

ナノ結晶をプローブとした X 線 1 分子計測法

佐々木裕次 勸高輝度光科学研究センター 生物医学グループ 科学技術振興機構
 戦略的創造研究推進事業 佐々木チーム 〒679-5198 兵庫県佐用郡三日月町光都 1-1-1

要旨 生理条件下での *in vivo* 1 分子計測は分子生物学において非常に重要な情報を得ることのできる究極的計測手段である。しかし、可視光を利用する高感度 1 分子計測である 1 分子蛍光共鳴エネルギー移動法でさえも、分子内の微小な構造変化をモニターすることは難しい。ここでは X 線を用いた 1 分子計測法による DNA 分子や他の生体分子、特に膜タンパク質分子の分子内構造変化の測定例を示す。例としてバクテリオロドプシン (bR) の 35 番アミノ酸残基の運動結果を紹介する。測定の結果、 $0.73 \pm 0.48 \text{ \AA}$ という高精度の構造変化を計測することができた。計測された瞬間的な構造ジャンプは、通常のブラウン運動の 14 倍の分子揺らぎ幅に相当した。この変化はすでに解析されている bR の 3 次元構造情報から類推される構造変化時の 35 番アミノ酸残基の変位量と一致するものであった。このような結果が得られたことは、膜タンパク質の *in vivo* 動的 1 分子計測へ向けての重要な 1 歩と言える。

1. 1 分子が注目され始めた

生命現象を解析する上で、関与する機能性生体 1 分子の挙動を *in vivo* 環境下で Å 精度の計測をしたいと考えることは極めて当然である。生命科学が取り扱う現象すべてが、分子レベルで発現し分子レベルで解釈される。所謂、生物学が分類学や生物化学から分子生物学に躍進した 20 世紀初頭において 1 分子の重要性は再認識されたと言える。しかし、分子生物学の登場から半世紀も経った後に 1 分子計測は登場した。なぜなら、計測手段は多くの要因が重なって発展する分野であり、発想だけで実現できる分野ではないからである。光源系、検出系、標識法、分析検出手法、そして試料調製手法と多くの分野の発展がなければ 1 分子検出は実現できなかった。1 分子計測の歴史が、可視光領域の光を用いた計測法から始まったのも、高強度の光源と極めて感度の良い検出器があったからである。

可視光を用いた 1 分子計測の歴史は、企業分光学者 T. Hirschfeld¹⁾によって 1970 年初頭に始まった。そして生体分子に蛍光分子を標識して分子運動観察をする研究が 10 年後の 1980 年初頭に日本において行われた²⁻⁴⁾。このように T. Hirschfeld の研究成果以来、この研究を純粋な分析分光学の成果としてではなく、生物系でも利用価値のある成果として認識するのに 10 年もの時間がかかったのは意外である。つまり、生体分子の機能解析に 1 分子計測が極めて明確な回答を得る唯一の方法であるという点を意識するのに時間を費やさなければならなかった⁴⁾。ただ 1 分子を計測するのではなく、生体系の機能の根幹を理解するための方法として 1 分子計測が再認識されて実際に利用され始めた。現在は、多くの分野を巻き込んで 1 分子計

測学という分野が独立に成立し始めている。

1990 年代前半までの 1 分子計測では、1 分子の機能に重要な情報を確かに得てはいたが、1 分子の蛍光強度を高精度に計測して得られたデータは少なかった。それが一変したのが、船津らの ATP 1 分子計測である⁵⁾。まさに蛍光 1 分子を検出して、機能性生体分子のメカニズム解析に役立てた最初の論文と言って良い。その後、多くの類似の研究がなされ⁶⁻⁹⁾、現在では目的に合致した標識法が確立された。例えば、高速の時系列データが必要な場合は、1 分子蛍光に拘ることはなく、目的生体分子の機能を損なうことのないように多くの蛍光分子を目的分子周辺に標識する。また、構造変化及び分子移動を詳細に計測したい場合は、1 分子の蛍光中心位置をゆっくりと計測する。このように 1 分子の機能解析が目的なので、1 分子の蛍光分子をモニターすることに固執することなく、色々な状態での 1 分子機能計測が今の 1 分子計測の流れであり、その流れは生物の機能解析の一手段として 1 分子計測を考えた場合、正しい判断と言える。闇雲に 1 分子を検出する事に価値を見いだすのは、生物物理学の研究ではなく、純粋分析科学のジャンルの仕事となる。

ここで紹介する X 線 1 分子計測法も、X 線でダイレクトに 1 分子挙動を計測している訳ではない。X 線の物質に対する散乱断面積から考えると、第 3 世代の大型放射光強度レベルでは常識的には不可能である。X 線 1 分子計測の特徴は、上記のような可視光 (300 nm-800 nm) を用いた 1 分子検出法ではなく、それよりも波長が千分の 1 程度短い X 線領域の光 (2 nm-0.01 nm) を用いているので、極めて高精度に分子内運動をモニターできる点にある。可視光で 1 分子の動きを見る方法は、ビデオエン

ハンス法¹⁰⁾等の利用もあって、可視光 (300 nm-800 nm) の波長域を用いても数 nm の精度で分子運動をモニターできる。特に 1 分子蛍光共鳴エネルギー移動法 (Single Molecular Fluorescence Resonance Energy Transfer Method: SM-FRET) は、蛍光分子の選択にもよるが、1 nm 以下の分子内移動距離を計測できる可能性がある¹¹⁾。しかし、SM-FRET の問題点は、蛍光 1 分子自身が化学環境に敏感すぎて信号強度が非常に不安定になる点にある。この特性は利用法によっては利点になるが、生体分子内の局所的な化学環境まで正確に理解できていない現状では問題点となる。また、生体分子内部の構造変化をモニターしようとする、多くのタンパク質分子が 10 nm 程度の大きさと考え、その十分の一である 1 nm 動くと言うのはかなりの大きな運動となる。内部運動を正確にモニターしようとするならば、その一桁下の精度は必要となる。そこで X 線の登場となった。後述するが位置決定精度はなんと ~ 1 pm である。つまり、0.001 nm の測定精度が現実のものとなった。

正確な理論式ではないが、波長 λ とすると 1 分子計測の位置決定精度は、 $\sim \lambda/100$ まで可能である¹²⁾。可視光領域が 300-800 nm とすると数 nm の位置決定精度は合点がいく。これを X 線の波長 ($= 2-0.01$ nm) に置き換えて考えると、pm オーダーの位置決定精度が出ることになる。このようにして、可視光を利用した計測方法の限界を認識し、分子内構造変化情報の重要性を考えて、X 線 1 分子計測は登場した¹³⁾。

付け加えておくと、SM-FRET が最近になって多くの生体系において使用されるようになった¹⁴⁻¹⁶⁾。特に *in vivo* での計測は予想以上に利用され始めてきた。これは、比較的安定な FRET を起こす蛍光分子群が市販され始めた事と、モニターしようとしているスケールが 2-10 nm 程度に特化している点に注目すべきである。今後、それ以下の精度を目標とした実験もより安定な蛍光分子群が普及され始めれば、1 nm レベルもしくはそれ以下の分子内構造変化も計測可能になるかもしれない。今後も注目される

