

令和 6 年 4 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14704

研究課題名（和文）ペプチド原子分解能イメージング法開発に基づく自己集合過程の解明

研究課題名（英文）Elucidating self-assembly processes based on the development of peptide atomic-resolution imaging

研究代表者

中室 貴幸（Takayuki, Nakamuro）

東京大学・総括プロジェクト機構・特任准教授

研究者番号：30831276

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：単分子原子分解能時間分解電子顕微鏡法（SMART-EM）の開発を進め、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の治療薬であるダプトマイシンの単分子イメージングならびにカルシウム依存的な自己集合過程を詳細に解析した。また、N-アルキルペプチド（ペプトイド）のイメージングへと応用し、その剛直な構造が真空下で保持されることを発見した。この技術は他の柔軟な分子ならびに他の自己集合性ペプチドのイメージングにも展開可能であることがわかった。本研究で開発した透過電子顕微鏡を用いた方法論は、単分子観察に基づく構造特性評価法としての展望を拓くと期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己集合現象は広範な科学分野での重要な研究テーマであり、本研究ではペプチド凝集挙動に着目した研究を進めた。ペプチド凝集挙動の解明は、物理的性質を理解するだけに留まらず機能性マテリアルへの合成応用など基礎から応用研究まで重要とされる。原子分解能イメージング法の開発によって単分子から凝集体に対する精緻な構造情報の取得が可能となった。本手法は、分子の剛直性や結合様式の理解を深めるだけでなく、得られた知見を創薬研究へ応用する道を拓くと期待される。

研究成果の概要（英文）：This report outlines the development and application of Single-Molecule Atomic Resolution Time-Resolved Electron Microscopy (SMART-EM) in the study of molecular dynamics in complex systems. I employed this innovative method to closely analyze the calcium-dependent self-assembly process of Daptomycin, a drug used to treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Additionally, the technique was applied to image N-alkyl peptides (peptoids), revealing that their rigid structures are maintained under vacuum conditions. Our findings suggest that SMART-EM is also applicable to imaging other flexible molecules and other peptides. This methodology opens new avenues for the structural characterization of molecules at the single-molecule level using transmission electron microscopy.

研究分野：電子顕微鏡学

キーワード：electron microscopy peptide single-molecule self-assembly atomic-resolution

## 1. 研究開始当初の背景

ペプチド凝集挙動の解析は、構造体の物理的性質を理解するだけに留まらず創薬設計指針の獲得など基礎から応用研究まで重要とされる。ペプチドは数 kDa 程度の有機中分子であり、系のアンサンブル平均情報を与える核磁気共鳴 (NMR) や X 線結晶構造解析が一般的な分析ツールとして用いられるが、これらは凝集体の分析には不向きとされる。一方、単分子観察法の一つである原子間力顕微鏡 (AFM) は、水平方向の分解能が数ナノメートル程度とされており、ペプチド分子間相互作用の詳細を捉えることが難しいと考えられる。これらの背景のもと、広く自己組織化現象に対しての知識を進歩させる新たな分析技術およびイメージング法の開発が求められていた。

