

3P053

可視一光子励起を用いた液体ヘリウム温度の 単一タンパク質分光装置の開発と応用

(東工大院理工)○平野 充遥・藤芳 暁・松下 道雄
(総研大葉山高等研¹・総研大先端科学²)伊関 峰夫¹・渡辺 正勝²

【序】タンパク質の準安定構造は無数にあり、生理条件下ではその構造間を絶えず行き来することが生理機能の発現に重要な役割を果たしている。液体ヘリウム温度(1.5 K)の単一タンパク質分光ではタンパク質の構造を一つの準安定構造を凍結させることで個別測定が可能である点で、上記の研究を行うための強力な手段の一つである。ごく最近、我々は液体ヘリウム温度で動作する反射型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温度 1.5 K 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]。我々はさらに技術開発を進め、可視一光子励起過程を用いても温度 1.5 K の単一タンパク質分光が実行可能であることを見いだしたので報告する。講演では、緑蛍光タンパク質の一つである AcGFP1 の自家蛍光をプローブとした単一タンパク質分光と牛血清アルブミン(BSA)に結合させた色素(Alexa647)の結果とを示しながら議論をおこなう予定である。

【装置および試料】本研究で用いた装置は参考文献1に示した温度 1.5 K の反射型顕微分光装置を元に新規に作成した。励起光にはチタンサファイアレーザーの第二高調波(波長 455 nm)およびヘリウムネオンレーザーの出力(波長 633 nm)を用いた。対物レンズには、文献2に示した液体ヘリウム温度下で使える反射型対物レンズを用いた。反射光学系を用いることで、波長 370 nm から 633 nm までの任意の励起波長を選択できるようにした。

試料溶液には、濃度 50 pM の AcGFP1 および Alexa647 で標識した BSA のリン酸緩衝溶液(濃度 10 mM、pH = 7)を用いた。この溶液に重量で 0.5% のポリビニルアルコールを混ぜ、回転数 3000 rpm で基板にスピコートすることで低温用の試料を作成した。この条件では、単一タンパク質の蛍光イメージを測定すると、個々のタンパク質が空間的に分離した輝点として観測される[1]。単一タンパク質の蛍光スペクトルは、分離した輝点に励起光を合わせて測定した。

【結果と考察】図 1 に、温度 1.5 K で測定した単一 AcGFP1 および単一 BSA の蛍光スペクトルを示す。一つのスペクトルの積算時間は 20 秒である。図 1a は単一 AcGFP1 の蛍光スペクトルの時間変化であり、縦軸は経過時間、横軸は蛍光波長であり、図の中で黒い部分が強度の強い部分に対応する。単一 AcGFP1 の蛍光は波長 500 nm から 550 nm に現れ、その形状は時間共に変化し、経過時間 7.3 分に 1 段階で消光した。時間 0 分から消光(7.3 分)までの蛍光スペクトルを時間積算すると、図 1b の緑の実線になり、(若干、長波長シフトしているものの)集団平均のスペクトル(黒実線)とほぼ一致した。

任意の経過時間での蛍光スペクトルを図 1c(4.0 分から 4.3 分)および図 1d(5.0 分から 5.3 分)に示す。図 1c では、単一 AcGFP1 の信号がほぼ完全に集団平均のスペクトル(黒実線)と重なった。一方、図 1d を見ると、スペクトル極大が長波長に移動し、スペクトル形状も変わっている。これは、AcGFP1 の発色団の構造が電子励起状態を経由した構造変化に由来する可能性があり、さらに研究を進めて行きたいと考えている。図 1c、図 1d のスペクトル幅は、類似のタンパク質の結果から、温度 1.5 K の均一幅と比べると四桁以上太い。Alexa647 の場合も同様であった。この太い幅は、積算時間内(20 秒)に起こった複数回のスペクトル変化に由来すると解釈している。