1 分子計測系であることに違いはない。

2. 結晶性ナノプローブを検出する X 線 1 分子計測法

1 分子の運動が計測可能でかつ位置決定精度 pm レベルが実現すれば、機能性タンパク質分子の分子内運動が正確にモニターでき、機能発現に伴う微小な構造変化情報が得られる。しかし、多くの研究者は、“X 線を用いて 1 分子を検出できるのか?” という疑問を持つ。それは、物質と電磁波との散乱断面積の大きさは、波長に比例するという常識からの当然の疑問である。無論、X 線の発光、吸収、散乱現象を用いて 1 分子を直接的に検出することは第三世代大型放射光施設を用いて数時間の積算をしたとしても難しい。私は X 線の物理現象で一番高感度な現象、つまり X 線回折を利用した、時分割回折 X 線追跡法 (Diffracted X-ray Tracking: DXT) が 1 分子検出の可能性があると考えた。X 線 1 分子計測法のアイデアは単純である (Fig. 1)。まず、直径数 nm 程度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する。そして、極微ナノ結晶からのラウエ斑点を指標に、着目したタンパク質分子の動きを時分割 (\sim ms 程度) トレースする。Fig. 1 には、目的 1 分子ユニットの一部に構造変化があると、その部位に標識されているナノ結晶がその構造変化と同期して変位し、ナノ結晶からのラウエ回折斑点の方向を変化させるという例を示している。ここで注意しなければならないのは、検出しているのは標識されたナノ結晶の方位であり、分子自身の方位や並進運動ではない。従って、ここでは、ナノ結晶の運動とナノ結晶が標識された目的分子内の部位 (被標識部位) が同様の運動をしているということが大前提となる。これは、ナノ結晶と被標識部位の距離、結合状態に依存すると予想される。この前提の検証は、各条件下で計測して行なうしかない。今のところ、比較的広い条件下でこの前提は成立していることが分かっている。

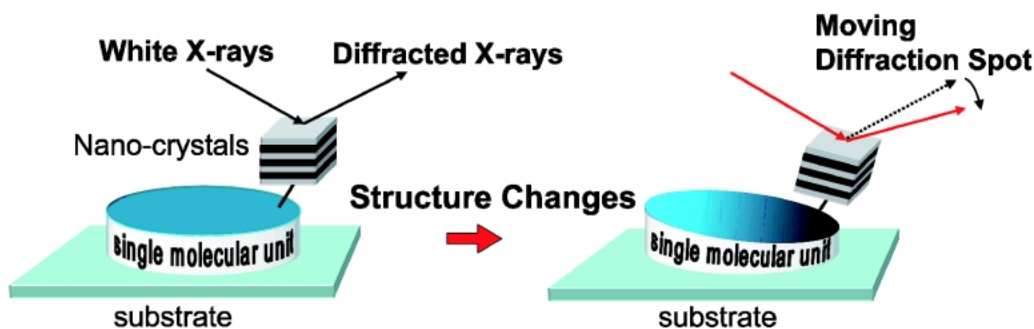


Fig. 1 Schematic drawing of the single molecular detection system using x-rays (not to scale). Diffracted X-ray Tracking (DXT) monitors the behavior of a single special domain with the guidance of diffraction spots from the nanocrystal which is tightly coupled to the special domain. In DXT, we directly monitor the rotating motions of the labeled nanocrystal.

以上のように、ここで議論する X 線 1 分子計測法は、直接的に 1 分子の動きを X 線検出する方法ではない。最近議論されている¹⁷⁾自由電子レーザー等の次世代大型放射光施設を用いた 1 分子構造解析とは異質のものである。しかし、この究極的な方向の研究は、X 線だけではなく電子線の単粒子解析法¹⁸⁾や NMR の 1 分子バージョンとも言える磁気共鳴力顕微鏡 (Magnetic Resonance Force Microscopy: MRFM) の目指す 1 分子構造決定法^{19,20)}、それに計算科学が推し進める 1 分子構造予想の流れを見ても必然的であり、ある意味では X 線分野はまだ遅れていると言ってもよい。これから 10 年以内には、上記の中で 1 分子構造を決定できる方法論が選択されるであろう。その時の選択基準は、高分解能計測であることは自明として、より多くの研究者に提供されやすい環境での方法論となるであろう。この点からも、生体系をターゲットとする方法論の研究において、多くの研究者が手軽に使える計測手段であるという条件は、益々重要な因子として認識し、新しい計測手段の研究に携わらなければならないと言える。

3. 生体 1 分子のソフトな基板固定

Fig. 1 のような X 線 1 分子計測を成功させるためには、3 つの技術的ポイントがあった。(1)生体 1 分子ユニットのソフトな基板固定(2)1 分子に対して 1 ナノ結晶を 1 対 1 に標識する方法、及び(3)良質のナノ結晶作製である。

(1)については、水溶液中を拡散、ブラウン運動している分子にナノ結晶を標識しても、現在の放射光のフラックス量ではナノ結晶からの X 線回折斑点を実時間 (最低ビデオレート速度で) 測定することは不可能である。従って、X 線を非常に良く透過する石英基板 (通常利用するのは

厚さ 70 μm) の上に生体分子をソフトに化学固定する。固定法はいくつかの方法が開発されている^{21,22)}。典型的な例を DNA 分子やミオシン分子の基板固定で説明する (Fig. 2 参考)。Fig. 2(a)では DNA の 5' サイトを基板表面に修飾している。最近では DNA 分子を合成して使用することが多いので、5' サイトへ活性部位 (例えば SH 基等) を導入することは難しくはない。Fig. 2(c)は、ミオシン分子を基板固定した例である。この場合、末端部分 (N 末端や C 末端) に活性な SH 基や His-tag 基などを遺伝子導入する方法が利用される。His-tag 基の導入は、変異体を精製する過程で最近頻りに利用されているので、特別な変異体の作製を必要としない。問題は SH 基の導入である。変異体導入された SH 基は一般に活性が高く、他の同一分子と SS 結合を作ってしまうので、DTT 等の酸化防止剤を共存させて試料保存しなければならない。ただし、基板と変異体を反応する際は、これらの酸化防止剤自身が優先的に基板表面と反応する場合は多いので、サンプル溶液から低分子除去などを反応直前に行わなければならない。

正確な生体分子の基板への配向性を必要としない系の場合は、二価性試薬を用いて生体分子内の活性なアミノ基など (非特異的固定) を介して基板固定する場合もある。基板固定で注意する点は、目的分子と基板表面の間を直接接触させない程度に基板修飾分子で空間を空けることである。直接結合させることでタンパク質分子自身の構造に歪みが入り、保持する機能が劣化することが多く報告されている。しかし、空けすぎると極端な言い方をすれば、水溶液中に存在している時の自由運動と同様の運動となり計測不可能になってしまう。上記空間は目的分子や固定する残基位置に依存して異なる。またここで注意する点は、この固定法が X 線 1 分子計測法の必須条件ではないと言う点である。検出される X 線回折斑点の感度が向上すれば、

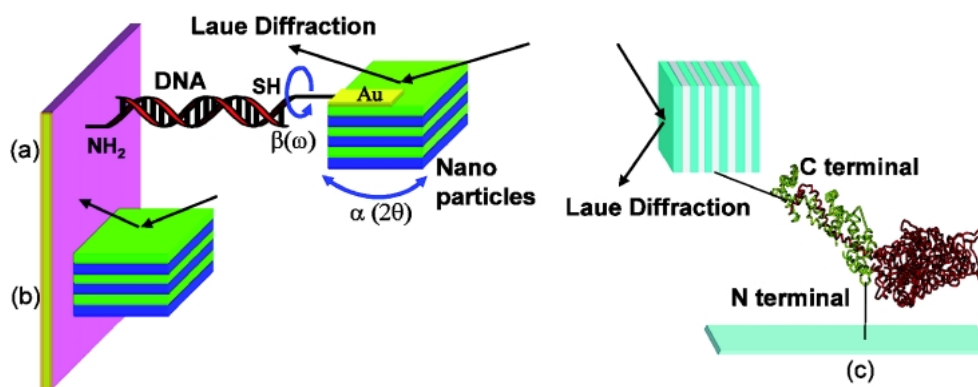


Fig. 2 (a) Schematic drawing of the x-ray single-molecular detection system for individual DNA molecules in aqueous solutions (not to scale). DXT traces the displacement of the single diffracted x-ray spot from the one-dimensional Si/Mo nanocrystal, which is linked to the individual DNA molecules. The diameter of the nanocrystal and the DNA molecule are about 30 nm and 2.5–3 nm, respectively. (b) Schematic drawing of the sample of physical adsorbed Si/Mo nanocrystals on the Au/quartz. (c) DXT monitors the behavior of a single lever arm domain with the guidance of diffraction spots from the nanocrystal which is tightly coupled to the observed lever arm domain. The N-terminal of the myosin molecule is bound to the surface of the quartz substrate. The C-terminal of the individual myosin molecule is reacted with the single nanocrystal.

