

研究終了報告書

「生体分子機能の理解に資するハイブリッドナノ振動分光法の創出」

研究期間：2021 年 10 月～2024 年 3 月

研究者：加藤 遼

1. 研究のねらい

タンパク質などの生体分子の機能は、化学反応や構造変化を起こし発現する。ゆえに、生体分子の化学構造情報を 1 分子レベルで分析することが生命機能の理解に必要である。これまでに、X 線結晶構造解析や高速原子間力顕微鏡などの計測技術の発展によって、生体分子の基本構造や構造変化に伴う形状変化が明らかになり、機能発現の原理等が議論されてきた。この現状を踏まえ、生命機能を更に理解するには、機能発現の前後の化学構造や分子状態の変化をその場計測し、試料の化学構造と形状変化の関連性を繋ぐ知見を得ることが重要だと考えた。

単一分子の化学構造情報を計測する手法として、光と金属の相互作用による光の局在効果と原子間力顕微鏡 (AFM) を利用したナノラマン分光法とナノ赤外分光法がある。これらの手法は、先鋭化した金属探針に光を照射し先端に生じるナノサイズの局在光によって励起されたラマン散乱または赤外散乱信号を検出する。ラマン分光法と赤外分光法で計測できる分子振動は互いに異なり相補的である。そのため、多数の分子種から構成される生体試料の化学構造変化や分子振動状態の相対変化を観察するためには、ラマン散乱と赤外吸収を同時に取得する必要がある。しかし、それらのナノ分光法は同じ基盤技術に立脚するにも関わらず、2 つを複合した計測法は未だ無い。その理由は、波長領域が大きく異なる散乱信号を検出する系が別々に必要だからである。そこで、同じ波長領域の光信号を検出してラマン散乱と赤外吸収情報を同時に取得できる新奇なナノ振動分光法を創出することで、生命機能の発現に伴う分子の化学構造変化や分子振動の協奏性を観測でき、生体分子観察の現状を打破できるという着想に至った。

本研究の目的は、単一分子の分子振動を網羅計測するハイブリッドナノ振動分光法を創出し、生体機能に関連する化学構造変化や分子振動の協奏性を解明することである。そのためにナノ振動分光法の要素技術開発や可視光をプローブ光とする赤外分光法の開発を行う。また、分子間相互作用が機能に与える影響を観察する計測手法にも挑戦する。

本手法はタンパク質やペプチドに限らず、分子集合体などの高次構造体の観察にも展開可能であり、それらが示す生物機能とその作動原理を化学構造変化の観点から明らかにできる。

2. 研究成果

(1) 概要

当初の目的は、ナノラマン分光・ナノ赤外分光を共立した、生体1分子の機能解明に資する新たなナノ分光法の開発であった。しかし研究過程にて、ナノラマン分光だけでも生体分子の機能を十分議論できる有意なデータが得られた。そこで2年目からは、ナノラマン分光を基軸とした手法開発と計測応用により、単一タンパクの構造解析の実証に注力した。

生体1分子の微弱なラマン散乱光を高感度かつ、定量性高く計測する基盤を確立した。従来装置の課題であった経時測定結果の定量性の低さを解決するための技術開発を行なった。これにより、経時記録したラマンスペクトルの定量性を担保でき、分子の構造変化を精緻に計測することや、従来の12倍(μm スケール)の視野のナノラマンイメージングを可能にした。他にも、顕微鏡の光学素子や制御系の改良など些細だが重要な技術改良を行い、生体1分子のラマン散乱を高感度検出できる基盤を確立した。

無機材料上に自己組織構造を形成するクモ糸タンパク(NR7C)の分子構造情報を単一分子レベルで明らかにし、生体分子計測への応用性を示した。単一タンパク計測では、NR7Cの2次構造が β シートだと同定できただけでなく、NR7C内のアミド結合とトリプトファンの分子振動数の時間変化を観察し、単一タンパク内の分子振動の“揺らぎ”の観察にも成功した。

