

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04094

研究課題名(和文) タンパク質の分子間相互作用の1分子観察

研究課題名(英文) Single-molecule observation of interaction between proteins

研究代表者

藤芳 暁 (Satoru, Fujiyoshi)

東京工業大学・理学院・助教

研究者番号：70371705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質は複合体をつくり生理機能を発現している。当該課題の研究目的は、その分子間相互作用を1分子観察できる光イメージング法を確立することにある。このような試みは世界的に見ても誰も成功していない。それは、分子間相互作用を研究するには、解像度1 nmで三次元全ての軸に対する空間情報を取得しなければならないからである。

このような背景から我々は、ナノメートルの分解能のクライオ蛍光顕微鏡の開発に取り組んだ。その結果、昨年、短い二本鎖DNAの両末端(長さ10 nm)を光で1分子観察することに成功した。また、分子間相互作用の観察のプラットフォームとなる非天然アミノ酸を用いた蛍光標識に成功している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当該研究は数nm～100 nmの長さを観察するという顕微鏡における空白領域を埋めるものであり、学術的にも社会的にも大きな意義があると考えている。さらに、分子間相互作用は長い間その意義が指摘されながらも研究が難しい対象であった。よって、当該研究は将来的にとってもおおきな可能性をもっていると考えられる。今後は、この顕微鏡を応用し、細胞内や生体組織内における観察を可能にすることで、医学・薬学に貢献したいと考えている。

研究成果の概要(英文)：In cell, proteins interacted with one another, and forms a complex. The complex regulates biological functions. In the aim of the present work, we develop microscopy method for visualizing the molecular interaction. To visualize the interaction, we are developing a fluorescence microscope for cryogenic immobilized samples. As a result, the both ends of 10-nm-long double-stranded DNA molecules were localized with nanometer resolution.

研究分野：1分子イメージング

キーワード：1分子イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

生命現象は、無数のタンパク質分子によって成り立っている。このため、細胞内部でのタンパク質同士の相互作用や三次元ネットワーク、細胞周期や外部刺激に応じた変化を分子レベルで観測することが、生命現象の謎を解き明かすのに重要である。ところが、既存法でこれらの情報を得ることはきわめて難しい。それは、細胞内部を可視化しようとする分子の動きが高速なために、時間平均によって、ほとんどの情報が失われてしまうからである。このような情報を得る切り札となるのが、試料を凍結することであらゆる動きを封じ込め、1分子1分子ごとに光検出する「温度数ケルビンにおけるタンパク質1分子イメージング」である。研究代表者らはこれを実現するために、10年かけて17台の温度数ケルビンに凍結した試料を観察するための蛍光顕微鏡（クライオ蛍光顕微鏡）を独自開発してきた。当該課題では、このクライオ蛍光顕微鏡を利用して、タンパク質の分子間相互作用の1分子観察法を確立する。

【国内外の研究動向】 当該研究で開発する1分子観察法は、1分子分光が発明された初期からの夢であった。図1Aは1999年に

A. S. Weiss が報告した総説からの引用である[S. Weiss, *Science* **283**, 1676 (1999).]。図のように、それぞれのターゲット分子に、色の異なる色素 ( $F_1$ 、 $F_2$ ) を修飾する。色素からの蛍光イメージを1分子ごとに測定し、画像の重心を測定することで、複合体の立体構造を1分子観察しようというものである。しかし、15年以上経った現在、世界的に見ても、この夢は実現していない。これは、(上記の説明のように) 室温では、分子の動きにより構造情報がうしなわれてしまうからである。

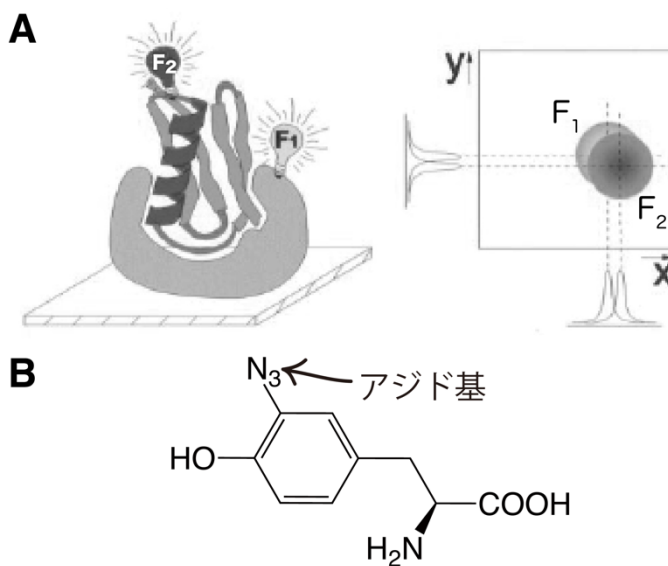


図 1. (A) タンパク質複合体の立体構造の1分子観測の模式図。S. Weiss *Science* **283**, 1676 (1999) より。(B) アジドチロシンの分子構造。

