

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23685002

研究課題名(和文)インフルエンザウィルスのプロトンチャネルの高次構造の一分子観測

研究課題名(英文)Single-molecule observation of a higher order structure of a proton channel in influenza virus

研究代表者

藤芳 暁 (Fujiyoshi, Satoru)

東京工業大学・理工学研究科・助教

研究者番号：70371705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 22,500,000円、(間接経費) 6,750,000円

研究成果の概要(和文)：温度1.5 Kに冷却した生体分子の三次元イメージングをするための1分子蛍光顕微鏡を開発した。この顕微鏡の特性をQdotにより評価した。まず、この顕微鏡は635、532、405 nmのどの波長でも色収差なく使用することが可能であった。さらに、その焦点付近の光分布(点像分布関数)は理論値の1.2倍以下であった。これを用いて、2個の分子の位置決定精度(解像度)を見積もったところ、焦平面方向が3 nm、光軸方向が18 nmであった。

研究成果の概要(英文)：A laser-scanning confocal microscope was developed for three-dimensional (3D) imaging and co-localization of single biomolecules immobilized at a temperature of 1.5 K. The performance was demonstrated by taking 3-color 3D emission image of single quantum dots and 3D co-localization of single dots. The 3D image size of single dot with excitation wavelength of 635, 532, and 405 nm were all within 1.2 times of the diffraction-limited size. The 3D co-localization precision of single dot in images taken with 635 and 532 nm excitation was 3 nm in the lateral (x, y) and 18 nm in the axial (z) directions.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：タンパク質 1分子観察 低温 分光 構造

1. 研究開始当初の背景

本課題では、インフルエンザウィルスのプロトンチャンネルとして働く膜タンパク質を研究対象としている。プロトンチャンネルは増殖過程に必須のウィルス内部の酸性化に寄与するため、阻害剤のターゲットとなっている。しかし、この系は、薬剤耐性が深刻化している。具体的には、チャンネルの阻害剤として開発されたアマンタジンは、疎水性相互作用を利用してチャンネルのポアをふさぐという単純な薬剤であるため、90%以上のウィルスが耐性を獲得している。このため、創薬の観点から、チャンネルの開閉機構の解明とそれぞれの状態での構造決定が望まれている。

これまでの研究から、チャンネルの開閉と立体構造（特に四次構造）に相関があると予想されている。X線およびNMR構造解析により決定されたチャンネルタンパク質の膜貫通領域の平均構造は明らかに異なっており、その違いは、X線では開いた状態のチャンネル、NMRでは閉じた状態が観測されたと解釈されている。しかし、このモデルを検証するのは難しい。それは、生体膜中では、開閉状態にあるチャンネルや、異なる種類の糖タンパク質などが混在し、それぞれのタンパク質が組織立って働いているからである。このような混在系を正確に理解するには、生体膜の中から1チャンネルずつ選択して、それぞれの高次構造を決定することが望ましい。そこで、本課題では、(既存の方法では不可能である)このような測定を実現するための新たな方法論の開発に挑戦した。

2. 研究の目的

インフルエンザウィルスのチャンネルタンパク質の開閉機構の解明のために、光によって、タンパク質の高次構造を1分子ごとに決定する新たな手法を開発することにある。NMRやX線によって得られた平均構造から、チャンネルの開閉に伴い、その高次構造（特に四次構造）が大きく変化すると予想されている。しかし、このモデルだけでは、実際の系での機能を理解し、制御する

のは難しい。それは、生体膜中では、開いた状態と閉じた状態にあるチャンネルや、異なる種類のタンパク質が混在し、それぞれが組織立って機能を呈しているからである。このため、1種類のタンパク質を取りだして平均構造を観測するだけでは情報として不十分である。そこで、本課題では、混在系の中から目的のタンパク質を選択し、その高次構造を1分子観測できる方法論を確立することにある。

