

令和2年11月1日発行(毎月1回1日発行) 通巻834号 昭和15年4月18日第3種郵便物認可 CODEN:KAKYAU ISSN 0451-1964

C H E M I S T R Y

化学

NOVEMBER
2020
Vol.75

11

研究物語 • Research story

超分子ポリマーからなる ポリカテナンの構築

解説 • Research article

世界最高速の動画撮影で
ひもとく分子の世界

解説 • Research article

物質から生命への進化の鍵は
寄生体との共進化にあった?!

世界最高速の動画撮影でひもとく分子の世界

—カメラは見た！分子が動く決定的瞬間

清水俊樹・原野幸治・中村栄一

東京大学大学院理学系研究科

「1枚の写真は1000の言葉よりも多くを語る」。カメラで捉えた画像が事件解明の決定的証拠となるように、目で見える画像の説得力は凄まじい。決定的瞬間を画像で捉えることができれば、今まで知ることができなかった新しいサイエンスが見えてくる。

極小世界への扉を開く顕微鏡技術

空間のなかを飛び回っている分子を目で見えることはできない。なぜなら、分子運動が人間の目の空間および時間分解能をはるかに超えているからである。しかし近年の顕微鏡技術の目覚ましい発展により、顕微鏡を用いれば分子一つひとつを原子レベルで見極めることが可能になってきた。たとえば、原子間力顕微鏡を用いることで、基板上に固定した正六角形のベンゼン環をはっきりと見ることができる¹⁾。

しかし、この手法は観察対象の分子を固体の表面に固定化する必要がある。構造の変化や反応といった分子の動的な振舞いをリアルタイムで観察することはできない。そもそも分子の振舞いはカオス的であり、今起きるのか10分後に起きるのかまったく予想がつかないところが、実は、分子運動の映像化の最大の問題なのである。

筆者らのグループでは、単層カーボンナノチューブに閉

しみず・としき ● 東京大学大学院理学系研究科博士課程、〈研究テーマ〉ミリ秒イメージングによる電子顕微鏡単分子解析

はらの・こうじ ● 東京大学大学院理学系研究科特任准教授、2007年東京大学大学院理学系研究科博士課程修了、〈研究テーマ〉電子顕微鏡を駆使した分子集合体科学の探究

なかむら・えいいち ● 東京大学大学院理学系研究科特別教授・名誉教授、1978年東京工業大学大学院理工学研究科博士課程修了、〈研究テーマ〉有機化学

じ込めたり、あるいは表面に化学結合させたりした分子を透過電子顕微鏡（電顕）で動画撮影する分子電顕技術「single-molecule atomic-resolution real-time electron microscopy (SMART-EM)」法を2007年に発表し、一つひとつの分子の化学反応や構造変換の研究を展開してきた²⁾。しかし、2005年以來使っていた毎秒1枚程度の撮影速度をもつ電顕カメラでは、思い描くような美しい分子像が得られなかった。顕微鏡の解像度が低いのか、ピンぼけなのか、すばやい分子運動によるブレなのか、はたまた見ている分子が分解してしまっているのか、10年にわたり格闘が続いた。そこで考えられる問題をつぶさに洗いだし、一つの重要な原因が遅い撮影速度に起因することを証明したのが今回の研究である。毎秒1600枚の高速ビデオ撮影により、止まっているフラーレン分子が突然動きだし、そして止まる様子を実時間で記録することができた。従前の遅いビデオカメラでは、全体としてブレた映像しか得ることができなかったのである。

分子の決定的瞬間を捉える難しさ

ミルククラウンをご存じだろうか。牛乳の入った容器の液面に牛乳を1滴落とすと、美しい王冠状の形を形成する現象である。目に見えないほど高速のこの現象も、高速カメラでスローモーション撮影すると、図1のように王冠状に飛び散る液滴をはっきり見ることができる。

では、分子の世界ではどうだろうか。分子の動きを原子一つひとつのレベルで見たいというのは、科学者の長年の夢である。しかし、原子や分子を見るための空間分解能と、頻繁に起こる高速の運動を逐一追跡するために時間分解能を両立させることは難しい。たとえば、分子を結晶中に閉じ込めて電顕で時間をかけて精密に観察することは1970年代に実現