【分子レベルの色素修飾法】 上記のようにイメージング技術は未開発であるのに対して、色素を修飾する生化学的技術は分子レベルに達している。例えば、天然には存在しないアジド基 ( $-N_3$ ) を持つアミノ酸 (アジドチロシン、図1B) を組み換える方法である[I. Kii et al., *Org. Biomol. Chem.* **8**, 4051-4055 (2010).]。アジド基は三重結合と反応性が高く、無触媒で色素を修飾できる。アジドチロシンの導入には一つのアミノ酸を組み換えれば良く、ねらった部位へ導入できるため、生理活性を変えずに色素を修飾できる。この技術を活かせば、色素を修飾した試料でも、生物学的に意味のある構造情報を取得できる。

## 2. 研究の目的

当該課題の目的は、その分子間相互作用を1分子観察できる光イメージング法を確立することにある。このような試みは世界的に見ても誰も成功していない。それは、分子間相互作用を研究するには、解像度 1 nm で三次元全ての軸に対する空間情報を取得しなければならないからである。1分子からの信号は微弱であるため、このような高精度な測定には数分が必要である (P.4 参照)。生理条件では、分子は自由に運動しており、観察している間に画像がぼけてしまう。そこで、申請者らは、試料を温度数ケルビンに冷却することで分子の動きを凍結させることを考えた。これにより、凍結した瞬間の様子を鮮明に撮影することができ、分子間相互作用につ

いて研究ができるようになるはずである。

### 3. 研究の方法

上記のような研究を推進するために、以下にしめす2つの課題に取り組んだ。

#### 課題 A：タンパク質の分子間相互作用の1分子イメージング

免疫系の抗原抗体反応における相互作用部位（エピトープ）の1分子イメージングによる決定法を確立する。

#### 課題 B：三次元解像度 1 nm の 1 分子イメージングの確立

解像度 1 nm で、2つの色素間の三次元空間配置を分子ごとに決定する方法論を確立する。

### 4. 研究成果

#### 課題 A：タンパク質の分子間相互作用の1分子イメージ[研究業績 1.]

二本鎖 DNA(double-stranded DNA, dsDNA) をモデルとして、クライオ蛍光顕微鏡の分子確度を実証した。図 2A に dsDNA の模式図をしめす。合成した dsDNA の塩基対の数は 30 であり、長さ 10.2 nm の直線的な二本鎖を形成する。10 nm というのはタンパク質分子間の距離に対応し、これがイメージできることが実証できれば、顕微鏡としての性能は十分であると言える。

具体的な実験では、dsDNA の 5' 末端と 3' 末端にそれぞれ近赤外 (NIR) 蛍光性と赤 (RED) 蛍光性の色素を標識した。4 分子の色素標識 dsDNA のクライオ超解像蛍光イメージを図 2B にしめす。観測された 5' 末端の位置を▲、3' 末端を●で表している。1 分子あたり 4 回測定したので、それぞれ 4 つの点が画像上にある。各画像を見ると、dsDNA の向きや長さが確認できる。図 2B の上

部にあるのが、得られた色素間距離 ( $D_{xy}$ ) と標準誤差である。標準誤差は約 1 nm であり、目標の分子確度に達している。残念ながら、分子間相互作用の研究まで進めることはできなかったが、方法論としてはほぼ確立したと言って良い。さらに、研究分担者である林宣宏研究室で、抗原抗体反応におけるそれぞれのタンパク質に非天然アミノ酸 (図 1 B 参照) を利用して、蛍光色素を標識することに成功しており、試料の面の準備が終わっている。

