

## 2C11 可視蛍光をプローブとした低温の単一タンパク質分光

(東工大・CREST) ○藤芳 暁・藤原正規・松下道雄

タンパク質の取りうる準安定構造は無数にあり、生理条件下では、タンパク質はその構造間を行き来しながら機能を示している。単一タンパク質の分光測定には数十秒の測定時間が必要であるため、常温下では時間平均により、単一タンパク質のスペクトルが多数の構造の平均を反映したものになってしまう。一方、低温下では熱による構造変化を抑制できるため、個々の準安定構造を反映したスペクトルを得ることができる。このため、低温(1.5 K)の単一タンパク質分光を用いて、タンパク質の立体構造についての研究が約10年前から現在まで精力的に行われている[1-2]。しかし、本手法は近赤外の蛍光測定をプローブ過程に用いるため、その応用例は光合成アンテナタンパク質に限られている。そこで、我々は生理機能を発揮している様々なタンパク質へ本手法を適応させるため、単一タンパク質分光の波長領域を可視域へ拡大させた。本講演では、二光子蛍光測定を用いた反射型分光装置の作成と温度1.5 Kでの可視蛍光をプローブとした単一タンパク質分光について報告する。

図1に低温(1.5 K)の単一タンパク質分光装置を示す。光源は波長可変のチタンサファイアレーザー(パルス幅 150 fs, 波長 920 nm)である。励起光はプリズム対で群速度分散を補償した後、可動鏡と二枚の放物面鏡を通し、クライオスタット内の反射型対物レンズ(焦点距離 4 mm, 開口数 0.6 [3])によって試料表面上に集光させた。可動鏡と二枚の放物面鏡は試料上のレーザー走査に用いている。試料上のタンパク質から発せられた二光子蛍光は同じ対物レンズで集め、誘電体ミラーとフィルターによって励起光から分離し、コア 100  $\mu\text{m}$  のファイバーに焦点距離 40 mm のレンズによって集光した。二光子蛍光のイメージとスペクトルは、それぞれ、アバランシェフォトダイオード (APD) および分光器と組み合わせた Charge Coupled Device (CCD) によって測定した。本装置は対物レンズを含めて全て自作したものである。

試料には単量体の蛍光タンパク質である AcGFP1(クロンテック社)を用いた。AcGFP1 の蛍光の極大は 500 nm ( $20000 \text{ cm}^{-1}$ ) 付近にある。薄い濃度の AcGFP1 リン酸緩衝溶液(AcGFP1 濃度:200 pM、pH = 7、0.5%ポリビニルアルコールを含む)を基板にスピンコートすることで、個々の AcGFP1 を空間的に分離させた。図2に1.5 Kにおける単一 AcGFP1 の二光子蛍光イメージを示す。イメージのサイズは 15

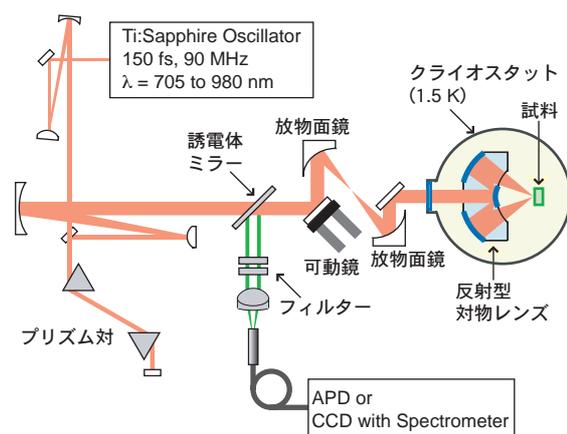


図1. 二光子蛍光測定を用いた反射型単一タンパク質分光装置 (測定温度1.5 K)

$\mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$  であり、約 30 個の白い輝点が単一 AcGFP1 からの発光である。観測された AcGFP1 の蛍光の光子数は約 150 cps であり、背景光の光子数は 10 cps であった。