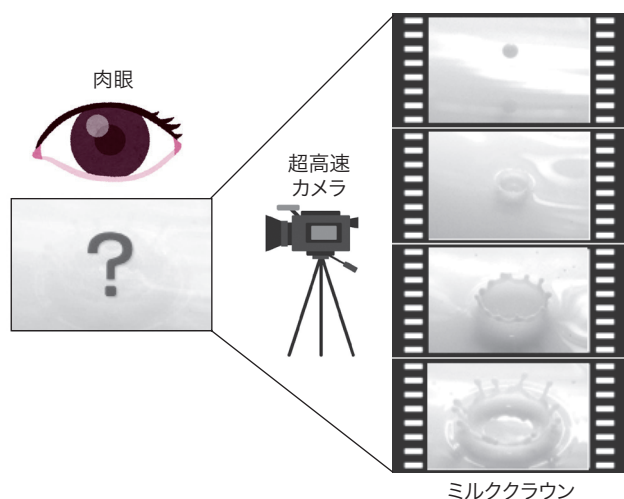


図1 超高速カメラでミルククラウンを捉える

されている³⁾。ところが、動きまわる分子が観察対象のときは、高速カメラを使ってブレを防がなければならず、その場合フレームあたりの露光量(電顕の場合は電子線量)が不足してしまって画像を得ることができなかった。最近では、比較的ゆっくりと動く生体分子を対象とした高速原子間力顕微鏡の進歩が目覚ましく、最高で毎秒20枚程度の動画を連続で撮影できるようになった⁴⁾。しかし、この速度での原子間力顕微鏡撮像には空間分解能に大きな制限があり、原子レベルでの構造を見ることはできない。

一方、時間分解能を究極まで高める手法として、ポンプ・プローブ法がある。ポンプ光と呼ばれるパルス光によって物質を刺激し、それによって起こる構造変化をプローブ光を用いて追跡するという手法であり、この原理を応用した顕微鏡も開発されている⁵⁾。しかし、この方法では事が起こる瞬間に合わせてプローブ光を試料に当てる必要があり、分子の動きのようにいつ起こるか予測ができないカオス的な高速現象に適用することは困難である。

電子顕微鏡の性能を決める「カメラ」

感光フィルムから電荷結合素子、そして相補性金属酸化膜半導体(CMOS)へと続く撮像素子の発展により、近年、高感度、高速撮影用の電顕カメラが次々に開発された。こうして得られるだけの小さな画像はクライオ電顕法で威力を発揮し、2010年代から今に続く生体分子の構造解析への応用の爆発的拡大、さらには2017年のノーベル化学賞の授賞につながった。これに伴い、分子の高速動画撮影の興味も高まり、イギリスのグループは2008年に毎秒12枚というフレーム

速度を達成した⁶⁾。さらに速いカメラを使って高速現象を解明したいという研究者の要望に応え、アメリカのGatan社(当時)によって最大毎秒1600枚での撮像が可能な高速カメラ「K2-IS」が2012年に上市された。これを用いると、たとえばプラチナのように重い原子ならば、結晶表面で原子層が1層1層成長していく様子を毎秒400枚のフレーム速度で記録することも可能なことが報告された⁷⁾。

世界最高速の電顕カメラを使いこなす

筆者らはSMART-EM法による分子の高速撮影により分子のブレの問題を解消することを目指し、2012年度補正予算を活用して、上市されたばかりの超高速の「K2-IS」と、それより少し遅い「OneView」の二つのCMOSカメラを備え、分子電顕撮影用に特化した原子分解能透過電顕を発注した⁸⁾。設置および調整を経て2016年からようやくシステムが稼働し、早速、分子動画の高速撮影に取り組んだが、その試みはすぐに頓挫した。軽元素だけからできている有機分子では、十分な像コントラストが得られなかったのである。たとえば図2に、カーボンナノチューブに内包した2種類のフラーレン分子(C₆₀およびC₁₂₀)のK2-ISで撮像した画像を示す。左上に示した最高速の毎秒1600枚、すなわちフレームあたり0.625msの露光時間では、観察対象のフラーレン分子の像はノイズに埋もれてしまひまったく見えていない。像コントラストを増すために撮影時間を50倍、すなわち31.25msの露出時間に延ばせばきれいな分子像が得られるが(図2右上)、これではせっかくの高速カメラの特徴が生かせない。