3. 研究の方法

タンパク質の高次構造を1分子観測するためには、研究代表者は光による観測が有効であると考えた。光は、(1)細胞内を非破壊・非接触での分析、(2)三次元情報の取得、(3)1分子レベルの観測ができるという大きなポテンシャルを持っている。また、一分子観測を用いれば、三次元方向、約10 nmの精度で、蛍光色素の位置を決定することができる。しかし、1分子からの信号は微弱であり、高い位置決定精度を得るためには、長時間の積算時間が必須であると欠点を持つ。タンパク質は細胞の中をマイクロ秒の拡散定数で移動し、すばやくその集合状態を変えている。このようなタンパク質を長時間、観察し続ければ、分子レベルの情報が失われてしまう。そこで、本課題では、細胞周期や外部刺激にタイミングを合わせ、試料を瞬間凍結し、その瞬間のスナップショットを長時間に渡り測定する。これにより、(室温の観測では時間平均されて消えてしまう)真に分子レベルで動的秩序形成の観察をおこなうことができる。残念ながら、インフルエンザのプロトンチャンネルの構造解析には至らなかったが、それにつながる以下のような要素技術開発には成功した。

4. 研究成果

我々は、当該課題を実現するために2台の蛍光顕微鏡を製作した。一つ目は、研究計画書に記載した極低温実験用の反射型三次元蛍光顕微鏡である。これは、我々が2007年に開発した反射対物レンズを元にした顕微

鏡である。低温槽外部から光の特性を変えることで、対物レンズと試料の相対位置を変えることなく、三次元レーザー走査が出来るユニークなものである。我々は、当該課題により 2013 年に、対物レンズと試料とを共に液体ヘリウム中に浸すことで、15 分間にわたり機械的安定性を 1 nm 以下に抑えることに成功している[主な発表論文、雑誌論文 4]。この技術と三次元レーザー走査機構を組み合わせることで、精密な位置決定の出来る蛍光顕微鏡を製作した。

この顕微鏡に関する成果は、主な発表論文 [雑誌論文 5] のように、すでに Chemical Physics Letters 誌に報告済みである。しかし、この顕微鏡の三次元解像度を評価したところ、焦平面方向は 3 nm とプロトンチャンネルを測定するのに十分な解像度が達成されたが、光軸方向は 18 nm と満足のいく解像度が達成できなかった。

光軸方向の解像度が上がらなかったのは、対物レンズの性能が焦平面方向で悪いからである。これを良くするためには、開口数 NA を向上させなければならない。ところが、我々がこれまで用いてきたデザインの対物レンズでは NA = 0.58 が限界である。これは、用いる球面鏡の球面収差によるものである。そこで、NA を極限まで向上させるべく、非球面鏡を用いた対物レンズを開発した。その結果、NA = 0.99 の反射対物レンズの開発に成功した。この反射対物レンズは極限の性能を持ちながら、これまで我々が用いてきた対物レンズと同じように、低温から常温まで切れ目無く使えるという特長を持つ。これまでに、この対物レンズを用いた 2 台目の蛍光顕微鏡を試作し、解像度の見積りをおこなっている。その結果、非球面反射対物レンズを用いれば、焦平面方向の解像度が 0.8 nm、光軸方向の解像度が 2 nm が達成されると見積もっている。これは、プロトンチャンネルの立体構造を観察するのに十分な解像度である。現在、当該研究の目標であるプロトンチャンネルの観察を目指し、実験を続けている。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

[1] 丸尾美奈子・稲川博敬・虎谷泰靖・近藤徹・松下道雄・藤芳 暁

「Three-dimensional laser-scanning confocal reflecting microscope for multicolor single-molecule imaging at 1.5 K」(査読有り)

Chemical Physics Letters・591 号・P. 233-236・2014 年

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cpllett.2013.11.039>

[2] 日野原拓也・濱田裕紀・中村一平・松下道雄・藤芳 暁

「Mechanical stability of a microscope setup working at a few kelvins for single-molecule localization」(査読有り)

Chemical Physics・419号・246-249・2013年.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphys.2013.02.024>

[3] 藤原正規・藤芳 暁・松下道雄

「Single-component objective for low-temperature imaging and spectroscopy of single nano objects」(査読有り)

