

1B20

タンパク質の赤外吸収の単一分子観測：

色素の光熱サイクルに対する考察

(東工大物理¹・総研大学融合センター²・総研大先端科学³)

○藤芳 暁¹・古屋 陽¹・伊関 峰夫²・渡辺 正勝^{2,3}・松下 道雄¹

可視光および近赤外光を用いた単一分子蛍光分光法は、生体内の一つ一つのタンパク質の空間位置やその時間変化を個別に決定する方法として確立している。この位置情報に加えて、個々のタンパク質の構造情報を得ることができれば、生理機能の理解がさらに深まるはずである。赤外光を用いた吸収分光法はタンパク質の立体構造および機能を理解するために広く用いられており、単一分子の構造情報を得るための有力な候補である。しかし、中赤外吸収分光は単一分子レベルの感度を有していなかった。そこで、我々は新しい光学課程（赤外誘起蛍光回復）を発見し、これを利用することで約5桁の感度向上に成功した。その結果、単一タンパク質の赤外振動分光を世界で初めて実現した[1]。本講演では、発見した色素 Alexa Fluor 660 (A660) の赤外誘起蛍光回復の結果を示し、議論を行う予定である。

【装置】図1に装置の概要を示す。励起光には、量子カスケードレーザーの出力（波長 6000 – 6400 nm）とヘリウムネオンレーザーの出力（波長 633 nm）とを用いた。これらの光を同軸に合わせた後、電動ミラーと2枚の凹面ミラーを通し、温度 1.5 K の恒温槽にある対物レンズ（開口数 0.6、フッ化カルシウム製）によって、試料に照射した。

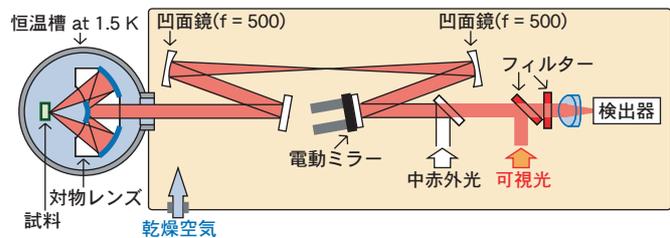


図1. 温度1.5 Kの中赤外-可視顕微鏡.

この配置では、電動ミラーの角度を変えると、試料上の二つの励起光の相対位置を変えずに、絶対位置を走査することができる。色素から放出された可視蛍光は、励起光と同じ経路を通り、フィルターを通過し、光検出器によって観測した。試料には、A660 をラベルした牛血清アルブミン (A660-BSA) の重水緩衝溶液を用いた。

【A660-BSA の赤外誘起蛍光回復】図1の装置を用いて、A660-BSA の可視蛍光イメージとその赤外応答を測定した。結果を図2にしめす。位置 $x = 6 \mu\text{m}$, $y = 10 \mu\text{m}$ にある A660-BSA は可視光のみでは発光せず、赤外光を加えると発光することが分かった。これが発見した A660 の赤外誘起の蛍光回復である。一方、 $x = 10 \mu\text{m}$, $y = 5 \mu\text{m}$ の A660-BSA は赤外照射に関係なく発光していた。

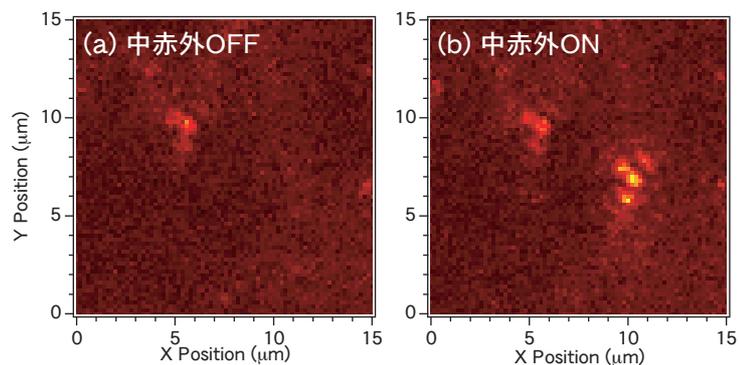


図2. 温度1.5 KのA660-BSAの可視蛍光画像。(a) 中赤外照射前、(b) 中赤外照射後. 可視光の波長は633 nm、強度は 60 Wcm^{-2} 、中赤外光の波長は6060 nm、強度は 3000 Wcm^{-2} であった。

これは、赤外照射によって無蛍光状態にある A660-BSA は蛍光状態へと変化するが、蛍光状態の A660-BSA には影響を及ぼさないためである。実際に、 $x = 10 \mu\text{m}$, $y = 5 \mu\text{m}$ のような蛍光状態にある A660-BSA を可視光照射により無蛍光状態にした後に、赤外光照射を行うと、7割の A660-BSA の蛍光が回復した (50 個中 34 個)。