最近のデジタル画像処理技術の進歩には目覚ましいものがある。そこで、日本学術振興会の短期訪日プログラムを活用して、2017年の夏から電子顕微鏡の画像処理に造詣の深いバージニア工科大学・村山光宏研究室のJoshua Stucker氏との共同研究を開始した。図2左上のノイズだらけの高速分子動画から分子の構造情報を取り出すために、当時知られていたさまざまなデジタル画像処理手法を試してもらった。そのなかで着目したのはウェブ動画の圧縮技術によく使われている“Total Variation”という手法である。一連の動画において、時系列で隣接するフレームどうしの差異を比較し、変化の大きな箇所はノイズ、変化の小さい部分には「分子がある」と判定し、相対的にノイズを低減させる手法である。この手法のなかでChambolleが開発したアルゴリズム⁹⁾(CTVノイズ除去法)が筆者らの用途に最も適していることを見いだした¹⁰⁾。これにより、毎秒1600枚で得た画像のなかに埋もれ

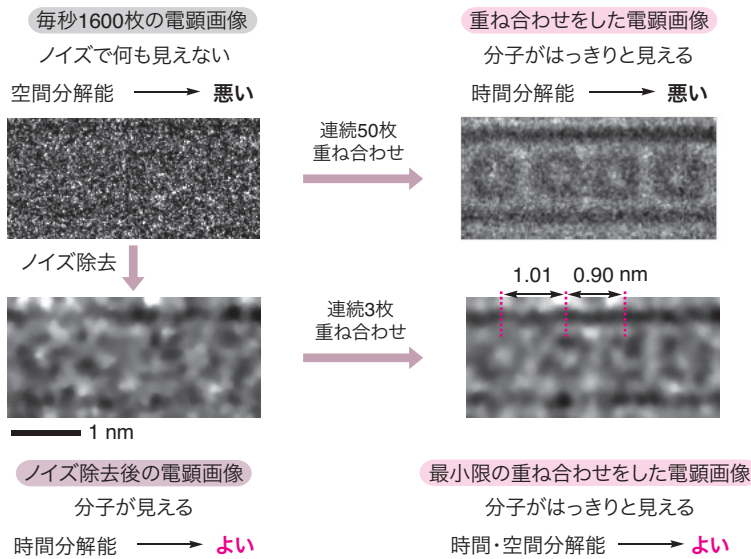


図2 カーボンナノチューブ内のC₆₀分子(両端)およびその二量体であるC₁₂₀分子(中心)の高速電顕画像とノイズ除去による画質向上
文献 11 より許可を得て転載し、一部改変。

ていたさまざまな情報を画像のなかから抽出することが可能になった(図2左下)。

CTV ノイズ除去法によって、高速原子間力顕微鏡で報告されている毎秒 20 枚という従来の分子動画の最高速度を一挙に 100 倍ほど更新する、毎秒 1600 枚の世界記録を達成し、分子が動く決定的な瞬間を捉える技術を手にしたのである。1600 分の 1 秒の電顕画像に対し CTV ノイズ除去を行ったうえで、時間分解能を失わない程度(3~5 フレーム程度)の

重ね合わせを行った結果の画像を図2右下に示した。この画像から、フレームあたり 533 分の 1 秒(1.875 ms) という速度で、0.01 nm の精度で分子間の距離情報を得ることができ、両端の二つの円状の分子像が C₆₀ 分子であるのに対し、中央の二つの円状の像が、電子線照射により二つの C₆₀ が共有結合でつながった C₁₂₀ フラーレン分子^{2b)} の像であることが判別できた。

分子シャトル運動の撮像に成功!

