

## 二波長の励起光を同時に利用できる 低温の単一タンパク質分光装置の開発

(東工大院・理工<sup>1</sup>, CREST<sup>2</sup>, 総研大・葉山高等研<sup>3</sup>, 総研大・先導科学<sup>4</sup>)

○平野充遥<sup>1</sup>, 藤原正規<sup>1</sup>, 藤芳 暁<sup>1,2</sup>, 松下道雄<sup>1,2</sup>, 伊関峰生<sup>3</sup>, 渡辺正勝<sup>4</sup>

**【序】** 低温において単一タンパク質の自家蛍光スペクトルを測定すれば、タンパク質の構造の熱ゆらぎによるスペクトル変化を抑制でき、タンパク質の個々の準安定構造を調べることができる。しかし多くの場合、タンパク質の位置を確認している間に、位置測定に用いるレーザーにより系に熱が与えられたり光退色が起こったりするため、一つの準安定構造を確認することは難しい。そこで我々は、ラベル色素を利用した低温での単一タンパク質分光法を開発している。本方法ではタンパク質の電子状態に非共鳴のレーザーでラベル色素を励起し、その蛍光でタンパク質を傷つけずに試料上での位置を確認する。次に、異なる波長のレーザーを用いてタンパク質の自家蛍光スペクトルを測定する。上記のような実験を実現するため、可視・紫外全域の任意の二つの波長のレーザーを同時に利用できるタンパク質分光装置を自作した。

**【装置】** 図1に低温(1.5 K)の分光装置を示す。光源に波長 633 nm と 594 nm の二種類の He-Ne レーザーを用いた。励起光にはビームスプリッターとして用いたウェッジ基板からの反射光を用いた。可動ミラーと2枚の放物面鏡を通した後、反射型対物レンズ(焦点距離 4 mm, 開口数 0.6[1])によって試料上に集光させた。可動ミラーと2枚の放物面鏡は試料上のレーザー走査に用いている。対物レンズの直前には $\lambda/2$  波長板を入れ、励起偏光を回転させた。試料からの蛍光は同じ対物レンズによって集め、励起光が通った経路を戻した。その蛍光はフィルターで励起光と分離し、放物面鏡でファイバーに集光し、検出器へ導いた。検出器にはアバランシェフォトダイオード(APD)及び分光器と組み合わせた CCD を用いた。装置の光学系は全て反射光学系からなり色収差が無視できるため、可視・紫外全域の任意の二波長で同時に励起が可能である。

**【装置】** 試料はラベル色素である Alexa Fluor 647(Alexa)を結合させたウシ血清アルブミン(BSA)を用いた。Alexa は波長 633 nm、594 nm どちらの光でも励起でき、その蛍光極大は 680 nm 付近にある。十分に希釈した試料緩衝溶液(BSA 濃度 400 pM, pH=7, 1%のポリビニルアルコールを含む)を基板にスピコートすることで BSA を空間的に分離した。

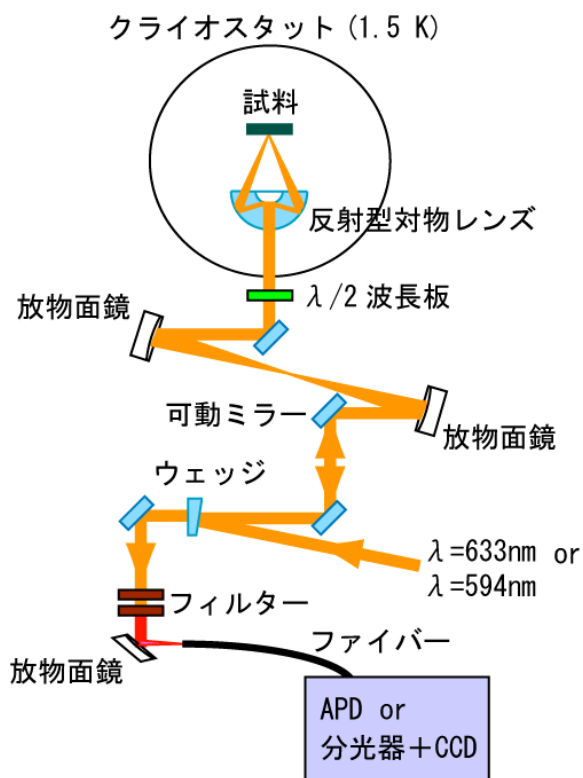


図1 分光装置の概略図。

【実験】試料の蛍光イメージを、レーザー走査によって APD を用いて測定し、色素ラベルされた BSA の位置を確認した。その後、CCD で Alexa の蛍光スペクトルを測定した。