図 1e は BSA に結合した単一 Alexa647 の蛍光スペクトルの時間変化である。総じて、Alexa647 は AcGFP1 に比べて、光退色までの時間が長く、図 1e の分子では100分以上経過しても退色しなかった。一方、AcGFP1 と同様に、単一 Alexa647 の蛍光スペクトルの時間平均(図 1f、赤)と集団平均(黒実線)とが一致した。任意の経過時間のスペクトル(図 1g, 1h)では、単一 Alexa647 のスペクトル幅は集団平均(黒実線)の1/3程度である。これらのスペクトルと図 1e から分かるように、単一 Alexa647 の蛍光は線幅程度のスペクトル変化を繰り返すことで、時間平均のスペクトルが集団平均のスペクトルと一致する。これは AcGFP1 に比べて、スペクトル変化の頻度が少ないことを意味している。今後はこの Alexa647 を含めて様々な色素および発色団の単一分子分光を行い、図 1a の単一 AcGFP1 で見られたスペクトル変化の詳細を明らかにしていきたい。

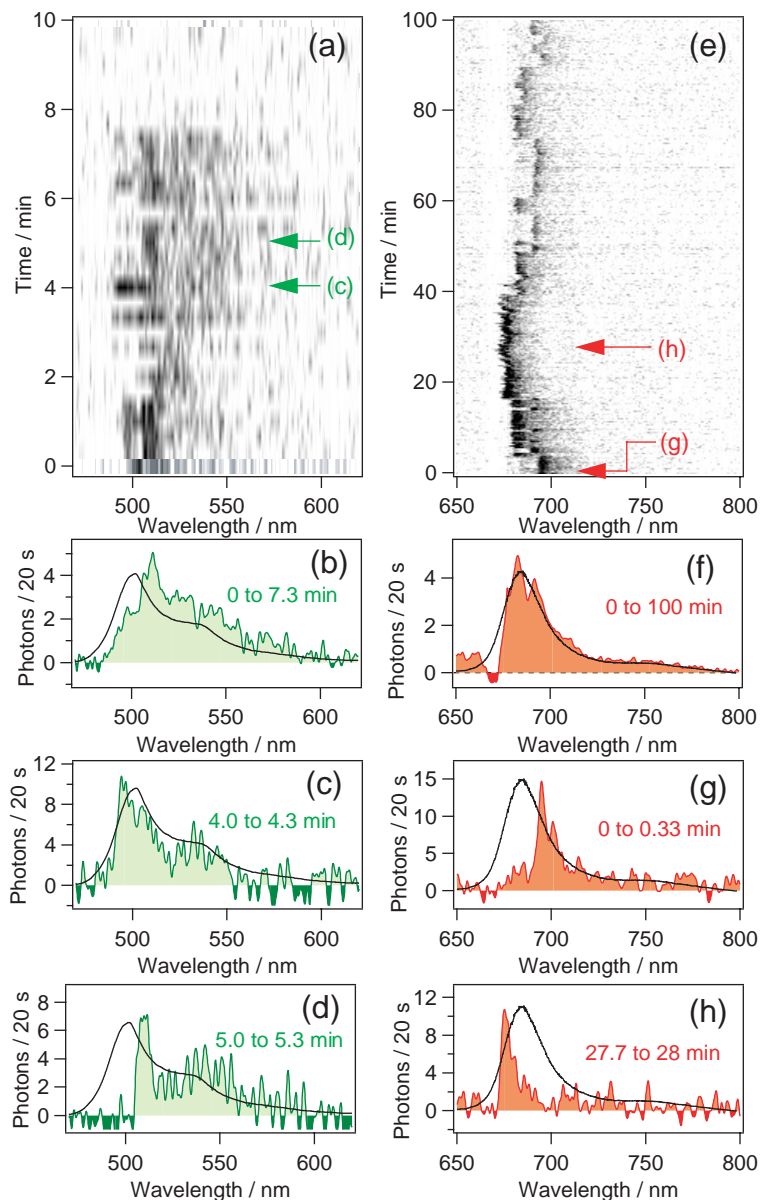


図1. 温度1.5 Kにおける単一AcGFP1およびBSAに結合した単一Alexa647の蛍光スペクトル.

参考文献

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)