2016 年のノーベル化学賞は、分子機械の設計と合成が授賞対象となった。外部からの刺激に応答し、軸に沿って往復運動する「分子シャトル」は分子機械の代表例である。分子シャトル運動はこれまで、核磁気共鳴装置(NMR)のスペクトル解析に基づいて、NMR チューブのなかの溶液に含まれる無数の分子シャトルの平均的な挙動として観測

されてきたが、実際に個々の分子シャトルが加えられた刺激に

応答して往復運動をする様子を捉えることはできなかった。筆者らは世界最高速の電顕カメラと CTV ノイズ除去法を最大限に活用することで、カーボンナノチューブのなかに閉じ込めたフラーレン分子の分子シャトル運動を毎秒 1600 枚のフレーム速度のスローモーション SMART-EM 動画として可視化することに成功した¹¹⁾。多数のフレームに収められた分子像について統計解析することにより、分子の位置につい

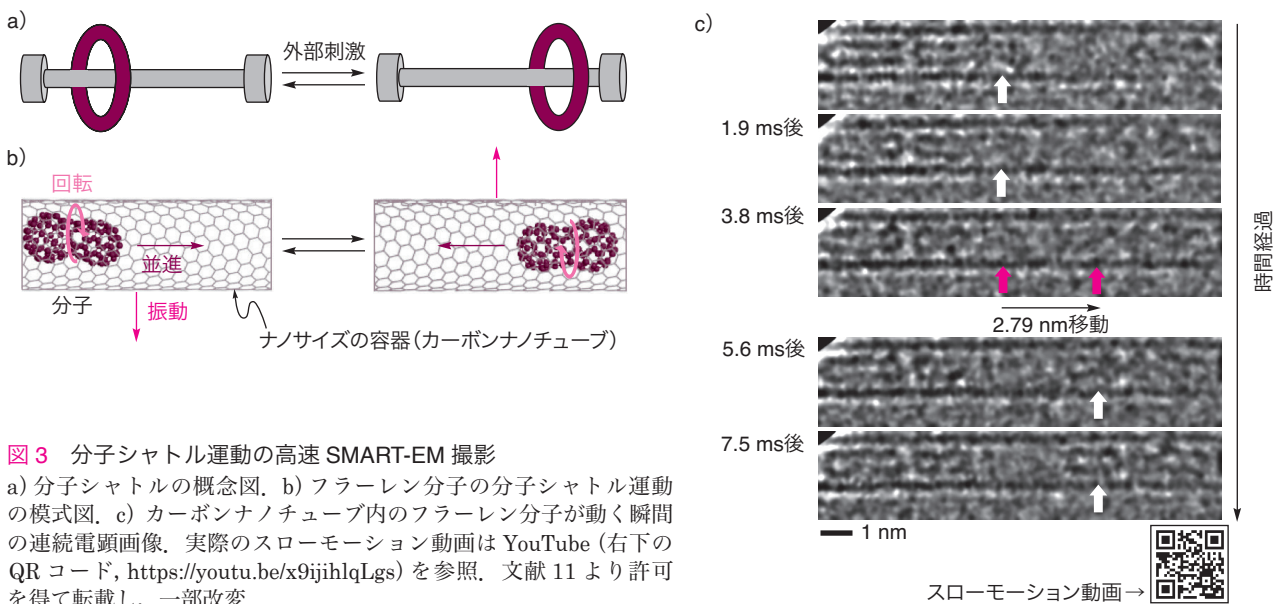


図3 分子シャトル運動の高速 SMART-EM 撮影
a) 分子シャトルの概念図。b) フラーレン分子の分子シャトル運動の模式図。c) カーボンナノチューブ内のフラーレン分子が動く瞬間の連続電顕画像。実際のスローモーション動画は YouTube (右下の QR コード, <https://youtu.be/x9ijihlqLgs>) を参照。文献 11 より許可を得て転載し、一部改変。

