

(東工大物理)○藤芳 暁・平野 充遥・古屋 陽・藤原 正規・松下 道雄
(総研大葉山高等研¹・総研大先導科学²)伊関 峰夫¹・渡辺 正勝²

生理条件下、タンパク質の立体構造は熱揺らぎによって自発的に複数の準安定状態間を絶えず変化している。この自発的な構造変化が生理機能の発現に重要な役割を果たしていることが古くから指摘されている。液体ヘリウム温度の単一タンパク質分光は凍結させた準安定構造を一つずつ測定できるという点で、このような研究を行うための有力な候補である。しかし、液体ヘリウム温度の顕微分光の技術的困難から、その応用例は近赤外蛍光を発する光合成タンパク質の一種類に限られていた。我々は、低温の共焦点光学顕微鏡と低温用の反射対物レンズを独自に開発することで、二光子蛍光過程を用いた液体ヘリウム温度の単一タンパク質の可視蛍光分光に成功し、報告した [1,2]。ごく最近、さらに要素技術開発を進めることで、液体ヘリウム温度で可視一光子励起の単一タンパク質分光に成功した。本講演では、この結果と二光子励起の結果とを合わせて技術的な側面から報告する。

二光子励起の長所は(1)対物レンズの球面収差による画像のぼやけが実行的に小さくなることと(2)背景光が小さいことである。共焦点系で二光子励起過程を用いた場合、励起密度の分布(I_{PSF}^2)は光強度分布(I_{PSF})の二乗に比例する。開発した対物レンズの I_{PSF} (図 1A)の第一暗環半径におけるエンサークルドエネルギー[3] (EE_{1st})は球面収差によって0.2 であるが、 I_{PSF}^2 の EE_{1st} (図 1B)は0.5に改善する。この I_{PSF}^2 が二光子過程における励起密度分布となる。よって、ある程度の球面収差がある対物レンズを用いても、理想に近い低温の顕微分光が可能になる。一方、二光子過程の効率は励起光強度の二乗に比例するため、背景光は対物レンズの焦点のみから発せられ、その大きさが小さくなる。図 2 に、液体ヘリウム温度の単一 AcGFP1[4]の二光子蛍光を示す。これは AcGFP1 の自家蛍光に由来する。図 2A、2B の正の時間は単一 AcGFP1 からの二光子蛍光であり、負の時間は試料面上の異なる位置で測定した背景光である。図のように、単一 AcGFP1 の蛍光は数 10 秒後に1段階で消失した。単一 AcGFP1 の蛍光と背景光との比は 13:1 と高い値であった。また、蛍光スペクトルにおいても、背景光の強度は CCD の読み出しノイズ以下であった(図 2C)。

二光子励起の短所は発色団が光退色しやすいことにある。約 300 個の単一 AcGFP1 に対して測定を行ったところ、25%は、図 2A のように、10 秒以上で光退色し(励起サイクルで九万回[5])、残りの 75%は、図 2B のように、10 秒以下であった。我々の経験からスペクトル測定には図 2A 程度の寿命が必須であり、単一 AcGFP1 の系では全体の 25%しかスペクトル測定が出来ない。しかし、図 2B 程度の寿命でも蛍光イメージングには十分である。