一方で、1細胞レベルのラマン・赤外分光解析の需要が本領域で大きいことを知ったため、申請者の顕微イメージング技術を活かした共同研究も進めた。ACT-X研究内で新たに開発した顕微赤外イメージングによる藍藻バイオフィルムの可視化に関する研究も成果を得ている。

(2) 詳細

1. 生体1分子計測へ向けたナノラマン分光法の技術改良と生体機能解析の実証

初めに、生体1分子からの微弱なラマン散乱光を高感度かつ、定量性高く計測する基盤を確立した。ナノメートルの精度で探針や試料を制御する必要があるナノラマン装置は、周囲の温度変化による熱ドリフトが測定に大きく影響する。時間の経過と共に、ドリフトの影響により探針が入射光の中心からズレたり、対物レンズの位置がズレたりする。そのため、従来のナノラマン装置は、経時測定した結果の定量性が低いことが課題であった。そこで、装置の熱ドリフトをリアルタイムかつナノメートルの高精度で補正する機構を新たに開発することで、時間的に安定で、定量性の高いナノラマン測定を実現した。実際には、金属探針と対物レンズのドリフトをそれぞれ補正する別々のシステムを開発し、装置に導入した(図1a,b)。図1cに、開発した手法を用いてナノラマン分析を連続的行なった結果を示す。ドリフト補正がない場合、時間と共にラマン散乱の強度が減少することがわかる。一方で、ドリフト補正がある場合は、強度の減少がなく、時間的な定量性が担保されている。これにより、経時記録したラマンスペクトルの定量性を担保でき、分子の構造変化を精緻に計測することを可能にした。また、時間的に安定であるということは、広い視野でのイメージングが可能であることを意味する。従来の12倍の視野での(微生物スケール)ナノラマンイメージングも実現した(図1d)。本成果は、生体1分子の機能解析だけでなく、微生物の細胞壁・生体膜イメージングへの応用も開拓し得る大きな技術進歩である[*Science Advances*, (2022)]。その他にも、顕微鏡の光学素子や制御系の改良[*Sci. Rep.*, (2022)], 金属探針の形状の最適化など、些細だが重要な技術改良を行い、生体1分子のラマン散乱を

従来の 20 倍の感度で安定的に検出できる計測基盤を確立した。

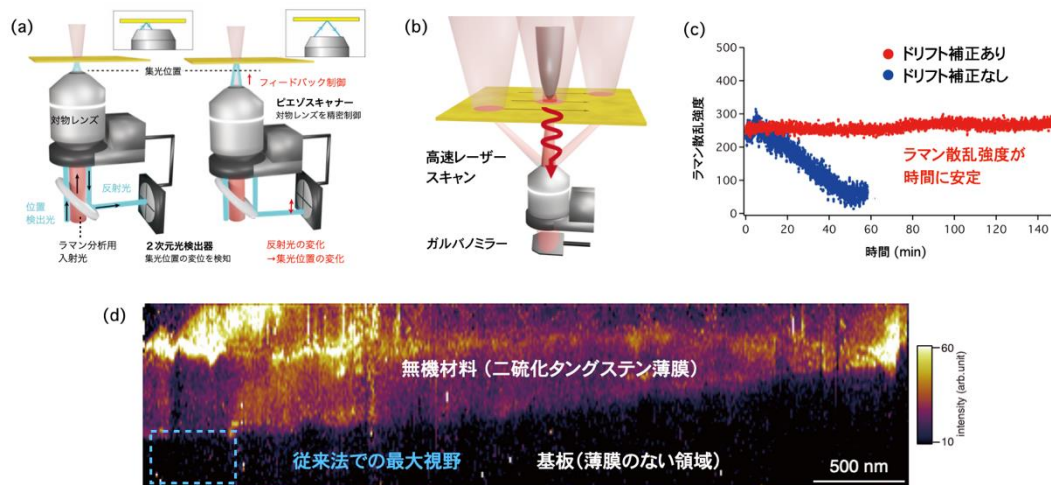


図 1. 開発した(a)対物レンズと(b)金属探針のドリフト補正技術。(c)ナノラマン分光測定的时间安定性評価。(d)広視野・高安定ナノラマンイメージングの原理実証