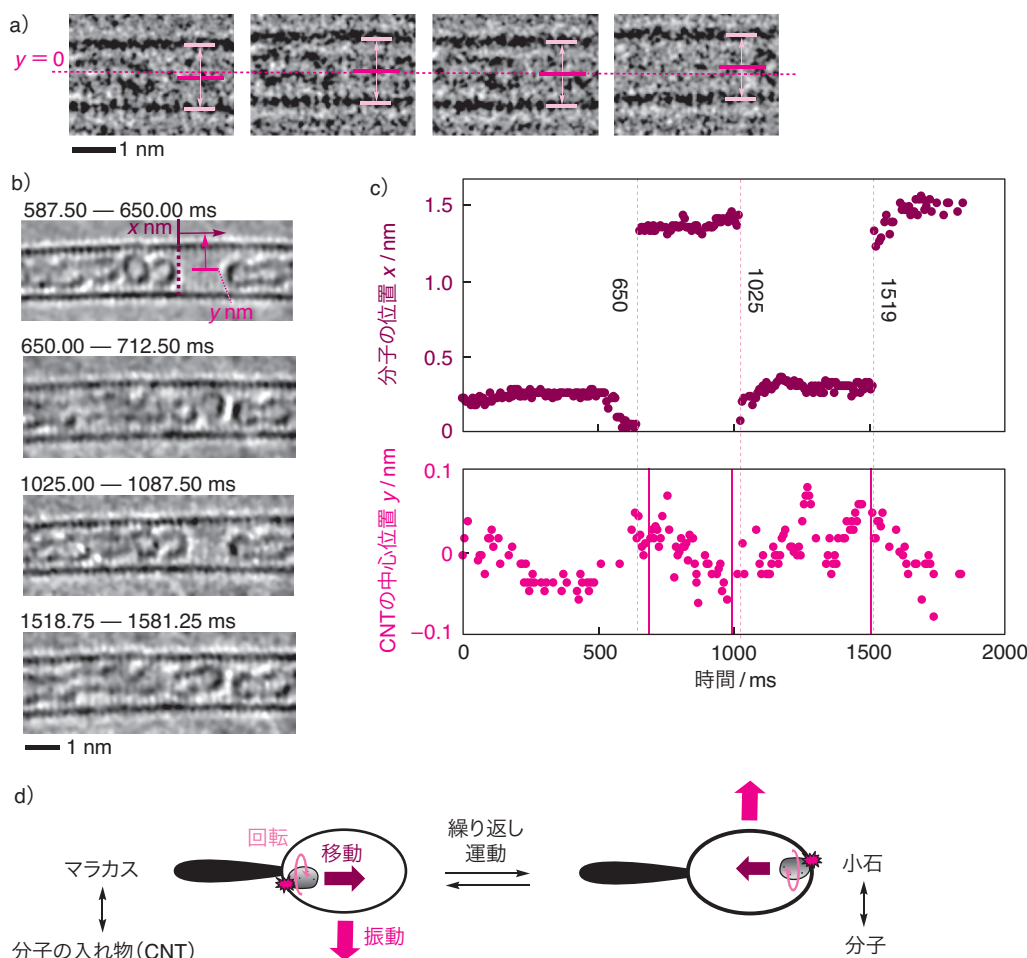


図4 カーボンナノチューブ (CNT) の微細な振動と連動したフラレン分子の往復運動
 a) 振動するカーボンナノチューブの連続電顕画像. b) フラレン多量体の分子シャトル運動の電顕画像.
 c) その解析結果. d) マラカスと分子シャトル運動の対応. 文献 11 より許可を得て転載し, 一部改変.

ても 0.01 nm, 0.9 ms というきわめて高い位置および時間精度で決定した. 図 3 に示すとおり, 動画開始から 3.8 ms から 5.6 ms 後のあいだに二量体が 2.79 nm 移動しており, その瞬間がミリ秒の時間精度で克明に捉えられた.

ナノサイズの入れ物を振るとなかの分子が動く

ここで見たようにナノチューブ内の分子がシャトル運動を行うための駆動力は何であろうか? 熱エネルギーによって動く, 電子線からエネルギーを得て動く, などと推論されてきたが, どれも実験的な根拠に乏しいものであった. 筆者らは, 今回得られたフラレン分子のシャトル運動のスローモーション動画を定量的に解析し, ナノチューブがわずかに振動していることを突き止め, この微細な振動にตอบสนองしてシャトル運動が引き起こされていることを明らかにし

た. 観察されたナノチューブの振動はおよそ 0.1 s 周期, 振幅が 1 Å 程度の微細でランダムな振動であり (図 4 a), 筆者らの手法によりはじめてその動画撮影に成功したものである. そこで, 図 4 (b) に示すフラレン分子がナノチューブ内を複数回往復する高速 SMART-EM 動画において, 各フレームにおける分子の位置 x (図 4 c, 茶色) とチューブの位置 y (図 4 c, 赤色) の時間変化を計測したところ, ナノチューブの振動の方向が変わるとき, すなわち分子が受ける加速度が最大になるとき, 分子が力を受けて縦方向に回転しながら一方の端からもう一方の端まで並進移動することが明らかとなった. 機械的に振動するナノチューブからなかの分子にエネルギーが伝えられ, 分子の並進や回転が起こるといふ, 分子レベルの仕事とエネルギーの相関が明確に示されたのである. シャトル運動の頻度は 25 °C から 150 °C まで温度を変えてもほと