【結果と考察】図 2 に励起波長 633 nm、1.5 K で測定した集団平均(約  $10^4$  個)の Alexa (a)と単一 Alexa の蛍光スペクトル(b-d)を示す。集団平均の線幅が 25 nm で、対する単一分子の線幅は集団平均の五分の一程度である(4~6 nm)。波数になおすと約  $100 \text{ cm}^{-1}$  である。これは寿命(約数ナノ秒)から見積もった線幅よりも 4~5 桁広い。線幅が太いのは、スペクトル測定にかかる時間(数十秒程度)より短い時間で Alexa の周囲環境が変化し、これに応じてスペクトルが変化したためと考えられる。単一 Alexa のスペクトル(b-d)を比べると、ピークの位置は、それぞれの分子の周囲環境の違いを反映して不均一幅内に分布している。

得られた信号が単一の Alexa に由来することを確認する。図 3 の青丸は単一 Alexa の蛍光強度の励起偏光角依存性である。図からわかるように、蛍光強度がゼロから約 200 カウントの間を周期的に変化している。単一分子に由来する単一双極子からの蛍光強度  $I$  は偏光角  $\theta$  に対して、 $I \propto \sin^2 \theta$  の変化をする。この関数は測定結果を非常に良く再現した(図 3 の緑の実線)。これより得られた信号が単一 Alexa からの蛍光であることを確認した。

図 4 は 1.5 K で、同一の単一 Alexa を励起波長 633 nm と 594 nm でそれぞれ励起して測定した時の蛍光スペクトルである。励起波長を切り替える際には、励起除去フィルターを交換するだけで、装置の他の部分の変更は必要なかった。これより、本装置で二波長同時に測定できることを確認した。図 4 を詳しく見ると、二つのスペクトルのピークの波長が約 2 nm ずれている。これは、二つのスペクトルの測定時刻に数十分の差があり、その間に分子の周囲環境が変化したためだと考えられる。

#### 【参考文献】

[1] S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, C. Kim, M. Matsushita, A.M. van Oijen, J. Schmidt; *Applied Physics Letters*, in press

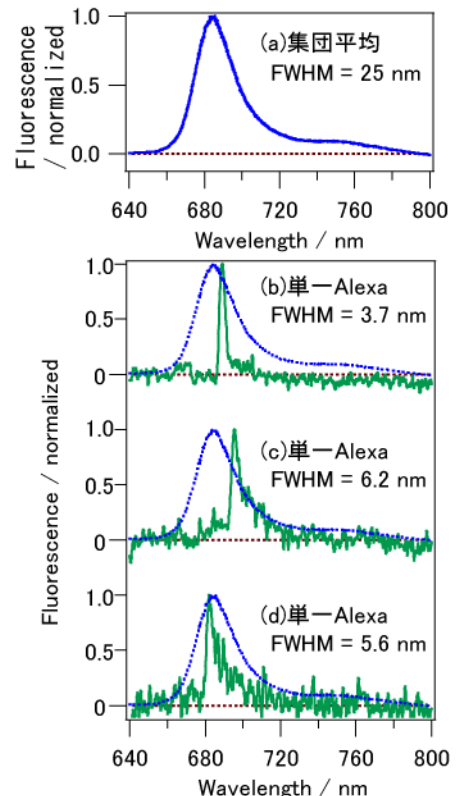


図2 (a) 集団平均の Alexa および (b-d) 単一 Alexa の蛍光スペクトル。励起波長は 633 nm である。

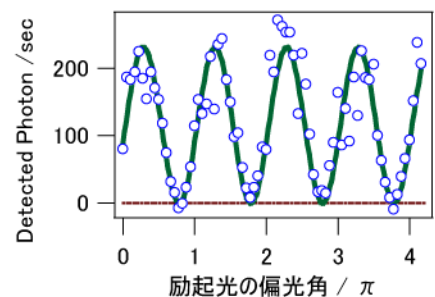


図3 単一 Alexa の蛍光強度の励起偏光角依存性。青丸が蛍光強度、緑線がこれをフィッティングしたもの。

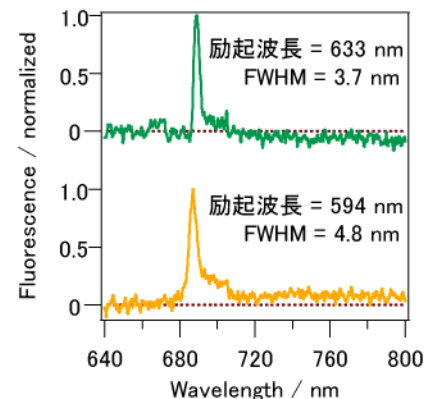


図4 同一の単一 Alexa の蛍光スペクトル。(a) 励起波長 633 nm (b) 励起波長 594 nm で測定した。