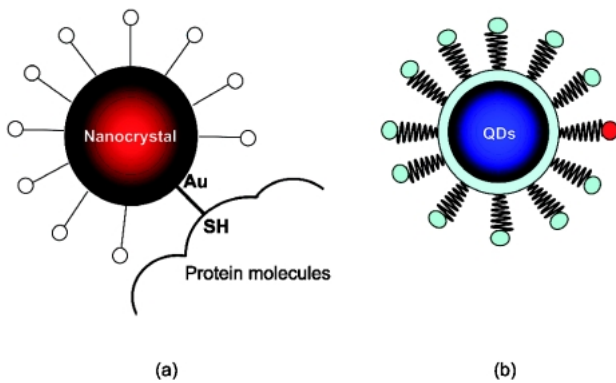


Fig. 3 (a) The number of reacted sites with the labeled nanocrystal is expected to single site in the observed protein molecular unit. In order to control the number of labeling cysteine sites in protein molecules, we utilized a mercury compound to occupy the remaining cysteine sites. (b) Individual fluorescent semiconductor nanocrystals (Quantum Dots: QDs) is encapsulated in the hydrophobic core of a micelle composed of a mixture of n-poly (ethyleneglycol) phosphatidylcholine (PEG-PE) and phosphatidylcholine (PC) to be solubilized in aqueous solutions. The part of red circle is only reacted with the protein molecules.

より高速の計測が可能となり、水溶液中を浮遊している分子の分子内運動も計測できる。

(2)に関しては現在のところ、完全には解決していない。理想的には目的1分子に標識されるのはナノ結晶1つでなければならない。それも目的分子中の1つのサイトを介してである (Fig. 3 参考)。本研究で用いているナノ結晶は金結晶であり、金はX線回折の検出感度が高いばかりではなく、金表面とSH基との共有結合が有効に利用できる。金表面は無数の活性サイトを持っているので、複数のシステインとの反応が進むことが容易に予想される。現状は、金表面の汚れのためにそれほどの多くの活性サイトを金ナノ結晶表面に考えなくてもよいらしく、将来的には活性表面をこちらが指定した表面電荷になるように金表面化学修飾を施して、完全に1つの反応分子のみを金ナノ結晶表面に修飾することを目指している。

最近多く利用され始めた極めて高効率に蛍光発光する量子(ナノ)ドット^{23,24)}の表面修飾法は非常に参考になる。元々ナノサイズの粒子は、表面イオンによる反発で水溶液中になんとか分散状態で保持できていた。しかし、イオン強度の高い生体環境下では、容易に凝集し沈殿してしまう現象が以前より知られていた。そこで多くの研究者が行ったのは、非特異的吸着が少なく、生体環境下においても分散状態を長時間保持できる表面処理法を探すことであった。結果的に、ヘテロ2官能性ポリエチレングリコールをナノ粒子の表面処理剤に用いることで、反応性を持った安定なナノドットを得ることができた (Fig. 3(b))。ここで取り扱っているナノドットは直径5-10 nm程度の粒子で、その外側の表面処理に用いたポリマーの長さは、4-8 nm程度である。従って処理後のナノドットの大きさは、

処理前の大きさに比べて倍近くに大きくなってしまふ。

この処理をX線1分子計測法で利用すると問題が起こるかもしれない。現在検討中であるが、X線1分子計測法で以前ポリマーの動的挙動を実験した際には¹³⁾、当然ながらその動的な挙動が確認されている。つまり、ポリマー層を目的生体分子とナノ結晶の間に挿入することになるので、ポリマーの動的挙動を付加した情報しかX線1分子計測では得られなくなる。現在、より短いポリマーで分散特性が維持できないかを検討しているが、極めて短くして(例えば数nm)分散性が残るのであれば、この有効な表面処理工程を利用できるかもしれない。この処理が可能になれば、ナノ結晶に目的生体分子を1つの結合サイトで反応させる処理法の確立も可能性が出てくる。

目的生体分子へのラベル反応は極めて単純である。現段階では、安定的に水溶液中に存在するナノ結晶と基板上に固定された生体分子を2-10時間程度5-10°C程度でインキュベーションし、その後、バッファーでソフトにかつ何度もよく洗い流すという単純なプロトコルにしている。この際注意する点は、洗い流すのであって洗い溶液を基板にたたきつけるように洗浄してはならない。比較的ソフトに基板固定しているためか、簡単に剥離することが確認されている。(3)に関しては、次の章で説明する。

4. ナノ結晶作製

最初にX線1分子計測の実験に用いたナノ結晶は、サイズが非常に揃っている市販された金コロイドであった。金コロイドは免疫電子顕微鏡等でかなり利用されており、ナノ結晶自身の格子像も確認されている比較的結晶性が良いと考えられていた結晶体であるが、実際にSPRING-8でラウエ像を取ると、金コロイドから回折斑点はほとんど得ることができなかった。これは、物質に対する電子線とX線の散乱断面積の違いを如実に表わした結果として理解できる。従って、X線を用いる場合は、ナノレベルの良質の結晶体を自作するしかなかった。

より良質の結晶体を作製すべく、一次元及び三次元結晶の自作を行なった。主に2つの方法を考案した。1つ目はX線の反射鏡に使用されている多層膜(Mo/Si系)をナノレベルのドライエッチングにより切り出した多層膜ナノ粒子である (Fig. 4(a))。最終的に基板から多層膜粒子を切り離さなければならないので、その際の工夫は厄介であるが高反射率で直径30 nmの多層膜粒子の作製に成功した^{13,25)}。この結晶は、電顕写真を見ても分かるように (Fig. 4(b))、ナノ領域で比較的平坦な平面を持っている。これは、ナノ結晶の検出にX線回折だけでなく、X線全反射現象も利用できることを示唆している。X線の全反射現象は今使用している硬X線領域よりも軟X線領域において有効な反射強度を得ることが期待できる。軟X線1分子計測の有用なプローブとなる可能性を示唆した結果

と考えられる。また、このようなナノレベルの局所的な平滑表面は、水溶液中で作製する金コロイドの一種においても最近確認されている²⁶⁾ので、水溶液中でのプローブ作製の可能性も残されているかもしれない。

2つ目の方法は、結晶性の良い薄膜を作製するために無機材料において応用されている現象、エピタキシャル成長

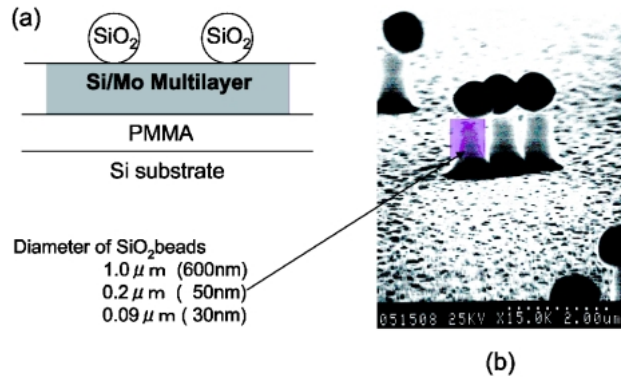


Fig. 4 Cross-sectional view of the fabricated substrate to make the artificial nano-particles. Silicon dioxide beads were used as a model protective coating array because the rate of the reactive ion etching with SiO₂ is much lower than that of the Si/Mo multilayer. The diameter of the SiO₂ beads is about 0.1 μm. A thin polymer (polymethylmethacrylate: PMMA) film was used to separate the Si/Mo multilayer from the silicon substrate. The Image of Scanning Electron Microscope is shown the Si/Mo nano-particles on the Si substrate after the reactive ion etching (RIE). Although the etching rate of SiO₂ with oxygen is smaller than that of Si/Mo multilayer, there are the nano-particles of the Si/Mo multilayer under SiO₂ beads. The part of square-box is assigned to the nano-particles of the Si/Mo multilayer in SEM images. The scale bar at bottom right shows 200 nm.

