

マイクロ秒一分子蛍光スペクトル測定法の開発：蛍光色素への応用

(¹神戸大院・自然科学、²阪大院・理) ○古々本麻里¹、水谷泰久²

【序】

本研究では、熱によって駆動されるタンパク質のダイナミクスの観測を目的として、マイクロ秒の時間分解能を持った一分子蛍光スペクトル測定法の開発に取り組んでいる。光によって駆動されるタンパク質であれば、光をトリガーとして反応開始を同期させることができ、アンサンブル測定によるダイナミクス観測が可能である。しかし、光反応を起こすのは一部のタンパク質であり、多くのタンパク質の反応は、熱によって駆動される。タンパク質の機能発現機構の解明には、熱駆動によるものも含め、広くタンパク質のダイナミクスを明らかにすることが重要である。しかし、これらの場合、反応は確率的に起こるので、反応開始の同期をとることが難しく、アンサンブル測定では観測が困難である。そこで、新しい一分子測定法の開発に取り組んだ。

本手法の第一の特色は、マイクロ秒の時間分解能である。従来法では、ビデオレートの制約のため時間分解能はミリ秒程度である。これに対し、本手法では、CCD 検出器の特徴を活かして、これより3桁近く高い時間分解能を得る。第二の特色は、スペクトルの測定である。強度だけでなくスペクトルも測定することで、変化の過程をより詳しく捉えることができると考えられる。第三の特色は、分子をガラス基盤上に固定しないことであり、固定によるタンパク質への影響を省くことができる。

われわれは、昨年の本討論会で、量子ドットおよび蛍光ビーズを用いた測定原理の検証結果について報告した。今回、発光強度のより小さい蛍光色素の信号の検出に向けて、集光部分の光学系の改善を行った。その結果、蛍光色素の発光の観測に成功したので、報告する。

【測定原理】

CCD 検出器の電荷転送機能を利用して、マイクロ秒の時間分解測定を行う。CCD 検出器の受光面の最上段にのみ光が入る状態にしておく。この条件で CCD 検出器を動作させると、露光時間内に光の強さに応じて発生した電荷が、電荷転送時間を経て下段へ転送される。この繰り返しによって、素子の縦方向が時間軸に対応し、露光時間と電荷転送時間の合計時間を時間刻みとした時間分解データを得ることができる。われわれはこれまでに、電荷転送時間 $1.32 \mu\text{s}$ でマイクロ秒時間分解測定が原理的に可能であることを示した¹。

一分子検出は、内径 0.18 mm のガラスキャピラリーセルに、約 10^{-15} M の蛍光色素希薄溶液を流すことによって行う。そこへ絞ったレーザー光を照射し、レーザー照射体積中にせいぜい一分子存在する濃度条件で分子を励起することで、一分子からの発光が得られる。われわれはこれまでに、量子ドットや蛍光ビーズを用いた実験から、一分子測定が原理的に可能であることを示した¹。

【実験と結果】

これまで集光用に用いていた平凸レンズを、開口数の大きな20倍の対物レンズに変更し、量子ドット水溶液の測定を行った。得られた量子ドットからの信号の強度と出現頻度を、平

凸レンズを用いた場合と比較した。信号の出現頻度は一桁以上増加し、強度分布の幅も約2倍大きくなっていった。これは、検出可能な強度の閾値が下がり、より多くの信号を観測できるようになったためと考えられる。

さらに、40倍の対物レンズに変更して、同様の測定を行った。20倍の対物レンズの時と比較して、信号の出現頻度は減少したが、強度の平均値は2倍になった。これは、検出感度の上昇を示している。

次に、蛍光色素水溶液の測定を行った。用いた蛍光色素は、Alexa Fluor 488 である。図1 (a)に、測定した時間分解データの一例を示す。488 nm と 585 nm 付近の時間に対して連続的な発光は、それぞれレイリー散乱光と水分子によるラマン散乱光である。蛍光色素による発光は、色素がレーザー照射体積内にいる時間のみ観測されるため、筋状に観測されると予測される。したがって、図1 (a)の時間 460 ms 付近に観測された筋状の発光は、蛍光色素によるものと考えられる。図1 (b)に蛍光色素による発光スペクトルを示す。下に示すものは、アンサンブルの蛍光色素のスペクトルである。蛍光色素からの発光スペクトルは、ほぼアンサンブルのものに対応していた。以上の結果から、図1 (a)における筋状の発光を蛍光色素による発光と帰属した。今後、蛍光色素分子をタンパク質に標識し、タンパク質の一分子観察を行うことを計画している。

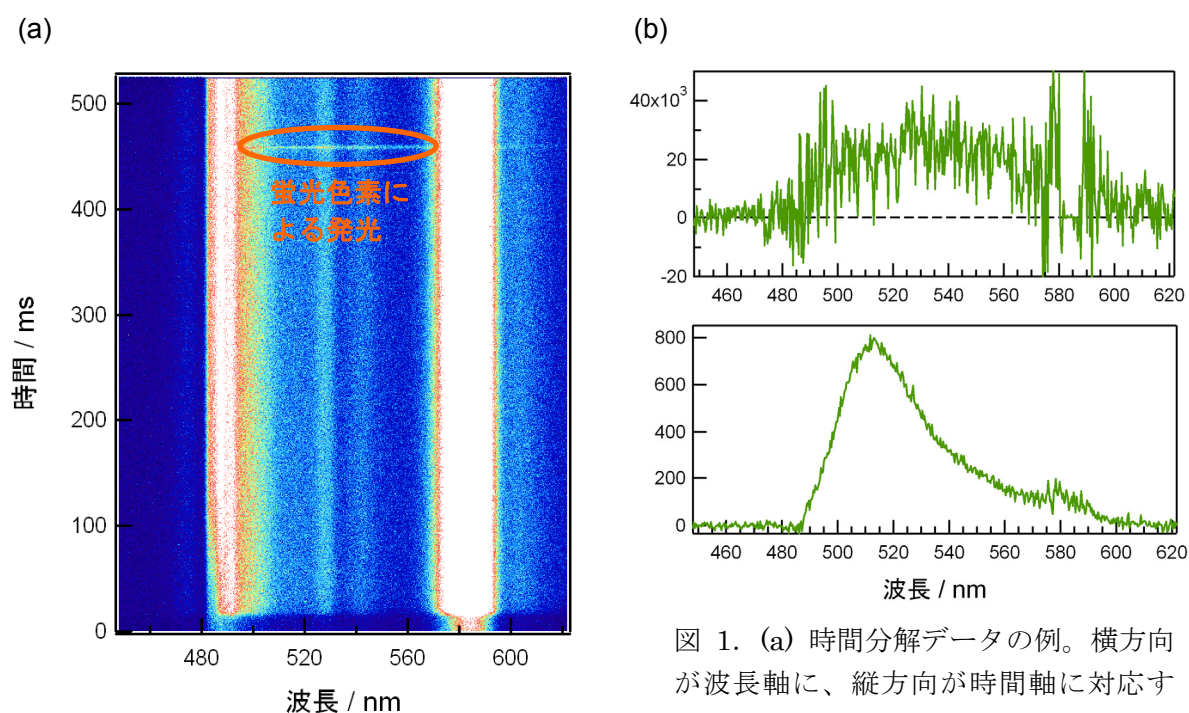


図 1. (a) 時間分解データの例。横方向が波長軸に、縦方向が時間軸に対応する。このときの露光時間は 500 μ s。 (b) 上は(a)の発光を波長に対してプロットしたもの。下はアンサンブルの発光スペクトルを示す。