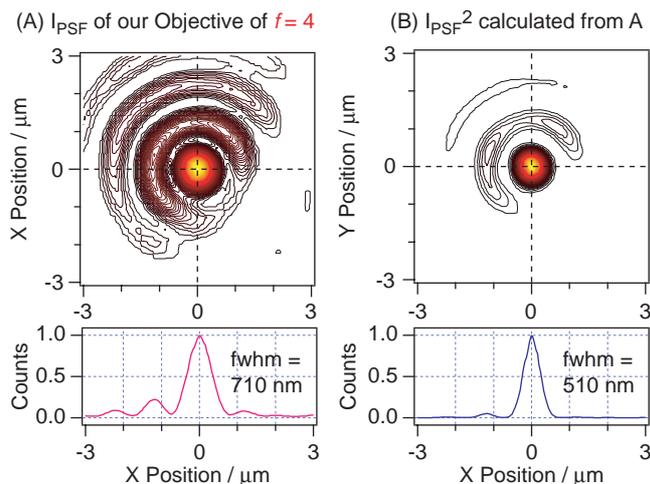


図1. (A) 温度 1.5 K における開発した反射対物の点像分布関数。焦点距離 f は 4 mm、波長は 800 nm。この関数はポリスチレンビーズの散乱によって実測した [2]。 (B) A の関数の二乗 (I_{PSF}^2)。これは二光子過程の励起密度分布に対応する。第一暗環におけるエンサークルドエネルギー[3]は A では約 20%、B では約 45% であった。 I_{PSF}^2 の方が球面収差の影響が少なくなる。

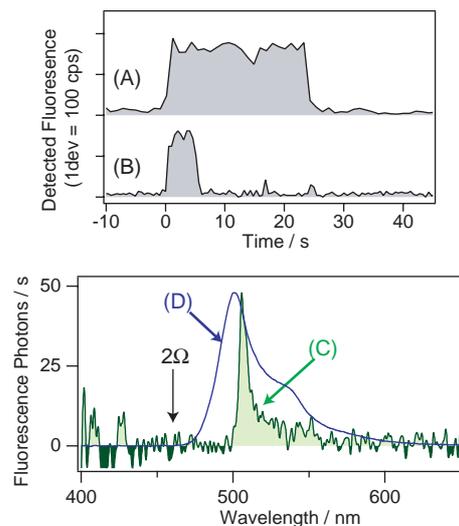


図2. 温度 1.5 K における単一 AcGFP の二光子蛍光の時間変化(A&B)およびスペクトル(C)。励起光強度は 150 kWcm^{-2} 。 (D) 集団平均の二光子蛍光スペクトル。励起波長はすべて 920 nm である。

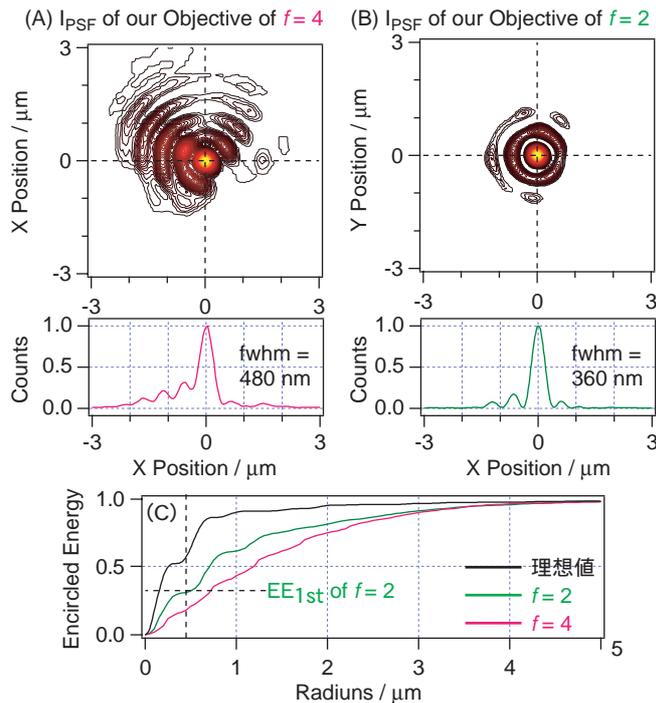


図3. 温度1.5 Kにおける反射対物の点像分布関数 (I_{PSF}). 焦点距離 f は 4 mm (A) および 2 mm (B)、波長は400 nm. この関数は図1と同じく実測値である [2]. (C) 異なる焦点距離の反射対物のエンサークルドエネルギー [3] および無収差の場合 (理想値). 波長が400 nmであるために、図3Aは図1Aに比べ、球面収差があらわになっている。これに対して、焦点距離 f が半分の図3Bでは球面収差が補正させ、理想値に近づいているのが分かる。図4では図3Bの対物レンズを用いた。