【赤外誘起蛍光回復の強度依存性】 赤外誘起蛍光回復現象を用いて赤外作用スペクトルを測定するために、単一 A660-BSA の蛍光回復の赤外強度依存性 (図 3) を測定した。各測定を開始する前に、可視光照射により A660-BSA を無蛍光状態にした。可視光は、30 秒間、連続的に照射しながら、赤外光は時間 0 から 10 秒の間だけ照射した。強度 400 W cm^{-2} の赤外光を照射すると A660-BSA の蛍光は瞬間的に回復した。赤外光照射中の蛍光強度は一定であり、赤外光を止めた後、数秒で無蛍光状態になった。これに対して、一桁弱い強度 30 W cm^{-2} では、蛍光の回復に数秒かかり、また、照射中に数回、消光-回復を繰り返している。このように、赤外の応答時間には強度依存性があるために、蛍光回復量の赤外光強度依存性を測定すると (図 3b)、強度の弱いところでは正の傾きを持ち、約 300 W cm^{-2} から飽和した。よって、以下の測定では、赤外光強度を 100 W cm^{-2} 以下にした。

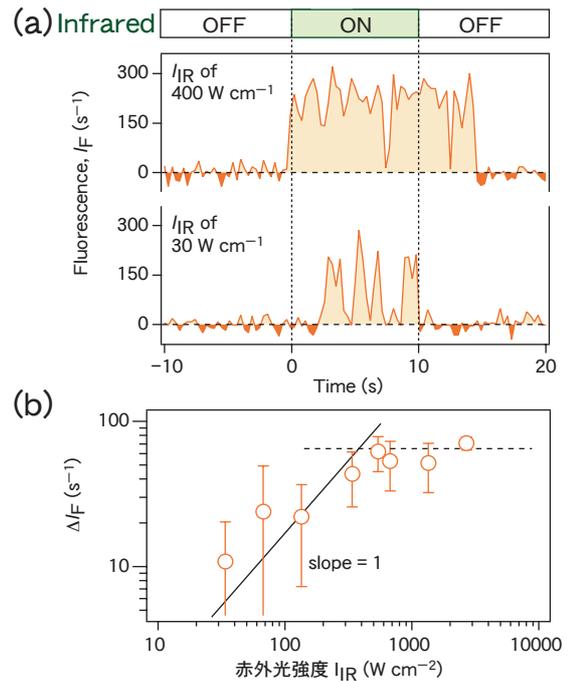


図3. (a) 中赤外光に対するA660-BSAの蛍光強度の時間変化. (b) 中赤外誘起の蛍光回復の中赤外光強度依存性.

【単一 BSA の赤外作用スペクトル】 図 4a の黄色に、単一 A660-BSA の赤外誘起蛍光回復の赤外波数依存性 (いわゆる赤外作用スペクトル) を示し、図 4b に 11 個の異なる A660-BSA からの作用スペクトルの平均 (赤) を示す。また、それぞれの図に黒の実線で、BSA のフーリエ変換赤外 (FTIR) スペクトルを示す。単一 A660-BSA の作用スペクトル (図 4a) および 11 個の平均のスペクトルの形状 (図 4b) は FTIR スペクトルと良く一致する。よって、図 4a の赤外作用スペクトルが単一 BSA の赤外吸収に由来すると結論した。

さらに、得られた作用スペクトルが A660 自身の赤外吸収ではないことを確認するために、重水緩衝溶液中の (タンパク質を結合していない) A660 の測定を行った。図 4c に結果を示す。重水は 1600 cm^{-1} 付近に弱い赤外吸収を持つ (図 4c、黒線)。図 4c のように、重水中の A660 に対して図 4a と同じ実験をすると、重水に由来する赤外作用スペクトルが得られた (青)。図 4b と 4c のスペクトルは明らかに異なり、BSA と重水の FTIR スペクトルに一致する。よって、A660 自身の赤外吸収ではなく、その周囲の赤外吸収によって、A660 の蛍光が回復したことを確認した。

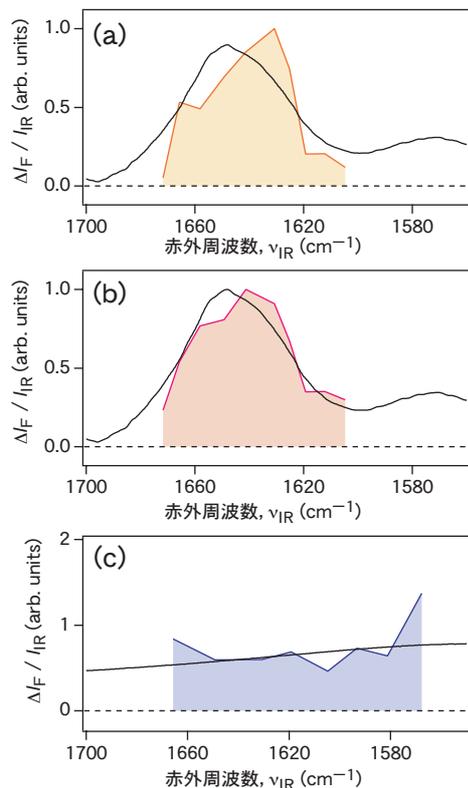


図4. (a) 単一A660-BSAの赤外作用スペクトル. (b) 11個の異なるA660-BSAの平均. (c) 11個のA660から得られた重水の赤外作用スペクトルの平均.