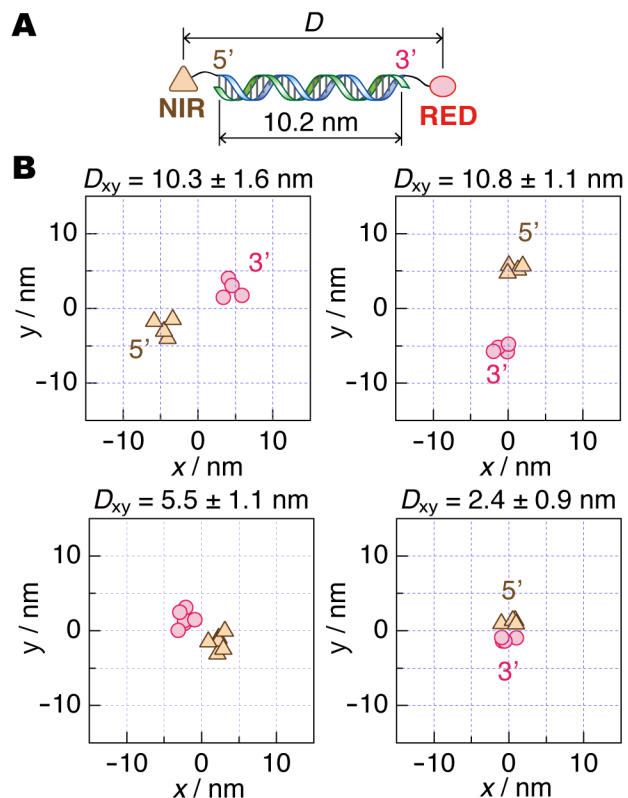


図 2. 分子確度の実証 . (A) 分子定規として用いた色素標識 DNA. (B) クライオ超解像蛍光イメージングの結果 .

参考文献 1. 古林 琢・石田啓太・櫻田 啓・中田栄司・森井 孝・松下道雄・藤芳 暁

「Nanometer Accuracy in Cryogenic Far-Field Localization Microscopy of Individual Molecules」

*The Journal of Physical Chemistry Letters* • 10 • P. 5841-5846 • 2019 年.

## 課題 B：三次元解像度 1 nm の 1 分子イメージングの確立

### (1) クライオ対物鏡の独自開発 [研究業績 2]

クライオ蛍光顕微鏡の極限的な機械的安定性と光学性能の両立には、極低温でも動作する反射型の対物鏡（クライオ対物鏡）が不可欠であった。

一般的なクライオ蛍光顕微鏡では、対物レンズを低温槽外に配置し、試料のみを冷却する(図 3A)。このような分離した配置では、ポンプの振動などの外乱のために、顕微鏡の機械的安定性が 100~200 nm になる。そこで我々は、対物レンズと試料を 1 個の真鍮のホルダー（茶色）に固定し、超流動ヘリウムに浸している(図 3B)。この一体配置では、試料と対物レンズとの機械的安定性が静的に 1 nm になることを明らかにした。[研究業績 9, Chem. Phys. (2013)]

一体配置(図 3B)の欠点は、性能の良い対物レンズが使えないことであった。一般的な対物レンズは複数のレンズからなる組レンズ型であるため、冷却すると

レンズ間の相対配置が変化して機能しなくなる。このため、我々が研究を始める以前、一体配置の顕微鏡には、図 3B に示す単レンズが用いられていた。単レンズは 1 枚キリなので、そもそもレンズ間距離というものがなく、低温で動作する。その反面、単レンズは、光学性能が悪く、生体イメージングが不可能であった。そこで、我々はクライオ対物鏡を独自開発してきた。

図 4A は最新のクライオ対物鏡(通算 9 代目)の光学配置である[研究業績 2]。クライオ対物鏡は非球面鏡と球面鏡の 2 枚の鏡からなる反射型であるため、色収差がない。これら 2 つの鏡を、1 個の石英ガラス表面にアルミを真空蒸着することで一体成形しているため、極低温でも室温と変わらない光学性能を発揮する。我々は 14 年かけて、9 つのデザインのクライオ対物鏡を開発してきた。その結果、高い開口数(0.93)を持ちながら、広視野(70  $\mu\text{m}$ )を持つ究極のクライオ対物鏡を開発した。図 4B は、各世代のクライオ対物鏡の写真である。左上の数字が世代数を表している。この 9 代目のクライオ対物鏡の性能は、生理条件の対物レンズと比べても、それらを大きく上回り、極限的なものである。

研究業績 2. 藤原正規・石井啓暉・石田啓太・虎谷泰靖・古林 琢・松下道雄・藤芳 暁

「Aberration-corrected cryogenic objective mirror with a 0.93 numerical aperture」  
*Applied Physics Letters* • 115 • P. 033701 • 2019 年.