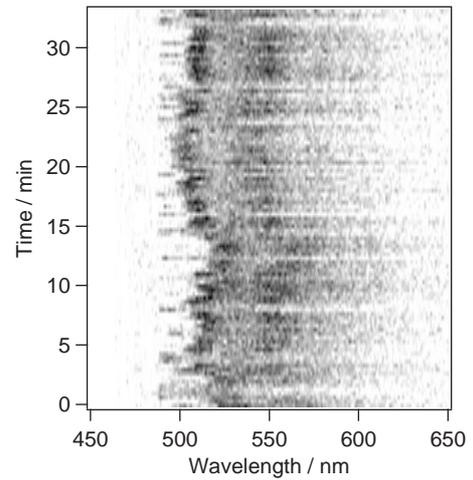


図4. 温度1.5 Kの単一AcGFP1の一光子蛍光スペクトルの時間変化. 励起波長は455 nm、励起光強度は 10 Wcm^{-2} 、励起サイクルは1秒当たり約一万六千回と見積もった. 図中の黒い部分が強度の強い所に対応する. 図を見ると、スペクトルが時間と共に変化しており、これはタンパク質および発色団の構造変化を反映している。

よって、二光子過程の単一タンパク質分光では、背景光が高い系である細胞内にある単一タンパク質の蛍光イメージングなどへの応用の可能性が高い。

一方、一光子励起の単一タンパク質分光では、二光子励起で述べた長短所が逆転し、背景光の除去のために対物レンズに高い性能を要求するが、長時間測定が可能である。図 3A に、一光子励起の条件に近い波長400 nmにおける図1Aと同じ対物レンズの I_{PSF} の実測値を示す。図 1A に比べて波長が 1/2 であるため、 I_{PSF} に球面収差があらわになっている。励起波長が短くなると一般に背景光が増大するため、背景光の除去のために球面収差を補正することが必須である。この球面収差は、原理的に、レンズの焦点距離に比例することから、我々は焦点距離が 1/2 の対物レンズを作成・評価を行った (図 3B) [6]。図 3C のように、励起密度に対応する $EE_{1\text{st}}$ は焦点距離 2 mm では 0.3 であり、4 mm では 0.15 であり、 $EE_{1\text{st}}$ が二倍の向上が見られた (但し、これは $EE_{1\text{st}}$ の無収差で見積もった理想値の 1/2 であり、改善の余地がある。)

図 4 に可視一光子励起による温度 1.5 K の単一 AcGFP1 の蛍光スペクトルの時間変化を示す。図の黒い部分が強度の強い所に対応する。図4は背景光を引き算しており、信号と引き算した背景光との比は 2:1 であった。これは図 3A&3B の 12:1 と比べて低い値であった。図 3B のように対物レンズの改良を行っても、一光子励起の短所が残っている。一方、図 3A では励起サイクルが約二十万回で光退色したのに対して、図 4 では励起サイクル三千万回でも光退色が起こらなかった。つまり、三桁以上の向上が見られた。このように一光子励起過程では長時間測定が可能であり、背景光に注意すれば、多くの生理活性を司るタンパク質へ応用できるはずである。

1. S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, M. Matsushita; *Physical Review Letters*, **100**, 168101 (2008).
2. S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, C. Kim, M. Matsushita, A.M. van Oijen, J. Schmidt; *Applied Physics Letters*, **91**, 051125 (2007)
3. エンサークルドエネルギーとは点像の中心から任意の半径の円の中に入る光量. 全空間の積分値を 1 とする.
4. 試料には単量体の Green Fluorescent Protein である AcGFP1 を用いた.
5. 装置の蛍光検出効率 2%、検出光子数 150 cps、時間 10 秒、室温での蛍光量子収率 0.82 から見積もった.