を利用した方法である。単結晶 NaCl(100) 基板面上に連続膜になる前段階の状態まで金を0.001–0.01 Å/s でゆっくり真空蒸着する。そうすると金は不連続膜(アイランド)状態でエピタキシャル成長する。金結晶が成長している間、基板の温度は375°C付近に保持しておく。そうすると、膜厚 1 nm で直径20–30 nm の金ナノ結晶が完成する(**Fig. 5**)。特記することは、エピタキシャル成長をこのようにナノ結晶(粒子)を作製するために積極的に利用した例は本実験が初めてという点である。しかし問題点があった。この金ナノ結晶や先の多層膜ナノ粒子はいずれも真空中で作製したので、これらの結晶を水溶液で使用するために基板から剥離させると、一瞬にして凝集が開始し1分子への標識などは不可能であった。そこで、その凝集の原因であるナノ結晶表面の疎水性を親水性に変えるために界面活性剤を比較的高濃度(10–50 mM)添加して安定なナノ結晶含有水溶液とした(**Fig. 5**)。この界面活性剤自身がこの後の生体分子との反応効率に影響しないことは確認済みである。

この NaCl 基板上的エピタキシャル成長工程において重要な因子は、今までの実験結果より以下の4点になる。(a)蒸着時の蒸着速度(b)蒸着時の基板温度(c)アニーリング温度(d)アニーリング時の圧力である。(a)(b)は無機材料的な発想からすぐに理解できるが、(c)(d)は予想できなかった。当初は、蒸着した後すぐに800度前後のアニーリング温度へ昇温させた。そうすると蒸着したはずの金薄膜(紫色)が全く基板上に存在しなかった。NaCl が真空中で高温にさらされたために昇華されたのだ。それで一度真空状態から出して、別のアニーリング装置内で再加熱を行うことにした。現状は数 MPa 程度にしか加圧できないが、アニーリ

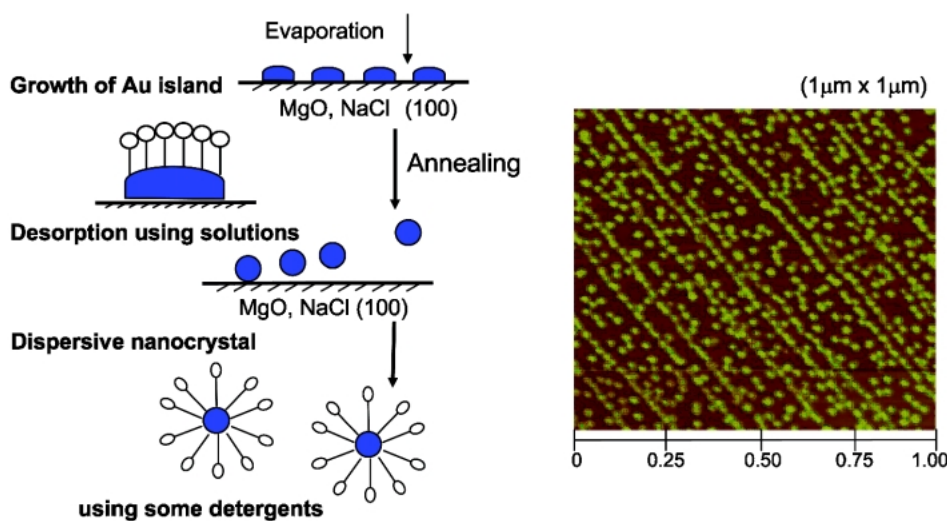


Fig. 5 We used gold nanocrystals (thickness = 10 nm) fabricated by vacuum-evaporation on NaCl (100) surface at 800 °C for 5 min. The gold nanocrystals were separated from a NaCl substrate (10 × 10 × 1 mm) by the solution (50 mM Tris/HCl, pH = 8.0) containing some detergents. We confirmed that the diameter of a gold nanocrystal is 20–30 nm by Scanning Electron Microscope, Atomic Force Microscope, and Dynamic Light Scattering. The AFM image is shown.

ング温度と加圧は明らかに正の関係があり、アニーリング後のナノ結晶の粒径にはそれほど大きく影響しないことが分かった。これらの実験結果より、より小さな粒径での完全ナノ結晶を作製するためには、最初の蒸着時に、より小さいアイランド状態を形成させ、再加熱（アニーリング）時には、できるだけ高圧状態で NaCl の昇華をできるだけ減らした状態で温度を上昇させ、Au の蒸発量を減らすことが重要であると分かった。

5. 実験装置

本実験では、ある領域内のブラック角すべてで反射が可能でなければ、生体分子に標識された金ナノ結晶の回折斑点を連続的に検出することは不可能なので、連続波長帯を持った白色 X 線が必要となる。従って、白色でかつ集光能力を持った大型放射光施設 SPring-8 の BL-44B2 にて実験を行うことにした。本来白色特性というのは、放射光光源の特徴であるから、白色を利用する実験方法は正に放射光でなければ実験できない方法論であると言える。データは、数 ms レベルのパルス X 線光源を使用して、ビデオレート程度で 1-2 秒間計測した。検出系は、X 線を可視蛍光に変換する X 線イメージングインテンシファイヤー V5445P を使用。可視蛍光は CCD カメラにて検出 (Fig. 6)。この検出システムがビデオレートのリアルタイムイメージングを可能にした (1-2 秒間連続計測)。

サンプルは、厚さ約 7-10 μm の水溶液層を挟んで片側を X 線透過フィルムで封をしている。フィルムは、耐放射性の高いポリイミドフィルムを使用した。このポリイミドフィルムは比較的薄膜が均一でフィルム表面を清浄化しやすく、よく X 線実験で利用されている。基板側は、両面研磨した石英基板 (厚さ 70 μm) を用いた。石英基板自身に化学修飾をして、生体分子を吸着させることもあるが、金を蒸着して基板として使用することもある。この場合の金は、アモルファス状態なので X 線の回折スポットを発生したりはしない。

サンプルの温度制御は可能で、通常 0-5 $^{\circ}\text{C}$ 設定下にて行なわれた。1 秒間の照射実験を何度も繰り返し、各運動を統計処理して既知のブラウン運動と比較検討を行うのが基本的なデータ収集法である。

6. 吸着 DNA 分子ブラウン運動計測 (生体高分子モデル実験)

X 線 1 分子計測を生体分子に適応する最初の例として DNA 分子を用いた。設計しやすく構造も既知で単純だからである。Fig. 2(a)のように、直径 40-50 nm 程度が多層膜ナノ粒子を計測したい DNA 1 分子 (図では短い塩基列を持った DNA 分子) の興味ある部位 (ここでは 5' 末端) に化学的に標識する。その際、分子の固定とナノ結晶の標

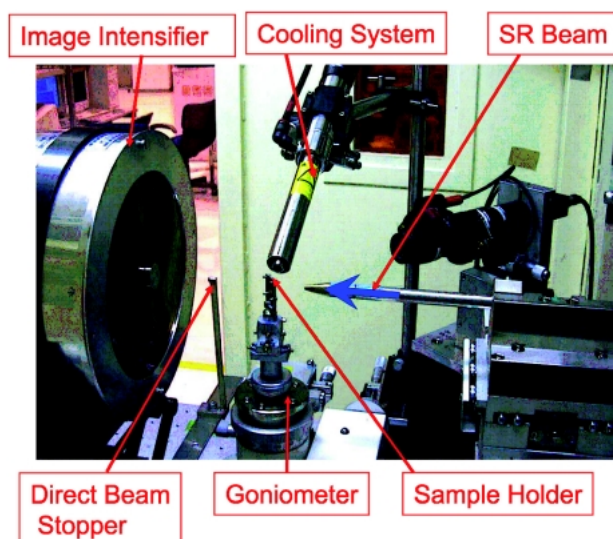


Fig. 6 The photograph of the instrumental arrangement for Diffracted x-ray tracking method. We used the white X-ray mode (Laue mode) of beamline BL44B2 (RIKEN Structural Biology II, SPring-8, Japan) to record Laue diffraction spots from nanocrystals. Photon flux at the sample position is estimated to be about 10^{15} photon/s/mm² in the energy range from 7 kV to 30 kV. The x-ray focal beam size is 0.2 mm (horizontal) \times 0.2 mm (vertical). A diffraction spot was monitored with an X-ray image intensifier (Hamamatsu Photonics, V5445P) and a CCD camera (Hamamatsu Photonics, C4880-82) with 656 \times 494 pixels.