次に、ナノラマン分光による単一 NR7C タンパクの構造解析を行なった。NR7C は、無機材料上に自己組織構造を形成する組み換えタンパクである。無機材料の表面特性(生体分子の修飾性や電気特性)を改質できるためバイオセンサー研究への応用や、その剛直な機械特性からシルク産業への応用が行われている。この剛直な機械特性は、分子内の水素結合によって安定な β シートの二次構造を形成するからである。この NR7C の材料表面での二次構造及び分子構造情報を1分子レベルで計測した例はない。そこで、本実験では、「ナノラマン分光によりタンパクの構造情報をどこまで解析できるのか」という問いに対して答えるために、安定な β シート構造を形成するようにデザインされた NR7C を用いて、単一タンパクのナノラマン分析を行った。単一の NR7C から得られたラマンスペクトルには、タンパク質内のアミド結合やフェニルアラニンの芳香環などを由来とするラマン散乱が検出された。アミド結合由来の振動モードのピーク位置(振動数)から、タンパク質の二次構造が決定できることが知られており、スペクトルより NR7C の二次構造が β シートであることを同定した。また、NR7C 内のアミド結合と構成アミノ酸1種の分子振動数の時間変化を観察した。分子振動数の時間変化は分子振動の揺らぎ、不安定さを表している。アミド結合の振動数の変化は小さく、アミノ酸由来の分子振動数の変化の方が5倍以上大きいことが分かった。NR7C の二次構造は基本的にはアラニンとグリシンの周期配列からなるドメインによって安定化されている一方で、水素結合に関与していないアミノ酸の分子振動が不安定であるという予備実験結果にも一致する。この結果より、ナノラマン分光を用いることで、単一タンパクの二次構造の同定と分子振動の“揺らぎ”の観察が可能であることを実証した。

2. 赤外分光イメージングによる微生物・バイオフィルムの分子組成解析

光合成バクテリアである藍藻(シアノバクテリア)は様々な環境でバイオフィルムを形成する。藍藻バイオフィルムは多糖を主要構成要素としつつも、タンパク質などの他の分子も共在しており、それらの分子の分布を観察することは、バイオフィルムの機能や形成機構の解明に繋がる。従来の染色イメージングでは、染色がバイオフィルムの構造に影響を与えてしまう。また、ラマン

散乱は光合成分子からの自家蛍光に埋もれて検出できない。赤外分光であれば自家蛍光の影響は無いが、空間分解能が 10 μm 程度であるため、バイオフィルムの構造やバクテリアを正確に解像することは難しい。そこで、ACT-X 内で当初開発していたナノ赤外分光技術の一部を転用し新たに開発した超解像顕微赤外分光イメージングが有効だと考えた。本技術は分子の赤外吸収を 1 μm 以下の空間分解能で分析できる技術である。この技術を利用し、バイオフィルム中に含まれる硫酸多糖、タンパク成分、藍藻の可視化に成功した。この観察により、バイオフィルム内で藍藻が多糖成分に沿って配列したことや、タンパク質と多糖成分が共在している様子を明らかにした。

3. 今後の展開

ACT-X 期間内では、当初の方向性とは少し異なるものの、生体分子機能の理解に資するナノスケール分光技術の手法確立とその生体計測応用という研究目標・計画に沿った研究成果を得ることができた。今後は、微生物表層の超解像 AFM・ナノ赤外分光イメージングに関する共同研究や糸状菌の生体膜のナノスケールラマンイメージングへと展開したい。