んど変化しないので、この運動が熱由来ではないことを示している。マラカスを振るとなかの小石も容器の振動と連動して動き、容器の壁に当たって音がでる (図 4 d)。今回観察した微小スケールの分子の動きはまさにこの「マラカスの小石」であり、マクロ世界で私たちが普段目にする力学挙動が、ナノレベルの世界でも起きていることを示している。

分子を見て研究することが当たり前の世界へ

分子運動や化学反応のような量子論的な分子の振舞いは、いつ起こるか予測が不可能なカオスの現象であり、分子一つ一つの動きを追跡する実験的研究が困難である。今回の研究では、高速のカメラと CTV ノイズ除去法を組み合わせることで原子分解能電顕の威力を最大限に発揮して、分子運動の決定的瞬間を実時間で直接撮影し、それを解析することができた。この分子動画撮影技法を用いれば、分子の動きだけでなく、分子の反応や構造変換の決定的瞬間も逃さずに捉えることができるだろう。化学反応そのものを実際の反応の動画で見ながら研究する時代がそこまで来ているのである¹²⁾。分子を見るのが当たり前となった世界で繰り広げられるサ

イエンスは、現時点での私たちの想像をはるかに超えるものになるだろう。

参考文献

- 1) a) L. Gross, F. Mohn, N. Moll, P. Liljeroth, G. Meyer, *Science*, **325**, 1110 (2009). b) K. Iwata, S. Yamazaki, P. Mutombo, P. Hapala, M. Ondráček, P. Jelínek, Y. Sugimoto, *Nat. Commun.*, **6**, 7766 (2015). 2) a) E. Nakamura, *Acc. Chem. Res.*, **50**, 1281 (2017). b) 岡田 賢, 山内 薫, 原野幸治, 中村栄一, 化学, **73** (4), 12 (2018). c) 原野幸治, 中村栄一, 化学と工業, **73**, 16 (2020). 3) a) N. Uyeda, T. Kobayashi, K. Ishizuka, Y. Fujiyoshi, *Chemica Scripta.*, **14**, 47 (1978/79). b) N. Uyeda, T. Kobayashi, K. Ishizuka, Y. Fujiyoshi, *Nature*, **285**, 95 (1980). 4) T. Ando, *Biophys. Rev.*, **10**, 285 (2018). 5) A. H. Zewail, J. M. Thomas, "4D Electron Microscopy: Imaging in Space and Time," Imperial College Press, London (2010). 6) J. H. Warner, Y. Ito, M. H. Rummeli, B. Büchner, H. Shinohara, G. A. D. Briggs, *ACS Nano*, **3**, 3037 (2009). 7) H.-G. Liao, D. Zherebetsky, H. Xin, C. Czarnik, P. Ercius, H. Elmlund, M. Pan, L.-W. Wang, H. Zheng, *Science*, **345**, 916 (2014). 8) 東京大学分子ライフイノベーション機構共用利用機器として外部の利用が可能 (<http://webpark1938.sakura.ne.jp/>). 9) A. Chambolle, *J. Math. Imaging Vis.*, **20**, 89 (2004). 10) J. Stuckner, T. Shimizu, K. Harano, E. Nakamura, M. Murayama, *Microsc. Microanal.*, **26**, 667 (2020). 11) T. Shimizu, D. Lungerich, J. Stuckner, M. Murayama, K. Harano, E. Nakamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **93**, 1079 (2020). 12) a) J. Xing, L. Schweighauser, S. Okada, K. Harano, E. Nakamura, *Nat. Commun.*, **10**, 3608 (2019). b) S. Okada, S. Kowashi, L. Schweighauser, K. Yamanouchi, K. Harano, E. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 18281 (2017). c) E. Nakamura, K. Harano, *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, **94**, 428 (2018).