られた MSD 曲線はほぼ直線と考えて良いことが分かる。つまり、DNA18塩基の分子揺らぎは $\Delta z/s = 0.57$ nm/s の速度でほぼ純粋なブラウン運動であるとみなせる。

また、Figure 8(b) に得られた回折斑点約40 スポットから χ^2 fitting (Restricted Diffusion Mode: $(\Delta\theta)^2 r^2 = (r_c^2) [1 - A_1 \exp(-4A_2 \Delta t / (r_c^2))]$) を行った。その結果、DNA36塩基の分子揺らぎは、拡散定数 $D_{36bp} = 15.3$ mrad²/s を有し、また拘束範囲 $(r_c^2)_{36bp} = 97$ mrad² = 0.14 nm² の非常に限られた空間内で拘束されたブラウン運動であることが分かった。特に、上記に示した拡散定数に関しては、分子長が2倍であることから、(3-4)式より、拡散定数は1/8倍となると予想されていた。この値は、 χ^2 fitting により得

られた実験結果とはほぼ一致した。

また、上記に示すように、DNAの分子長による運動モードの違いに関しては、基板上修飾状態を考察することが必要となるだろう。つまり、18塩基では **Figure 9(a)** に示すように純粋なブラウン運動が可能な空間を有し基板上に修飾されるのに対し、より塩基数の長い36塩基では、**Figure 9(b)** に示すように Packing された状態で基板上に修飾されたため、拘束されたブラウン運動を示したものと考察される。有機系の分野において自己組織化膜 (Self-Assemble Monolayer: SAM) は側鎖が長い場合、より Packing 状態となり基板上に修飾可能であることが知られている^{15,16)}。つまり、DNAにおいても同様の現象が確認されたことになる。

次に、今回使用したシステムの検出限界について示す。DXTの位置決定精度は、目的1分子に化学修飾したナノ結晶からの回折角 ($\Delta\theta$) にのみ依存する。そして、本研究において得られた回折斑点は、検出器であるX線 I.Iの1 pixelの位置決定精度で検出可能であることを示した。このとき、X線 I.Iと試料位置の間隔は150 mmであり、また用いたX線 I.Iの1 pixelのサイズは、0.23 mmである。従って、 $\Delta\theta_{\text{limit}}$ は $\tan \Delta 2\theta_{\text{limit}} = 0.23/150$ より、0.75 mradである。つまり、検出限界 Δz_{limit} は $\Delta z_{\text{limit}} = 0.75 \times 10^{-3} r$ であることを示した。ここで、 r は分子長であるため、例えばDNA18塩基 (6.0 nm) における検出限界は

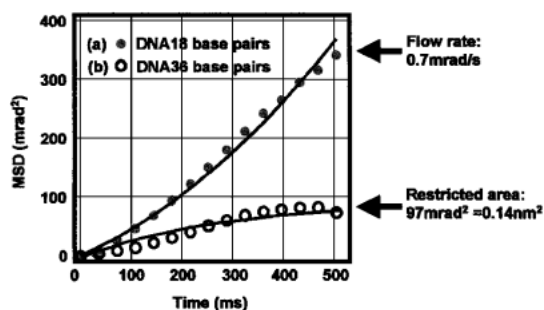


Figure 8. Result of analysis: Mean square displacement curve and χ^2 fitting.

4.5 pm となる。

上記に示した検出限界を波長特性の観点から可視領域の蛍光1分子計測法と比較してみる。可視領域の蛍光波長 (λ) を用いた1分子計測法では、その位置決定精度が、光学的回折限界 (分解能: $\lambda/2$) よりはるかに高い $\sim \lambda/100$ を実現した¹⁷⁾。従って、X線の波長 ($\lambda_{\text{X-ray}} = \sim 0.1 \text{ nm}$) を用いるDXTの場合も同様に、 $\lambda_{\text{X-ray}}/100$ 程度の位置決定精度が得られると予想できる。上記考察は、本実験結果と一致し、本計測法が pm オーダーの位置決定精度を有することが可視域の1分子計測の比較からも矛盾していないことが分かる。

5. 今後の展開

現在確立されている可視領域の蛍光1分子計測法を用いて、多くの生体分子の機能が解明・発見されている。そして、優れた機能を有する生体分子を他の分野へ応用しようとする試みも実際に行われ始めている。生体工学、電子工学の分野では、生体分子の優れた機能、及びより高い耐久性を示す生体模倣分子 (Biomimetics) を作製し、実際に生体内の生体分子との置き換え、及び新規エレクトロニクス分子の作製が期待されている。そのため、Biomimetics分子の作製は、様々な生体分子の機能を把握すると同時に、Biomimetics分子の主成分と考えられる有機系分子の機能をも解明する必要がある。しかし、これまで有機系分子を1分子レベルのオーダーで機能解明する計測法は存在しなかった。そこで、今後はX線1分子計測法 (DXT) の有機系低分子への展開も試みる。