4. 自己評価

研究目的の達成状況は、概ね計画通り順調に進めることができた。また、領域内での共同研究成果を鑑みると、当初考えていた以上に自分の研究が発展したと思っている。

ACT-X では、微生物・バイオテクノロジー分野に関する専門知識・研究に関するアドバイスだけでなく、共に切磋琢磨できる若手研究者のネットワーク、シニア研究者との繋がりが得られたことは、極めて意義の大きいものである。特に、異分野融合が求められている昨今、光計測とバイオの融合研究の基盤を構築できたため、波及効果は極めて大きいと考える。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 6件

1. Ryo Kato, Toki Moriyama, Takayuki Umakoshi, Taka-aki Yano, and Prabhat Verma, “Ultrastable tip-enhanced hyperspectral optical nano-imaging for defect analysis of large-sized WS_2 layers”, *Science Advances*, **8**, 28, 1–10 (2022)

ACT-X 研究のメインの成果。ナノスケールラマン分光顕微鏡を安定化するための装置開発を行い、生体分子の計測への可能性を拓いた成果。従来の光学系・制御系を抜本的に見直した新たな顕微鏡を開発することで、従来の 12 倍以上の時間安定性の高いナノラマン分光測定を可能にした。これにより、生体1分子からのラマン散乱を再現性と定量性高く計測する基盤を確立した。生体1分子計測と細胞壁・細胞膜イメージングへ大きく前進した研究である。

2. Takayuki Umakoshi, Koji Kawashima, Toki Moriyama, Ryo Kato, and Prabhat Verma, “Tip-enhanced Raman spectroscopy with amplitude-controlled tapping-mode AFM”, *Scientific Reports*, **12**, 12776 (2022)

ナノラマン分光装置の重要な要素である金属探針の走査制御系を改良することで、柔軟な無機材料や生体試料に対して非破壊かつ高感度のナノラマン分析を実現した成果。上記1の成果と融合することで、広視野・高感度・非破壊での生体分子・微生物計測を技術的に可能にした。

3. Ryo Kato, Taka-aki Yano and Takuo Tanaka, “Single-Cell Infrared Vibrational Analysis by Optical Trapping Mid-Infrared Photothermal Microscopy”, *Analyst*, **148**, 1285–1290 (2023)
ACT-X 研究過程で開発した超解像赤外分光顕微鏡を利用した単一細胞解析に関する研究。従来手法では、空間分解能が低いため困難であった単一細胞の中赤外分光分析を実証した。タンパク物性の不均一性を単一細胞レベルで明らかにできるため、母集団に埋もれた希少な細胞や特異な分子物性を示す細胞も検出できる。 _

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

招待講演

1. Ryo Kato, Taka-aki Yano, and Takuo Tanaka, “Ultrastable tip-enhanced Raman spectroscopic imaging of 2D material systems”, SPIE Optics Photonics San Diego, USA, 2023.8.20
2. Ryo Kato, Taka-aki Yano, and Takuo Tanaka, “Mid-infrared photothermal spectroscopy and imaging for biochemical analysis”, Colloquium Spectroscopicum Internationale XLIII, June 27th. 2023, Tokushima, Japan
3. 加藤 遼, “バイオ・メディカル応用に向けたプラズモニク超解像ラマン顕微鏡の開発”, レーザ顕微鏡研究会第47回講演会・シンポジウム, (2022年11月26日)
4. Taka-aki Yano, Ryo Kato(発表者), and Takuo Tanaka, “Ultrasensitive plasmonic sensing of single biomolecular complexes”, SPIE Optics+Photonics 2022, August. 2022, San Diego, USA

プレスリリース

5. Science Advances に投稿した論文の内容について JST・徳島大学よりプレスリリース (2022年7月16日) (<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20220716/pdf/20220716.pdf>)
本成果は国内外の多数のメディアにて取り上げられた。
Optica News, Genetic Engineering and Biotechnology news, 日刊工業新聞, 日本経済新聞など