### (2) チタン製の試料インサート [研究業績 3]

上記のクライオ対物鏡の開発に加えて、我々はクライオ蛍光顕微鏡本体も独自開発している。そ

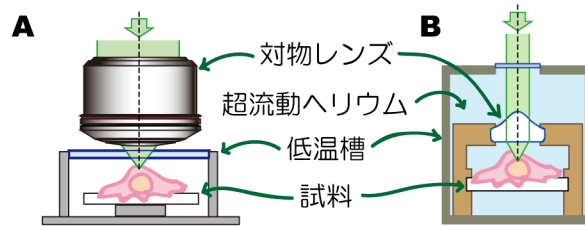


図 3. 対物レンズを低温槽外側 (A) および内側 (B) に設置しているクライオ蛍光顕微鏡.

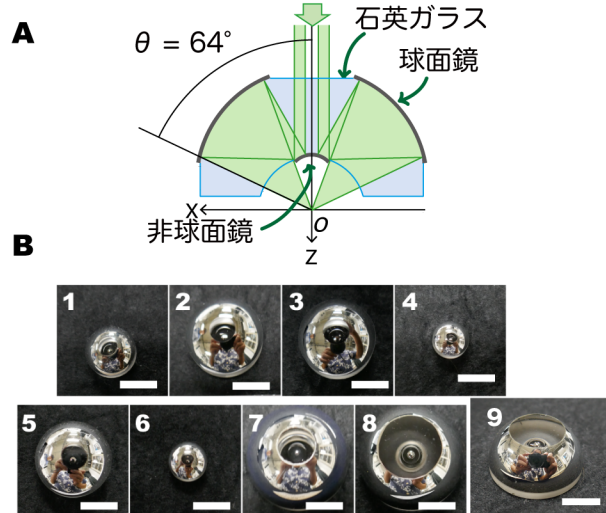


図 4. (A) 極限性能を持つクライオ対物鏡 (8 代目) の図面と (B) 各世代の対物鏡. 左上の数字が世代数を表す. スケールバーは 15 mm.



のコンセプトは、高い剛性と熱膨張係数の整合である。図 5A は、超流動ヘリウムに挿入するチタン製試料インサートの写真である。熱膨張係数を整合させるために、材料にチタンとアルミナを用いた。その結果、蛍光イメージのドリフトの温度係数が 1 nm/mK となった。超流動ヘリウムは熱伝導性と流動性が極めて高い冷媒であるため、1 対のヒーターと温度計だけで、温度変化を  $\pm 0.1$  mK で制御できる。結果として、温度変化に由来するイメージドリフトを 0.1 nm に抑えている。

図 5B は、1 世代前の試料インサートである。このインサートでは、チタンと熱膨張係数が大きく異なる真鍮とテフロンを用いていた。このため、温度変化を  $\pm 0.1$  mK に抑えても、顕著にドリフトしていた。

研究業績 3. 古林 琢・本橋和也・若尾 圭祐・松田 剛・喜井 勲・細谷孝充・林宣宏・定家真人・石川冬木・松下道雄・藤芳 暁 「Three-Dimensional Localization of an Individual Fluorescent Molecule with Angstrom Precision」  
*Journal of the American Chemical Society*・139 号・P. 8990-8994・2017 年.

### (3) 高い耐環境性の顕微光学系 [研究業績 3]

試料インサートの工夫に加えて、光学系の耐環境性能を向上させることで、顕微鏡の安定化に取り組んでいる。図 5C は製作した顕微光学系である。これは通算 18 台目の顕微鏡である。光学系は気密性と剛性の高いステンレス製箱に入れて、個々のユニットにしている。このようなデザインにすることで、室温の変化やポンプの振動ナノ度の外乱から隔離することができる。図 5C に矢印で示したのが、空間フィルターユニットと CCD 結像系ユニットである。これらの工夫の結果、クライオ蛍光顕微鏡のイメージ安定性を、世界最高の 0.05 nm (10 分間での標準偏差) に引き上げることに成功した。このクライオ蛍光顕微鏡を用いて、オングストローム精度で、蛍光色素 1 分子の三次元位置を決定することに成功している。