ただし、そのためには一つの大きな問題を解決する必要がある。それは、本計測法において重要であるナノ結晶の作製である。目的1分子の運動を空間的に占領することなく、無標識に近い状態での計測が本研究の理想であるので、ラベルするナノ結晶を最小限の大きさにまでする必要がある。現在のところ本研究により実現しているナノ結晶の最小直径は20 nmであるが、本システム系における現実的最小直径は5 nmである。このサイズでX線回折斑点を検出できる高い結晶性を持たせ、さらには溶液条件で安定

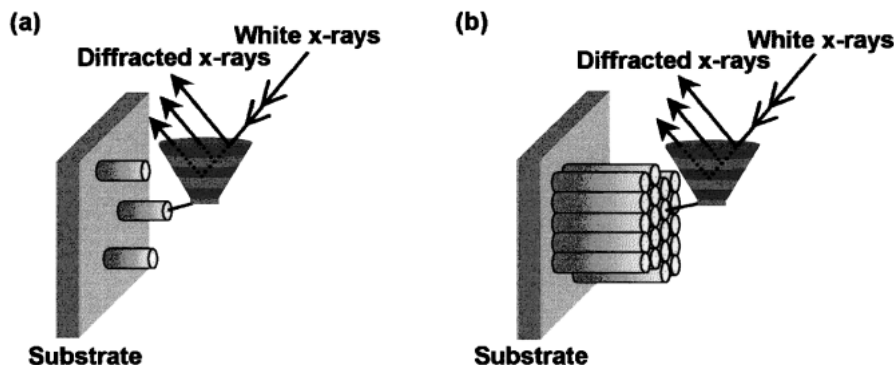


Figure 9. Models of molecular arrangement.

に存在する技術が確立すれば、DXTの可能性は格段に向上するだろう。

6. まとめ

本稿で紹介したX線1分子計測法の歴史はまだ浅く、ようやく原理実験に成功したところである。しかし、現在ではその測定系として、ミオシン、アクチン、更には分子シャペロンGroEL・ES系等を用い、急速に成果が出始めている。X線1分子計測法は、まだ改良・開発すべき点はいくつか残されてはいるが、近い将来、生命科学、分子科学の動的情報を得るための中心的方法論に発展する可能性を秘めている。

謝辞

本研究は、X線1分子計測法の考案者である佐々木裕次博士 (SPring-8/JASRI) との共同研究によるものである。また、本研究をSPring-8/BL44B2ビームラインで行うにあたり、多くのサポートを頂いた足立伸一博士 (理化学研究所)、八木直人博士 (SPring-8/JASRI)、更にナノ結晶の作製において多くのご助言を頂いた谷口彬雄教授 (信州大学) に心から感謝いたします。

参考文献

- 1) A. Ishijima, T. Doi, K. Sakurada and T. Yanagida: *Nature* **352**, 301 (1991).
- 2) R. D. Vale et al.: *Nature* **380**, 451 (1996).
- 3) R. M. Dickson, D. J. Norris, Y. L. Tzeng and W. E. Moerner: *Science* **274**, 966 (1996).
- 4) T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito and T. Yanagida: *Nature* **374**, 555 (1995).
- 5) A. Kishino and T. Yanagida: *Nature* **334**, 74 (1988).
- 6) K. Kitamura, M. Tokunaga, H. A. Iwano and T. Yanagida: *Biophys. J.* **74**, A265 (1998).
- 7) Y. C. Sasaki, K. Yasuda, Y. Suzuki, T. Ishibashi, I. Satoh, Y. Fujiki and S. Ishiwata: *Biophys. J.* **72**, 1842 (1997).
- 8) Y. C. Sasaki, Y. Suzuki, N. Yagi, S. Adachi, M. Ishibashi, H. Suda, K. Toyota and M. Yanagihara: *Phys. Rev. B* **62**, 3843 (2000).
- 9) Th. Schmidt et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2926 (1996).
- 10) R. M. Dickson, D. J. Norris, Y. Tzeng and W. E. Moerner: *Science* **274**, 966 (1996).
- 11) J. Gelles, B. J. Schnapp and M. P. Sheetz: *Nature* **331**, 450 (1988).
- 12) H. Qian, M. O. Sheetz and E. L. Elson: *Biophys. J.* **60**, 910 (1991).
- 13) A. Kusumi, Y. Sato and M. Yamamoto: *Biophys. J.* **65**, 2021 (1993).
- 14) P. R. Bevington: 'Data Reduction and Error Analysis for the Physical Science', McGraw-Hill Book Company (1969).
- 15) P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G. M. Whitesides and P. E. Laibinis: *J. Phys. Chem. B* **102**, 426-436 (1998).
- 16) R. J. Jackman, D. C. Duffy, E. Ostumi, N. D. Willmore and G. M. Whitesides: *Anal. Chem.* **70**, 2280-2287 (1998).
- 17) R. D. Vale, T. Funatsu, D. W. Pierce, L. Romberg, Y. Harada and T. Yanagida: *Nature* **380**, 451 (1996).