図 3 に 1.5 K で測定した単一 AcGFP1 の二光子蛍光スペクトルを示す。このスペクトルは装置の分光感度を補正している。図 3a と図 3b はそれぞれ異なる AcGFP1 からの蛍光である。図 3 において最も強いピークは 0-0 遷移に由来し、図 3b の  $\sim 16500 \text{ cm}^{-1}$  のピークは電子基底状態の振動準位への遷移に由来する。図 3a の単一 GFP1 の 0-0 遷移周波数と集団平均の場合を比べると  $300 \text{ cm}^{-1}$  程度のズレしかないが、図 3b の場合には  $2000 \text{ cm}^{-1}$  以上ずれている。このズレは不均一幅の 2 倍に相当するため、これを不均一性のみで解釈するのは難しい。また、振電バンドの相対強度も明らかに異なっている。数種類の Green-Fluorescent Protein(GFP)の研究から、GFP には複数の構造異性体が存在し、それぞれの異性体の蛍光スペクトルの形状やピーク位置は大きく異なることが報告されている[4]。この報告と得られたスペクトル形状から、図 3 の個々の AcGFP1 はそれぞれ異なる構造異性体に帰属した。

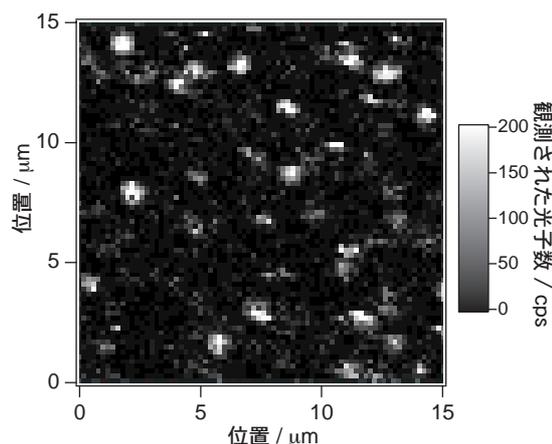


図2. 1.5 Kにおける単一AcGFP1の二光子蛍光イメージ。約 30 個の白の輝点の一つ一つが個々のAcGFP1からの二光子蛍光である。

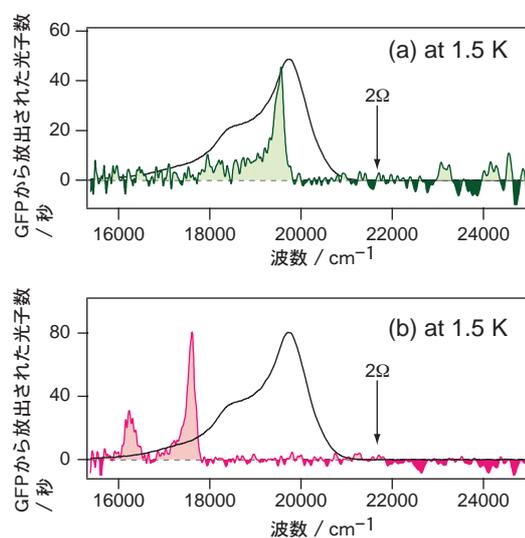


図3. 温度1.5 Kの単一AcGFP1の蛍光スペクトルと集団平均スペクトル(黒).

## 参考文献

- [1] A.M. van Oijen, M. Ketelaars, J. Köhler, T.J. Aartsma, J. Schmidt; *Science* 285 (1999) 400.
- [2] M.F. Richer, J. Baier, T. Prem, S. Oellerich, F. Francia, G. Venturoli, D. Oesterhelt, J. Southall, R.J. Cogdell, J. Köhler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 6661.
- [3] S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, C. Kim, M. Matsushita, A.M. van Oijen, J. Schmidt; *Applied Physics Letters*, in press
- [4] T.M.H. Creemers, A.J. Lock, V. Subramaniam, T.M. Jovin, S. Völker; *Nat. Struct. Biol.* 6 (1999) 557.