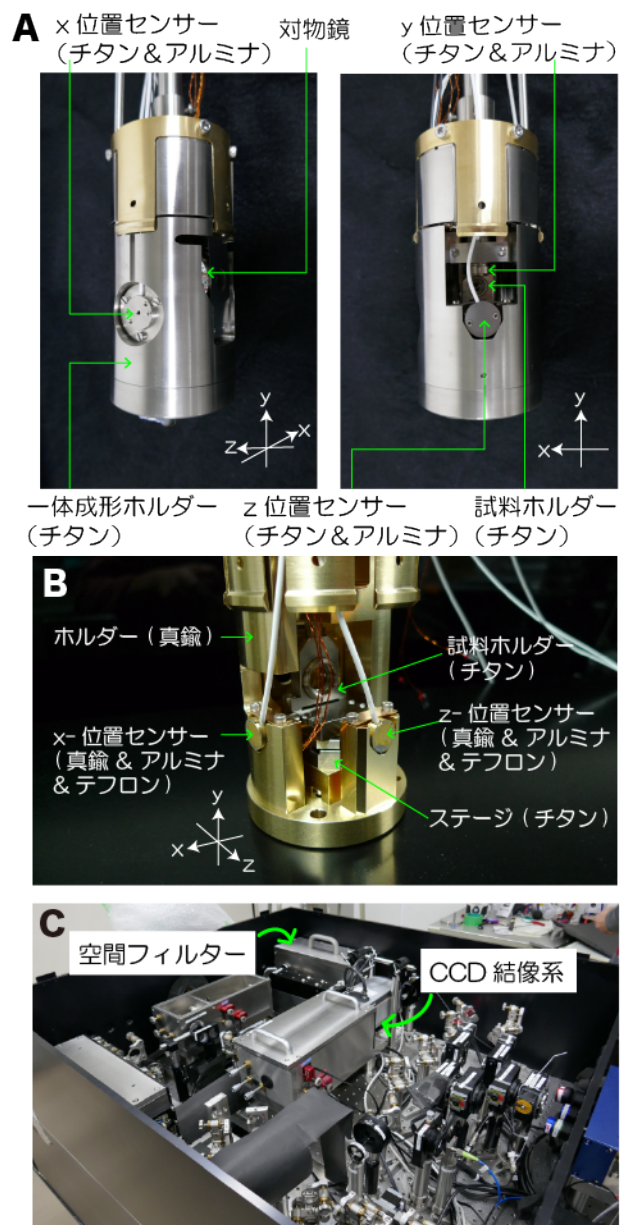


図 5. (A) チタン製インサート . (B) 1 世代前のインサート . (C) クライオ蛍光顕微鏡 .