Physica Procedia・13号・P.38-41・2011年.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phpro.2011.02.009>

[4] 内山大輔・星野 創・大友康平・加藤太郎・恩田賢一・渡邊 瑛・小井川浩之・藤芳 暁・松下道雄・南後 守・出羽毅久

「Single-protein study of photoresistance of pigment - protein complex in lipid bilayer」(査読有り)

Chemical Physics Letters・511 号・P.135-137・2011 年.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cpllett.2011.06.019>

[5] 内山大輔・小井川浩之・大友康平・南後守・出羽毅久・藤芳 暁・松下道雄

「Reconstitution of bacterial photosynthetic unit in a lipid bilayer studied by single-molecule spectroscopy at 5 K」(査読有り)

Physical Chemistry and Chemical Physics・13号・P.11615-11619・2011年.

DOI: 10.1039/C1CP20172G

[学会発表](計 13 件)

[1] 中村一平・藤芳 暁・松下道雄

「固体中の単一核スピンの光観測に向けた Pr³⁺のイオン分光」

日本物理学会・2013 年 9 月 25~28 日・徳島大

[2] 中村一平・吉弘達矢・稲川博敬・藤芳 暁・松下道雄

「固体中のPr³⁺の一オン発光検出」

分子科学討論会・2013年9月24~27日・京都テルサ

[3] 若尾 佳佑・濱田 裕紀・日野原 拓也・松下道雄・藤芳 暁

「温度1.5 Kのタンパク質1分子イメージング装置の機械的安定性評価と向上」

分子科学討論会・2013年9月24~27日・京都テルサ

[4] 虎谷 泰靖・丸尾 美奈子・稲川 博敬・喜井 勲・林 宣広・細谷 孝充・松下 道雄・藤芳 暁

「温度数Kの色素分子の3次元イメージング技術の設計と実現」

分子科学討論会・2013年9月24~27日・京都テルサ

[5] 近藤 徹・武藤梨沙・栗栖源嗣・大岡宏造・藤芳 暁・松下道雄

「光合成反応中心タンパク質の極低温1分子分光」

分子科学討論会・2013年9月24~27日・京都テルサ

[6] 稲川博敬・松下道雄・藤芳 暁

「限界性能を持つ反射対物レンズの開発と数Kでの色素1分子イメージングへの応用」

分子科学討論会・2013年9月24~27日・京都テルサ

[7] 丸尾美奈子・稲川博敬・松下道雄・藤芳 暁

「温度数Kにおける色素1分子の3次元イメージング」

日本物理学会第68回年次大会・2013年03月27日・広島大学

[8] 藤芳 暁

「Observation of vibrational absorption of single proteins at a few kelvins」

第50回日本生物物理学会年・2012年09月23日・名古屋大学

[9] 稲川博敬・松下道雄・藤芳 暁

「開口数0.8の極低温用対物レンズ：一分子蛍光観測による評価」

日本物理学会秋季大会・2012年09月20日・神奈川県川崎市

[10] 稲川博敬・松下道雄・藤芳 暁

「温度数Kにおける一分子分光のための高開口数対物レンズの開発」

分子科学討論会・2012年9月19日・東京大学

[11] 藤芳 暁、大友 康平、古屋 陽、

出羽 毅久、南後 守、伊関 峰生、渡辺 正勝、松下 道雄

「タンパク質1分子の中赤外吸収観測」

生体分子科学討論会・2012年06月09日・東北大学

[12] 藤原正規、平野充彦、渡辺正勝、伊関峰生、藤芳暁、松下道雄

「温度数ケルビンのタンパク質1分子分光装置の機械的安定性の評価」

分子科学討論会・2011年9月21日・札幌コンベンションセンター（札幌）

[13] 日野原拓也、濱田裕紀、松下道雄、藤芳暁

「温度数ケルビンのタンパク質1分子分光装置の機械的安定性の評価」

分子科学討論会・2011年9月21日・札幌コンベンションセンター（札幌）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤芳 暁 (SATORU FUJIYOSHI)

東京工業大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：70371705