

今回のオランダへの滞在目的は主に2つあり、その一つは私が現在取り組んでいるタンパク質ナノチューブを超解像顕微 STORM により可視化することでした。これは、前回の MERITE Errantry での話し合いを契機に生まれた共同研究になります。そしてもう一つは私の現在の研究を異なる専門家の方々議論し、新しい共同研究の可能性を模索することにあります。幸いにもオランダでの3ヶ月の滞を通して、私は異なる文化的・科学的背景をもつ様々な人達と触れ合う機会に恵まれ、1人の個人として、そして研究者として成長するための大変有意義な時間を過ごすことができました。

### Eindhoven University of Technology (TU/e)

アイントホーフェン大学(以下 TU/e)は超分子化学の分野において数々の著名な研究者が在籍しており非常に高名な研究機関です。その中でも私が滞在させて頂いたのは、Institute for Complex Molecular Systems (ICMS)と呼ばれる機関で、超分子化学の権威、そして今回私を受け入れていただいた Bert Meijer 教授が Director を務めています。ICMS では様々な専門分野の研究者が気軽に意見交換をできるように様々な工夫があり、研究室・学科などの垣根に囚われることなく自由に議論できる雰囲気が大切にされ、私自身も様々な研究者との議論を通して、これまでにない新しい研究の視点から自分の研究を捉えることができるようになりました。

### Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM)

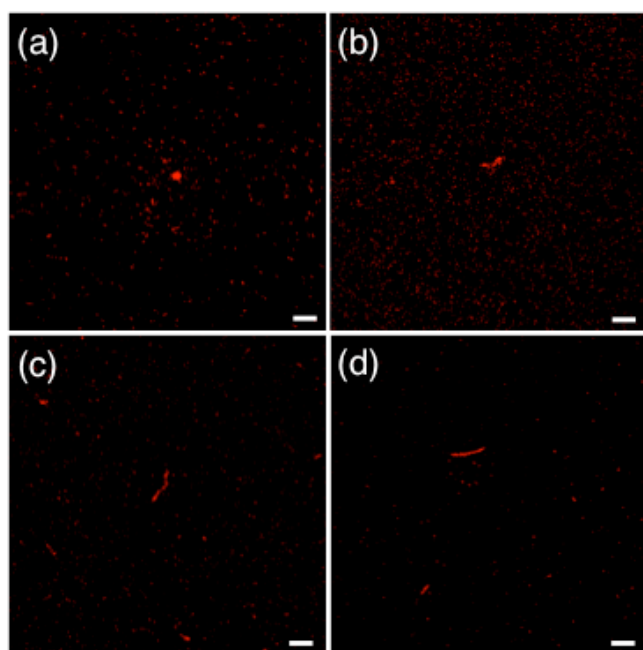


Figure 1 Optimization process of GroEL nanotube imaging under STORM. All scale bars are 1  $\mu\text{m}$ . (a) as-prepared solution, (b) as-prepared nanotube with polylysine surface, (c) mildly crosslinked nanotube with polylysine surface, (d) sample quenched with glycine.

#### 1) プロテインナノチューブ(GroEL)を STORM によって可視化するためのラベル化の条件検討

STORM によって可視化するためには、対象は適切な蛍光色素によってラベル化されなければなりません。しかし私のタンパク質ナノチューブはタンパク質同士が非常に弱い非共有結合によって結び付けられているため、通常のラベル化条件や精製ステップを行うと簡単に分解してしまうことが分かりました。またプロテインナノチューブが壊れない程度に優しく、しかししっかりと基板にナノチューブを固定する必要があります。そこで温度・試薬の濃度など様々なパラメーターを最適化することで最終的に適切な条件を見つけることに成功しました。Figure1 に実際に得られた STORM 像を示しています。ピラニア処理したガラス表面には、負電荷を帯びたタンパク質ナノチューブは接着することが出来ません。そこで、基板の表面をカチオン性のポリマーで修飾することで問題を回避しました(a => b)。次にナノチューブを固定化するため

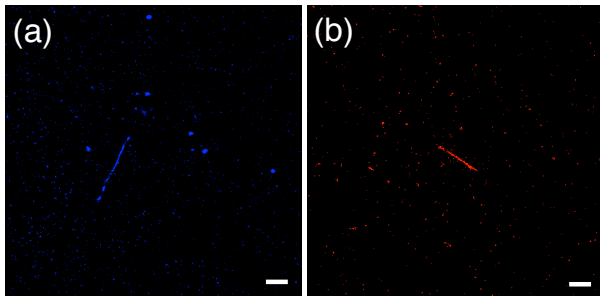


Figure 2 Two color images of GroEL nanotube labeled with (a) Atto 488 dye and (b) Cy5.