## 2. 研究の目的

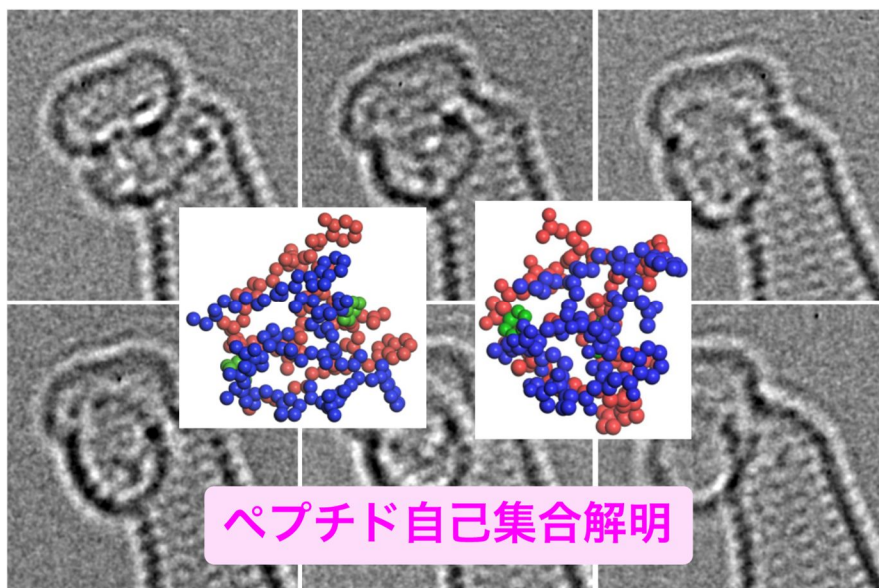
ペプチド原子分解能イメージング法を開発し、会合体解析へと応用発展させることによって分子レベルでの現象の解明、および制御に資する知見を創出することが目的となる。特に Single-Molecule Atomic-Resolution Time-resolved Electron Microscopy (単分子原子分解能時間分解電子顕微鏡法, SMART-EM) による単分子観察は非周期構造への新たな分析法として期待されていたが、研究開始当初においてはその適応範囲は明らかでなかった。即ち電子顕微鏡 (TEM) が開発されて以来、有機分子の電子線に対する脆弱性が指摘されていたためであり、cryo-EM が発達した近年においても電子線を用いた有機分子のイメージングには、サンプル調製法の確立、観察条件の妥当性の検証、撮像分子の解釈など研究発展のためには解決すべき多くの課題が存在していた。ペプチドに存在するアミノ酸残基間の化学選択性の克服によるペプチドサンプリング手法の開発、超分子相互作用を利用した会合体釣り上げ条件の選定、温度や照射電子線量などの電顕観察条件の最適化、動的光散乱 (DLS) と SMART-EM の相関関係の定量評価を通じて、本申請研究を完遂することを目指す。

## 3. 研究の方法

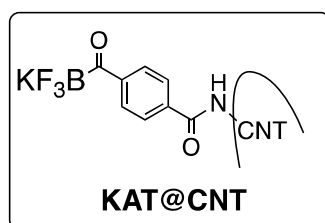
炭素材料であるカーボンナノチューブ (CNT) もしくは円錐型 CNT であるカーボンナノホーン (CNH) に観察対象とする分子を結合させ、「単分子実時間」で TEM 撮影ならびに解析を行う。レベルの空間分解能で分子を視るといった基本的な実験事実で立脚し、ミリ秒レベルの時間分解能を有する撮像による分子の精緻な挙動、100 秒を超える連続追跡から時間発展の振る舞いを捉え、過渡的に生成する準安定状態から熱力学的な安定構造までの詳細な解析を行う。本提案の主眼である単分子統計、すなわち CNH に捕捉する数十～数百におよぶ会合体の精緻な統計的解析から系の全容把握を行うべく TEM 実験を進める。DLS は溶液中の粒子サイズしか推定できないが、SMART-EM によって正確な分子サイズの計測、凝集数の把握、相互作用の顕在化など従前の手法では得難い分子描像の獲得から会合現象の本質に迫る。

## 4. 研究成果

ダプトマイシン (DP) は、中分子ペプチドであり独特の作用機序により多剤耐性グラム陽性菌に対して有効とされている。一般的な作用機序として、 $\text{Ca}^{2+}$  による DP オリゴマー形成が提案されてきたが、DP 分子とそのオリゴマー構造はこれまで分子レベルでの構造解析が困難であった。本研究では、水中での DP 分子の自己集合挙動、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンが集合を促進する効果、そして DLS と CNT 上で捕捉した DP 分子の原子分解能映像撮影を組み合わせることでオリゴマー内の DP 分子の構造ならびに結合状態を探求した。DP 分子は水中で弱く二量体、三量体、四量体に集合し、カルシウムイオンの存在下でその集合挙動が増強されること、そして今回の実験条件においては四量体が均一な水溶液中で最大のオリゴマーであることを発見した。二量体はさまざまな濃度ならびにカルシウムイオンの等量数の条件下で主要な化学種として存在することがわかり、ミリ秒およびオングストローム時空間分解能を有する透過電子顕微鏡を使用した動的イメージングに基づいて集合体の構造を提案することができた。この研究によって、DP 分子が水中で四量体を形成する固有の特性を持ち、カルシウムイオンの存在によってその特性が強化されることが示された。このような実験的構造情報は新しく、将来の薬剤設計のためのプラットフォームとして機能すると期待され、データはまた、自己集合プロセスの研究のための分子動態の映像撮影の有用性を示している。