識によって計測したい分子の運動特性が変化しないように最大の注意を払う。

分子の運動は大まかに 2 種類ある (α と β)。現在の実験配置は透過型ラウエ計測なので、 α 型の運動に対してのみ非常に感度良く計測できる。Fig. 2(b)では、もしナノ結晶に DNA 分子が修飾されずに物理吸着した場合を表わした。また、同様に物理吸着している場合でも、回折条件が満たされずに回折 X 線が得られない場合も考えられる。つまり、X 線 1 分子計測法では、X 線照射内にナノ結晶があっても回折条件が満たされない場合はナノ結晶の存在を確認することはできない。また、ナノ結晶が存在して結晶方向も検出できる方向に向いていたとしても、その結晶性が良くなければ検出することはできない。感度的に極限で計測しているので、ナノ結晶の結晶性は極めて重要である。

新しい計測法の測定限界を実験的に決定することは、これから計測対象になるサンプル系を明確化できるだけでなく、解析上も重要な因子の決定となる。X 線 1 分子計測法の測定限界は、Fig. 2(b)の例を利用して決定された。確認された回折斑点の安定性を計測することにした。50 点程度の回折斑点を観察した結果、1 秒間に $2\theta = 1.5$ mrad 以内の安定性が確認され、この数値をもし長さ 6 nm の DNA 分子の最小運動値として表わすのであれば、4.5 pm という数値を得ることができる。この数値は原子直径の約

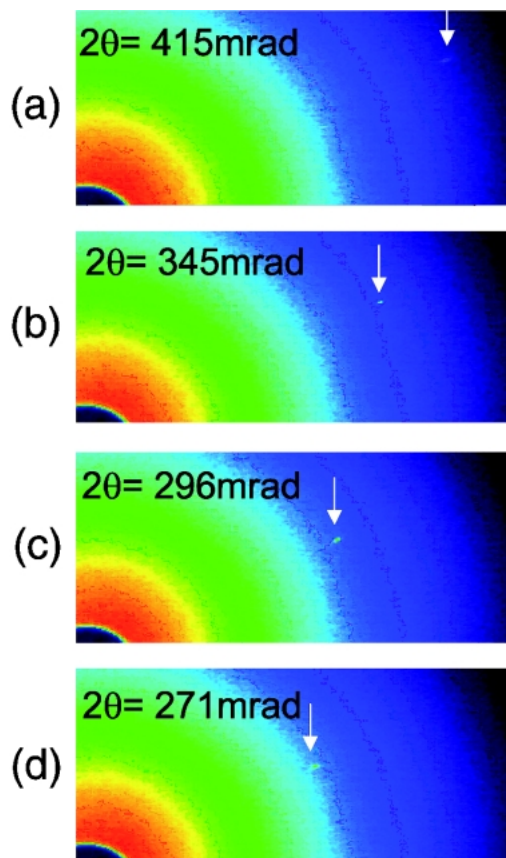


Fig. 7 Examples of the diffracted spots from the single Si/Mo nanocrystal which is linked to the adsorbed DNA molecules in aqueous solutions appeared as brightly shining dots (white-blue). Frames are spaced at 180-ms intervals. The total observation time was 1 s.

1/100の長さに対応する。注意しておきたいが、この数値は、X線1分子計測によって測定された回転運動の変位をある点を支点に並進運動に変換した場合の数値である。この剛体モデルの数値換算が成立しない場合は、より小さな運動をモニターしていることになる。分子の熱揺らぎ等を考えると、この並進運動に換算した数値はかなり実測地に近い値と考えているが、直接測定したわけではないことは注意を要する。

Fig. 7 は実際に DNA 分子が水溶液中でブラウン運動している間に計測された回折斑点の運動である。各フレーム間は0.25秒。1秒間の観察結果を示した。2θ方向のみに回折斑点が運動しているのが分かる。今まで回折像が動画として利用できるのではないかと認識された例はほとんどなく、X線1分子計測法の発想がいかに意外性のある方法かこのデータからも理解できる。

7. バクテリオロドプシンの光励起ブラウン運動計測 (膜タンパク質分子への応用)

本計測法の最終目標である *in vivo* 1分子計測を実現す

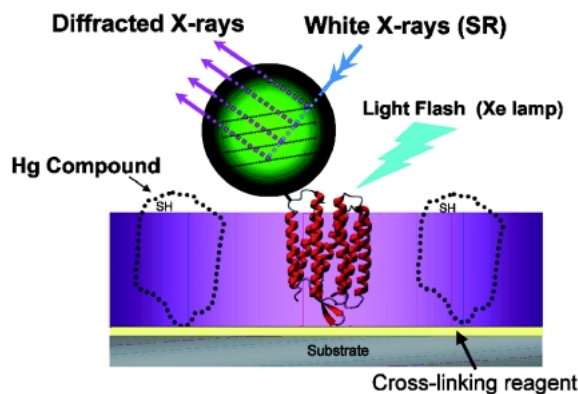


Fig. 8 Schematic drawing of the cross-sectional view of DXT in the case of BR S35C. DXT monitors the spots of diffracted x-rays from individual nanocrystals that are tightly labeled with individual BR S35C. Samples containing the immobilized BR S35C were filled with the oxygen scavenger system (25 mM glucose, 14 mM 2-mercaptoethanol, 10 nM catalase and 2.5 μ M glucose oxidase) in 50 mM MOPS (pH 7.0). The ratio of BR molecules to nanocrystals to be one to one is able to be realized because Hg compound (PCMB) first labelled with excess sulfhydryl groups in BR S35C.

るために、より *in vivo* に近い状態で機能性タンパク質分子の機能発現に伴う1分子動的挙動計測を試みた²⁷⁾。機能性タンパク質分子の中で、極めて魅力的なのは細胞の内側と外側の調製機能として極めて重要な役目を担っている膜タンパク質分子である。今回のサンプルは光反応系の代表的な膜タンパク質分子、Bacteriorhodopsin (bR) である。bR は分子内に有するレチナル分子が特定波長 (568 nm) を吸収し異性化することで、プロトンポンプとしての機能を発現する。本実験では、bR1 分子の特定部位 (アミノ酸35残基目) に SH を導入した変異体を用いて、アミノ酸35残基が存在する A-B ループ部位に、そこから少し距離のある部位に位置するレチナル分子の光励起に伴う構造変化がどのように伝達されるかを計測した (**Fig. 8**)。

従来の bR の構造変化計測は、レチナル部位が赤外及び可視域の吸収帯を持っているために、分光学的な考察から構造変化を推測してきた。その後、多くの状態における bR 立体構造解析が行われ、その構造比較より、分子全体に渡る構造変化がかなり詳細に分かってきた。しかし、立体構造を決定している場合は、3次元結晶構造状態であり、bR が生理条件下で存在する紫膜内での構造変化とは異なるのではないかと疑問は残る。ここでの実験は、その疑問に回答を与えるサンプル条件に近いかもしれない。