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Furubayashi Taku, Ishida Keita, Kashida Hiromu, Nakata Eiji, Morii Takashi, Matsushita Michio, Fujiyoshi Satoru	4. 巻 10
2. 論文標題 Nanometer Accuracy in Cryogenic Far-Field Localization Microscopy of Individual Molecules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 5841 ~ 5846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.9b02184">https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.9b02184</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Masanori, Ishii Takaki, Ishida Keita, Toratani Yasuharu, Furubayashi Taku, Matsushita Michio, Fujiyoshi Satoru	4. 巻 115
2. 論文標題 Aberration-corrected cryogenic objective mirror with a 0.93 numerical aperture	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Physics Letters	6. 最初と最後の頁 033701 ~ 033701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1063/1.5110546">https://doi.org/10.1063/1.5110546</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tabe Hiroaki, Sukenobe Kei, Kondo Toru, Sakurai Atsunori, Maruo Minako, Shimauchi Akari, Hirano Mitsuharu, Uno Shin-nosuke, Kamiya Mako, Urano Yasuteru, Matsushita Michio, Fujiyoshi Satoru	4. 巻 122
2. 論文標題 Cryogenic Fluorescence Localization Microscopy of Spectrally Selected Individual FRET Pairs in a Water Matrix	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 6906 ~ 6911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpccb.8b03977	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 古林 琢・本橋和也・若尾圭祐・松田 剛・喜井 勲・細谷孝充・林 宣宏・定家真人・石川冬木・松下道雄・藤芳 暁	4. 巻 139
2. 論文標題 Three-Dimensional Localization of an Individual Fluorescent Molecule with Angstrom Precision	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 8990-8994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.7b03899	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤芳 暁
2. 発表標題 三次元カメラ共焦点クライオ(C3)蛍光顕微鏡
3. 学会等名 放射線影響学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝内雄太、石井啓暉、中田栄司、森井孝、藤芳暁、松下道雄
2. 発表標題 DNAオリガミを用いたクライオ超解像蛍光イメージング用色素の探索
3. 学会等名 分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田剛、古林 琢、松下道雄、藤芳暁
2. 発表標題 三次元カメラ共焦点顕微鏡によるクライオ1分子イメージング
3. 学会等名 分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古林 琢、中田栄司、森井孝、藤芳暁、松下道雄
2. 発表標題 クライオ蛍光顕微鏡による分子確度イメージングの実現
3. 学会等名 分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 滝島研人, 古林琢, 松下道雄, 藤芳暁
2. 発表標題 温度安定化循環水によるクライオ蛍光顕微鏡のナノレベル安定化
3. 学会等名 日本物理学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田啓太, 藤芳暁, 松下道雄
2. 発表標題 高開口数蛍光顕微鏡の界面屈折に由来する収差の研究: メニスカスレンズによる収差補正
3. 学会等名 日本物理学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井啓暉, 虎谷泰靖, 藤原正規, 石田啓太, 藤芳暁, 松下道雄
2. 発表標題 開口数0.93の収差補正クライオ対物鏡の開発
3. 学会等名 日本物理学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井啓暉, 虎谷泰靖, 藤原正規, 石田啓太, 藤芳暁, 松下道雄
2. 発表標題 高開口数かつ広視野のクライオ対物鏡
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 石田 啓太, 藤芳暁, 松下道雄
2. 発表標題 クライオ蛍光顕微観察における界面屈折に由来する収差の光学シミュレーションによる研究
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古林琢, 石田啓太, 松下道雄, 藤芳暁
2. 発表標題 クライオ蛍光顕微鏡による二本鎖DNAの1分子光イメージング
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 富永波輝, 松下道雄, 藤芳暁
2. 発表標題 クライオ1分子顕微鏡の機械的安定化
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田 剛, 藤芳 暁, 松下 道雄
2. 発表標題 生体内1分子イメージングのための三次元カメラの開発
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古林琢, 石田啓太, 松下道雄, 藤芳暁
2. 発表標題 3次元点像分布関数を測定することによる分子レベル光イメージング：実験
3. 学会等名 日本物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田啓太, 古林琢, 松下道雄, 藤芳暁
2. 発表標題 3次元点像分布関数を測定することによる分子レベル光イメージング：光学シミュレーション
3. 学会等名 日本物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤芳暁
2. 発表標題 クライオ蛍光顕微鏡で分子を見ると
3. 学会等名 第27回バイオイメージング学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井啓暉, 古林 琢, 藤芳 暁, 松下道雄
2. 発表標題 クライオ 1 分子蛍光顕微鏡のための試料走査機構の製作
3. 学会等名 日本物理学会 秋季年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松田 剛, 古林 琢, 藤芳 暁, 松下 道雄
2. 発表標題 1 分子の 3 次元位置をショットノイズ限界で測定可能な 顕微法の光学シミュレーション
3. 学会等名 日本物理学会 秋季年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古林 琢, 松下道雄, 藤芳 暁
2. 発表標題 クライオ1分子蛍光顕微鏡の高精度化に向けた技術開発
3. 学会等名 日本物理学会 秋季年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 資延 啓, 田邊大明, 石井啓暉, 松田 剛, 古林 琢, 松下道雄, 藤芳 暁
2. 発表標題 クライオ超解像蛍光顕微鏡の制作
3. 学会等名 分子科学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古林琢, 松下道雄, 藤芳暁
2. 発表標題 三次元分子解像度のクライオー分子蛍光顕微鏡
3. 学会等名 日本物理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 資延啓, 田邊大明, 藤芳暁, 松下道雄
2. 発表標題 スペクトル選択クライオ超解像顕微法のための色素の探索
3. 学会等名 日本物理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古林 琢・松下 道雄・藤芳 暁
2. 発表標題 生体分子の高精度3Dイメージングを目指したクライオ蛍光顕微鏡の開発
3. 学会等名 日本化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤芳 暁
2. 発表標題 絶対零度で蛍光1分子を見る
3. 学会等名 日本生物物理学会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	林 宣宏  (Hayashi Nobuhiro)  (80267955)	東京工業大学・生命理工学院・准教授    (12608)	