上述の DP 研究では、下記に構造を示す CNT 誘導体を開発した (KAT@CNT)。第一級アミンと選択的に反応する KAT 構造の特異性を利用することで DP と反応させることができたが、その適応範囲の探索が必須であった。そのため、他のアミノ基を有する化合物も DP と同様に KAT@CNT に結合できるか、つづいて SMART-EM 解析へと展開できるか検証した。予備的な検討の結果、ペプチドや他の自己集合が問題となっているペプチドのモデル化合物も、KAT の反応性が予測するように高い修飾率を示していることが判明し、KAT@CNT がアミノ基を有する化合物の釣り上げに適した構造体であることがわかった。今後の更なる展開が見込まれる。



また、本研究課題の遂行にはミリ秒撮影や低電子線照射条件などの TEM 撮像が必須であった。そのため TEM 撮影法の習熟を目的に、柔軟な分子群の撮影も同様に検討し、得られた知見をペプチド類のイメージング条件として転用した。また、これまでの分子群の TEM 撮影における研究の変遷も踏まえ、学会発表ならびに総説を発表した。

以上、本研究を通じてペプチド原子分解能イメージング開発、つづく自己集合過程の解明を目指した一連の TEM 研究方法を推進した。本来混合物を与える自己集合過程であっても、一分子ずつ、もしくは一粒子ごとに解析することで、精緻な構造情報の獲得を達成できることがわかってきた。本研究手法の応用可能性も見出しており、本申請研究をもとに更なる研究展開が見込まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamuro Takayuki, Kamei Ko, Sun Keyi, Bode Jeffrey W., Harano Koji, Nakamura Eiichi	4. 巻 144
2. 論文標題 Time-Resolved Atomistic Imaging and Statistical Analysis of Daptomycin Oligomers with and without Calcium Ions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 13612 ~ 13622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c03949	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 該当する

1. 著者名 Ishikawa Toru, Tanaka Fumihiko, Kurushima Kosuke, Yasuhara Akira, Sagawa Ryusuke, Fujita Tatsuya, Yonesaki Ryohei, Iseki Katsuhiko, Nakamuro Takayuki, Harano Koji, Nakamura Eiichi	4. 巻 145
2. 論文標題 Wavy Graphene-Like Network Forming during Pyrolysis of Polyacrylonitrile into Carbon Fiber	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 12244 ~ 12254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.3c02504	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 Harano Koji, Nakamuro Takayuki, Nakamura Eiichi	4. 巻 73
2. 論文標題 Cinematographic study of stochastic chemical events at atomic resolution	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 101 ~ 116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfad052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中室貴幸
2. 発表標題 ナノ精密合成と分子動態の連続追跡法の融合 映像分子科学の黎明
3. 学会等名 日本化学会第103春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中室貴幸
2. 発表標題 今まさに結晶ができるところを見る
3. 学会等名 化学への招待-講演会「分析化学の最前線」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中室貴幸
2. 発表標題 目で見る科学研究および教育の実践：映像分子化学の黎明
3. 学会等名 錯体化学若手の会夏の学校2022(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中室貴幸
2. 発表標題 原子分解能での核形成・結晶成長プロセスのその場観察
3. 学会等名 日本物理学会2023年春季大会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takayuki Nakamuro
2. 発表標題 Structural Fluctuations of Nanoclusters Captured by Molecular Electron Microscopy
3. 学会等名 Atomically Precise Nanochemistry Gordon Research Conference(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中室貴幸, 亀井恒, Jeffrey W. Bode, 原野幸治, 中村栄一
2. 発表標題 分子釣り針で探るペプチド自己組織化過程における単分子動態
3. 学会等名 第32回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中室貴幸, Olivier Chevalier, Rui SHANG, 中村栄一
2. 発表標題 分子釣り針で捕捉した深青色発光ペロブスカイト量子ドットの動的原子像
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第78回学術講演会
4. 発表年 2022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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
スイス	ETH Zurich		