Fig. 8 のようにこの bR 実験では、立体構造を正常な状態に維持して実験を行えるように、2次元配向した天然の生体膜、つまり紫膜自身を基板に一方向から固定し、SH 基を導入した変異体を使用して、金のナノ結晶を特異的な部位に標識させた。**Fig. 8** でわかるように最密充填状態の bR とナノ結晶を1対1の比で標識するために余分な SH 基を水銀化合物でつぶした。水銀化合物の反応時間は、1

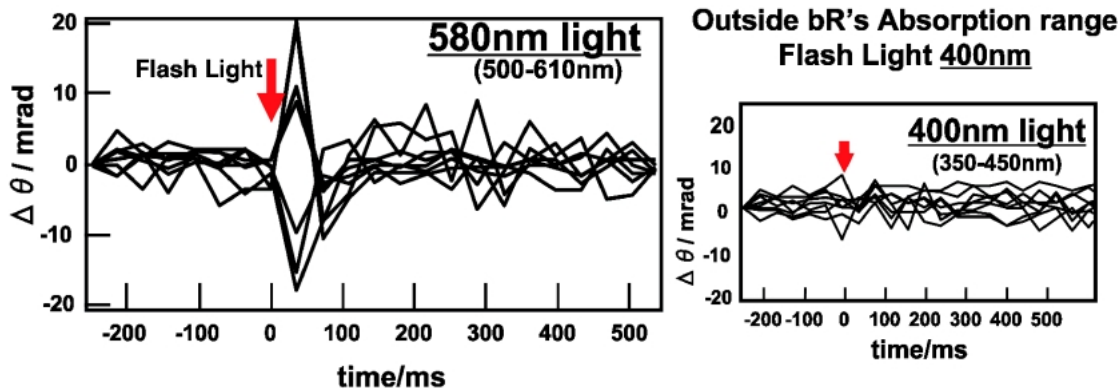


Fig. 9 Displacement of θ ($\Delta\theta_{570}$ and $\Delta\theta_{400}$) of observed diffracted spots with ~ 570 -nm and ~ 400 -nm lights.

-3 時間の間で30分事にナノ結晶からの回折斑点数で決定した。反応時間3時間では、全く回折斑点が検出されなかったことより、2時間程度の反応時間とした。確認のために水銀化合物を反応させない条件でも実験を行った。Fig. 8 からも分かるように、各分子の構造変化の向きは、膜内で一方方向ではないので、bR 1 分子に二股、三股にまたがっている1つのナノ結晶には複雑な引っ張り運動が付加されると予想される。実験結果では、予想通りで以下に示すような統計処理に耐えるような計測結果は得ることができなかった。反応サイトの数やその方向性を制御できたら、分子間綱引き計測が可能となるかもしれない。

Fig. 9 に示すように、水銀化合物を2時間反応させた結果では、560 nm の可視光を数 μs 照射した場合、回折斑点は 14.6 ± 9.7 mrad (70点の回折斑点からの平均値) のジャンプを示すことが分かった。これは標識されているA-B ループが剛体として運動したとすると、 0.73 ± 0.48 Å の変換に換算できる。つまりこの数値は、統計処理した結果においてもDXTによって1 Å 以下の構造変化が測定できたことになる。剛体的運動は過程しているが、DXT法の驚異的な運動検出精度を証明したことになる。確認実験として、560 nm の可視光以外の波長(例えば、400 nm や700 nm)では、このジャンプがないことを計測した(Fig. 9)。

一般に、ブラウン運動を解析するためには、分子の運動に関わる測定値のMSD (Mean Square Displacement) 曲線を表示することで議論される。Fig. 10 では、光励起前後のブラウン運動を評価してみた。意外だったのは、bR 自身、紫膜の中にあるという意味では天然状態に近いが、基板に固定しているという点では、ブラウン運動になんらかの影響が及んでいても不思議ではないのだが、結果は Fig. 10 にあるように直線近似できるMSD 曲線が得られた。無論、物理的に吸着させているのであるから、長時間MSD 曲線を計測していれば、この直線近似からはずれる。しかし、1秒間もの間この直線性が得られたと言うことは、この時間内においてはこの吸着状態が、物理的になんらブラ

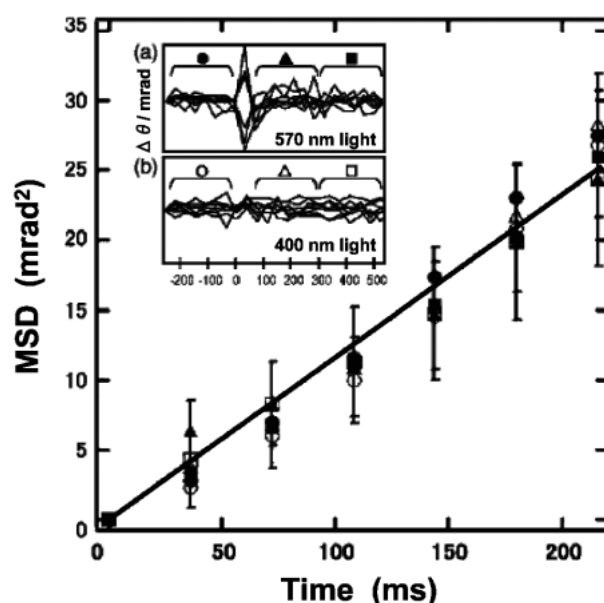


Fig. 10 Curves of mean square displacement ($\Delta\theta^2$) of the observed diffraction spots from the labeled nanocrystals as a function of time interval Δt among three regions for analyses of Brownian motions. Six symbols represent the experimental results for 70 diffracted spots, while solid curves show the theoretical curve fittings.

ウン運動に影響を与えていないことを示している。

このように、膜タンパク質分子の運動計測にDXTが有効であることを示すことができた。今後、レチナルタンパク質、つまりGタンパク質共役型レセプターや、Kチャンネル、Caチャンネル等の重要なチャンネルタンパク質系の運動情報を実際に計測し、近い将来において、*in vivo*でもその運動がÅ以下の精度で計測する予定である。

*in vivo*での一番の問題点は、膜タンパク質分子が生体膜内を2次元的にブラウン運動することである。前述したが、現状の放射光のX線強度では、全く自由なブラウン運動をしている場合は明確な回折斑点を得ることはできない。同様に生体膜を自由に動いている膜タンパク質分子

も検出できない。これは DXT の限界というよりも、現況の X 線強度からくる限界である。証拠に、粘性を非常に上げた状態において、ナノ結晶をその溶液に溶かすと、その全く自由なブラウン運動はリアルタイムで計測することが可能となる。現状では、目的の膜タンパク質分子を 2 次元的拡散運動ができないようにトラップして（基板固定も一種のトラップ法）、計測すれば現状でも計測可能である。また、ナノ結晶の表面に疎水的特性が残っているため、タンパク質分子に吸着した後でも、生体膜の中にナノ結晶の疎水面が進入しようとする場合があることが確認されており、ナノ結晶の疎水面を完全に親水化するプロセスをこれから構築する必要がある。それと同時に、ナノ結晶の反応サイトを 1 点に絞ることで、膜タンパク質系の方に今回のように水銀化合物を修飾しなくても、1 対 1 の修飾反応が可能になるように、ナノ結晶の表面処理法の構築は、今後の DXT の根幹の問題を解決するキーとなると考えている。