にタンパク質と基板表面を共有結合で結合しました (b => c)。しかし、この結合試薬が過剰に存在しタンパク質が基板に強く結び付けられるとタンパク質ナノチューブが壊れることが分かったので、さらに過剰に存在している試薬を潰すための処理をすることで、STORM の像の改善に成功しました (c => d)。最終的には2種類の異なる蛍光色素でのラベル化に成功しました (Figure2)。地道な実験ですが、過去に私が研究しているような特性をもつ材料を STORM で見た例が殆ど無く、なぜ綺麗な

STORM 像が取れないのか毎日議論をし、一つ一つ問題を解決していきました。

## 2) STORM によるナノチューブ構造の証明

STORM に超解像のイメージを得る原理は、蛍光色素の明滅を繰り返させることにあります。そのために一時的に消光させる試薬を系中に存在させますが、この試薬は当然ながら 1-2 nm のある大きさを持っています。私が研究しているタンパク質ナノチューブは、タンパク質を1次元上に連結しているのですが、そのタンパク質1つずつがフタの無い樽のような構造をしているため、中が中空になっておりチューブ構造となっていると考えられます。いま、蛍光色素の種類やラベル化の条件を工夫することでチューブの内側・外側を選択的にラベル化することに成功しました。その結果、チューブの内側には消光させる試薬が入って来れないため、蛍光色素は常に明るい状態を維持し、STORM 像を構築することが出来ません (Figure 3a)。一方、外側をラベル化したナ

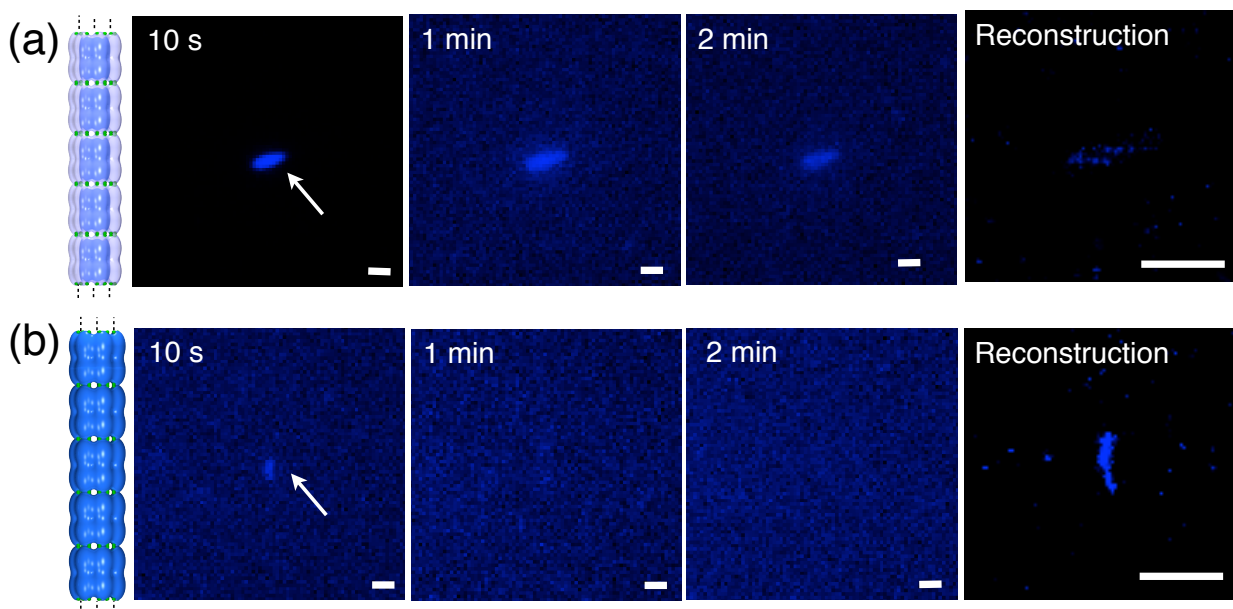


Figure 3 Different dye bleaching behavior of the protein nanotubes labeled (a) internally and (b) externally with atto 488. White arrow indicates the focus of reconstruction process.

ノチューブは、蛍光色素の明滅が切り替わっていますので、STORM 像をきれいに再構築することができます。この結果より、STORM を用いることでタンパク質ノチューブが真にノチューブ構造をしていること、ノチューブ内には直径 1-2nm の分子でも進入することが出来ないほどしっかりと閉じた構造をしていることが分かりました。この事実は、過去の研究より生態環境において非常に分解しやすい分子をノチューブ内に取り込むと、分解を防ぐことが出来た事実を裏付けることが出来ます。

末尾になりますが、このプログラムを通して研究分野を越えて考えることの重要性を改めて学部ことが出来ました。Meijer 教授、MERIT、今回の滞在をサポートして頂いた全ての関係者の方に深く御礼申し上げます。

*Seunghyun Sim*