8. 白色光から単色光の利用へ

現状の X 線 1 分子計測法は、標識したナノ結晶の方位をブラック反射によって検出しているため、励起光である放射光は、あるエネルギー幅（波長幅）を持っている必要がある。しかし、白色光を使用する上で欠点がある。まず第一点は、放射光は本来白色光を発生しているが、最下流まで白色光を採り出しているビームラインは非常に少ない。これは本計測法を利用する側としては欠点となる。第二点は、サンプル系へのダメージの問題である。今後放射光がより高輝度化すればするほど、この問題は大きな障害になる。本実験でも、7-30 KeV の幅のエネルギーが生体分子にあらゆる時間帯照射されている。しかし、回折斑点を発生させているのは、ほんの一部の波長帯だけである。完全な X 線の単色化で回折点を追跡するのは、サンプル自身に回転運動等を導入しない限り無理であるが、現状まで広げる必要はなく、狭くした方が明らかにダメージは軽減できる。最後の問題点は、信号の S/N 比である。全く同じフラックスで比較したことはないが、SPring-8 (BL40XU) では、アンジュレーターからの準単色化（エネルギー幅 2%）したビームを使用することができ、その信号の S/N 比は極めて良好で、より小さいナノ結晶も測定できる（直径 15 nm 程度）。

実際に BL40XU での実験では、BL44B2 では、再現性の高い計測結果は 2 秒間が最長であったが、BL40XU では、6-8 秒程度の計測が可能であることを確認した。確かに、エネルギー幅が狭いので、激しいブラウン運動をする分子系では追跡していた回折斑点が、測定時間内に測定視野から外れてしまうことがよく起こる。その場合は、カメラ長を短くする等の対応で十分計測できることが分かった。

以上の問題点を解決するためにも、現状の白色利用は、

間違い無く単色利用へ移行することになる。では、考え方を考えて単色光源を用いた 1 分子計測は可能であろうか？ 答えは可である。2 つの方法がある。ナノスーパーミラーの利用と全反射現象の利用である。多層膜のナノ粒子を作製した時¹³⁾、実際に反射の強度を得るために必要であった層数は 3-4 層であった。1 つの波長に対して 3 層を考えると、10 層程度の総数の中で少々 d スペースに幅を持たせ、1 つの波長でも幅のある回折角度が得られる。当然、多層膜のナノ粒子が、最低でも 30-50 nm 程度の粒径が必要であったことを考えると、100 nm 程度の粒径になると予想されるが、信号の S/N 比の向上を考慮するともう少し小さくても検出可能になるかもしれない。

もう一つの全反射現象の利用は、ラポレベルの強度における実験の可能性を検討するために研究を行ってきた。全反射現象は、全反射臨界角以下では単色化した X 線でも角度に幅があることから、その利用が可能となる。現状では、十分な全反射スポットが得られるナノミラーの作製が困難であることが分かっている。全反射の臨界角を利用しているので、できるだけ大きい臨界角を得ることのできる材料系を選択する必要がある。条件は 2 つで、平坦な表面をナノエッチング加工後でも保持している事。次には電子密度ができるだけ大きい元素で構成することである。検討したのは Si, Au, Pt である。Si は平滑平面が得やすいため、あとの 2 元素は電子密度が高いためである。結果的に、Au, Pt は平滑なナノ平面を得ることができなかった。これは原理的には可能と思われるので今後の課題である。全反射斑点の検出に成功したのは、Si ナノミラーだけであった。それも粒径 100 nm と予想よりも大きい粒径でなければ反射斑点を検出できなかった。

これらの結果から、狭い（エネルギー幅 1% 以下）幅の単色光を用いる場合は、標識するナノ粒子が 100 nm 程度の大きさになってしまうので、この大きさでも運動が計測できる系に限って現状利用可能となる。いずれにしても、X 線光源側の高輝度化とナノ粒子の作製技術の進展がなければ、単色光を用いた X 線 1 分子計測法を多くの系に利用することにはまだ時間がかかる。大切な点は、原理的には可能であるという認識である。

9. これからの 1 分子計測

X 線 1 分子計測の課題は 3 つある。一つ目は放射光により生体分子損傷効果の評価である。現状は損傷が最小限になるように実験を行なっているが、現状よりも長時間の連続実験が必要になる場合や、高強度の X 線を利用しなければならぬ場合、この効果は無視できなくなり定量的な評価が必要となるであろう。前記の bR の実験においても、計測時間内の破壊を目立たなくするために、ラジカルスカベンジャを水溶液に混入させている。根本的に破壊現象を無くすることは困難であるが、できるだけ破壊時間を

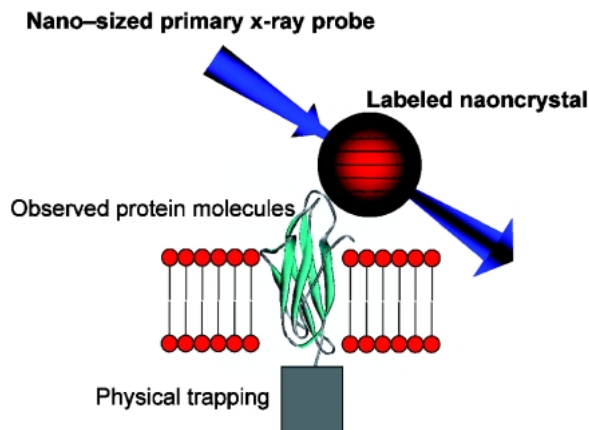


Fig. 11 Schematic drawing of the idealistic nano-sized primary X-ray beam to the labeled nanocrystal. There are no directly radiations of the individual observed protein molecular units.

遅らせるような工夫はこれからもされるであろう。

二つ目は装置の規模である。可視光等の1分子計測技術はLabレベルの大きさの装置が大半であるが、X線1分子計測は大型放射光施設が必要となる。立命館大学のような実験室レベルの小型放射光装置の開発²⁸⁾が進んでいるので、小型光源の利用も検討している。また、硬X線よりも軟X線の光源施設の方が小規模になるのでその検討も行いたい。軟X線領域は、集光技術も利用できるので、Fig. 11のように標識したナノ粒子だけ照射して、目的の生体分子にはほとんど照射されない理想的な非破壊計測が可能になるかもしれない。また、X線よりも散乱断面積が 10^4 程度大きい電子線を用いた1分子計測も検討を開始した。電子線はX線よりも単色化技術が進んでおり、逆に白色化するのは現状の装置構成を考えると難しい。それで入射角度の高速スキャン等の利用で、単色でも幅のある回折斑点の検出が可能ではないかと考えている。走査型電子顕微鏡 (SEM) のオプション機能として電子線1分子計測が可能となれば、より多くの利用者に回折現象を用いた1分子計測技術を提案できることになる。問題点は、放射光同様にサンプルダメージである。かなり定量的な解析が今まで行われてきているので (0.1–0.2 electron/Å が非破壊最大照射量)²⁹⁾、この値を基準に検討していきたい。

最後の第三番目は、やはりナノ結晶の大きさを現状より小さくしたい。より *in vivo* 計測に近いことを測定し始めると、ナノ結晶が大きいと他の分子との相互作用がより問題となる。直径5–10 nm程度が目標である。先述しているがナノ粒子の表面処理も大きな問題なので、表面処理に関する研究も進めなければならない。

1分子計測全般の研究動向としては、より高精度でより高速な動的構造情報が得られる計測方法が登場することが考えられる。現状X線1分子計測は生体分子内の運動は

同時に1箇所のみでの計測になっているが、可視領域のFRET等の計測では、2点間の距離変化等の情報が得られ、分子間相互作用を解析する上では、2点以上の同時計測の必要性は増していくと思われる。高速性という意味では、 μs レベルの早さにおける興味ある生命現象は極めて多いので、ここ数年はこの領域がターゲットとなるであろう。逆な意味で1日–1ヶ月の長時間観察も面白いトピックスと成り得る。

1分子のみをターゲットとした1分子3次元構造解析も電子顕微鏡や次世代放射光を用いたX線技術で研究が開始されているが、生き残るのは間違いなく分解能が高い方である。最低分解能2–3 Åは必要である。

以上のように1分子で構造から機能に至までの情報が得られる方向へ研究が加速している。また測定環境としては、間違いなく *in vitro* から *in vivo* へ移行しているので、その可能性を加味した計測方法がより発展し利用されるようになる。ナノ計測の今後は、“1分子”と“機能メカニズム”というキーワードを中心に研究が多くは波長帯、多くのプローブを用いて行われていくであろう。

謝辞

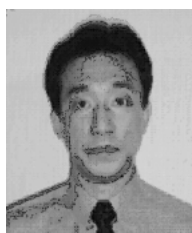
本研究は、その初期段階を科学技術振興事業団個人研究推進事業さきがけ研究21の研究助成により推進された。また、平成13年度から、同事業団戦略的基礎研究推進事業において5年間の研究助成をいただいている。同推進事業の関係者である研究総括の大島泰郎氏を初め、研究事務所の五十嵐孝司氏、河辺堅三氏、斎藤藤子氏、左海史子氏には日頃よりお世話になっている。本研究推進にあたり、SPRING-8/JASRIの八木直人氏、鈴木芳生氏にはアイデア当初から討論をしていただいた。この場をお借りして感謝したい。また、足立伸一氏、谷口彬雄氏、奥村泰章氏、岡俊彦氏、井上勝晶氏、宮崎拓也氏、植木龍夫氏、大石昇氏、須田斎氏にもこの場をお借りして感謝したい。

参考文献

- 1) T. Hirschfeld: Appl. Opt. **15**, 2965–2966 (1976).
- 2) H. Nagashima and S. Asakura: J. Mol. Biol. **136**, 169–182 (1980).
- 3) S. Matsumoto, K. Morikawa and M. Yanagida: J. Mol. Biol. **152**, 501–516 (1981).
- 4) T. Yanagida, M. Nakase, K. Nishiyama and F. Oosawa: Nature **307**, 58–60 (1984).
- 5) T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito and T. Yanagida: Nature **374**, 555 (1995).
- 6) R. D. Vale, T. Funatsu, D. W. Pierce, L. Romberg, Y. Harada and T. Yanagida: **380**, 451 (1996).
- 7) A. Ishijima, H. Kojima, T. Funatsu, M. Tokunaga, H. Higuchi, H. Tanaka and T. Yanagida: Cell **92**(2), 161 (1998).
- 8) H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida and K. Kinoshita Jr.: Nature **386**, 299 (1997).
- 9) R. Yasuda, H. Noji, K. Kinoshita Jr. and M. Yoshida: Cell

- 93, 1117 (1998).
- 10) B. J. Schnapp, R. D. Vale, M. P. Sheetz and T. S. Reese: *Cell* **40**, 455462 (1985).
 - 11) T. Ha, T. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. R. Selvin and S. Weiss: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(13), 6264 (1996).
 - 12) S. Weiss: *Science* **283**, 1676–1683 (1999).
 - 13) Y. C. Sasaki, Y. Suzuki, N. Yagi, S. Adachi, M. Ishibashi, H. Suda, K. Toyota and M. Yanagihara: *Phys. Rev. E* **62**, 3843–3847 (2000); Y. C. Sasaki, Y. Okumura, S. Adachi, Y. Suzuki and N. Yagi: *Nucl. Instrum. Methods* **A467–468**, 1049–1052 (2001); Y. C. Sasaki, Y. Okumura, S. Adachi, H. Suda, Y. Taniguchi and N. Yagi: *Phys. Rev. Lett.* **87**, 248102–1–248102–4 (2001).
 - 14) T. Na, A. Squire, G. Hansra, F. Bornancin, C. Prevostel, A. Hanby, W. Harris and P. J. Parker: *Science* **283**, 2085 (1999).
 - 15) E. A. Jares-Erijman and T. M. Jovin: *Nature Biotechnology* **21**(11), 1387 (2003).
 - 16) L. S. Churchman, Z. Okten, R. S. Rock, J. F. Dawson and J. A. Spudich: *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA* **102**(5), 1419 (2005).
 - 17) R. Neutze, R. Wouts, D. vander Spoel, E. Weckert and J. Hajdu: *Nature* **406**, 752 (2000).
 - 18) T. Nakagawa, Y. Cheng, E. Ramm, M. Sheng and T. Walz: *Nature* **433**, 545 (2005).
 - 19) H. J. Mamin, R. Budakian, B. W. Chui and D. Rugar: *Phys. Rev. Lett.* **91**, 207604/1 (2003).
 - 20) D. Rugar, R. Budakian, H. J. Mamin and B. W. Chui: *Nature* **430**, 329 (2004).
 - 21) Y. C. Sasaki, Y. Suzuki and T. Ishibashi: *Science* **263**, 62–64 (1994).
 - 22) Y. C. Sasaki, K. Yasuda, Y. Suzuki, T. Ishibashi, I. Satoh, Y. Fujiki and S. Ishiwata: *Biophys. J.* **72**, 1842–1848 (1997).
 - 23) D. R. Larson, W. R. Zipfel, R. M. Williams, S. W. Clark, M. P. Bruchez, F. W. Wise and W. W. Webb: *Science* **300**, 1434 (2003).
 - 24) X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan and S. Weiss: *Science* **307**, 538 (2005).
 - 25) Y. Okumura, Y. Taniguchi and Y. C. Sasaki: *J. Appl. Phys.* **92**, 7469–7474 (2002).
 - 26) Y. Sun and Y. Xia: *Science* **298**, 2176–2178 (2002).
 - 27) Y. Okumura, T. Oka, M. Kataoka, Y. Taniguchi and Y. C. Sasaki: *Phys. Rev. E*, **70**, 021917/1 (2004).
 - 28) News in brief, *Nature* **434**, 8 (2005).
 - 29) R. Henderson: *Quarterly Rev. Biophysics* **28**(2), 171 (1995).

● 著者紹介 ●



佐々木裕次

超高輝度光科学研究センター

主幹研究員

E-mail: ycsasaki@spring8.or.jp

専門：計測方法論

【略歴】

SPRING-8 大型放射光施設超高輝度光科学研究センター放射光研究所主幹研究員。(兼任) 科学技術振興機構戦略的基礎研究推進事業 (JST/CREST) “蛋白質の構造・機能と発現メカニズム” 佐々木チーム研究代表者。1991年東北大学大学院工学研究科博士課程修了 (工学博士)。1991年から(株)日立基礎研究所, この間に1993–94年東北大金属材料研究所受託研究員, 1997–98年東京大学薬学部受託研究員, 1998–01年科学技術振興事業団さきかけ研究21 “素過程と連携” 領域研究員, 2000–2002年大阪大学蛋白質研究所蛋白質機能評価研究部門教授兼務。2003年より現職。主な (趣味) 研究は全く新しい計測方法論の考案及び実証。著書は “X 線分析最前線” (共著, アグネ技術センター)。

Single molecular detection system using X-rays

Yuji C. SASAKI SPring-8/JASRI, JST/CREST SASAKI-team
1–1–1 Kouto, Mikaduki, Sayo, Hyogo 679–5198, JAPAN

Abstract *In-vivo* measurements of dynamical conformational changes in single-biomolecules under functional conditions have had a tremendous impact on molecular and cell biology. However, even single-molecule fluorescent resonance energy transfer cannot easily monitor the intramolecular dynamics in cell systems due to shortcomings in monitoring precision. Here we report dynamical observations of intramolecular conformational changes in a single DNA molecules and protein molecules, especially membrane protein (Bacteriorhodopsin: bR) using diffracted x-ray tracking (DXT), which is a new single molecule experiments with x-rays, monitors the rotating motions, rather than the translational motions of a labeled nanocrystal. In bR experiments, the position of BR's 35th amino acid, which is located farthest from retinal, exhibits a momentary positional jump of $0.73 \pm 0.48 \text{ \AA}$ due to the expression of its function. The average width of this jump is about 14 times larger than that of thermal Brownian motion and agrees with estimated movements from known X-ray crystallography data. This result is an important step toward to *in-vivo* observations of single-molecular conformational changes in membrane proteins.