

【序】 タンパク質分子は、熱反応や構造ゆらぎなど、熱によって駆動されるダイナミクスを示す。このようなダイナミクスは、タンパク質の機能の発現に重要な役割を果たす。一分子測定は、アンサンブル測定では平均化されて観測の難しい、熱駆動のランダムな変化を観測するうえで、きわめて有効な手法である[1]。本研究では、従来の一分子測定法とは異なる次の三つの特色を持った一分子測定法の開発に取り組んだ。一つ目の特色は、マイクロ秒の時間分解能である。これはイメージングによる従来法と比べると3桁近く高い。二つ目の特色は、一分子のダイナミクスを蛍光スペクトルによってとらえることである。強度のみでなく、スペクトルの変化を測定することによって、分子のダイナミクスについてより詳細な情報が得られると期待される。三つ目の特色は、対象分子を固定しないことである。イメージングによる従来法では、ガラス表面などに対象分子を固定して観測することが多い。しかし、分子を固定しないことによって、固定に伴う対象分子への影響、試料調製の煩雑さを避けることができる。本発表では、製作した装置の性能評価について報告する。

【原理】 CCD 検出器の電荷転送機能を利用することで、マイクロ秒の時間分解能でスペクトル測定を行う。CCD 検出器の受光面の最上段一列目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、露光時間内に一列目で発生した電荷が、電荷転送時間を経て下段へ転送される。これを繰り返すことで、素子の上下方向へ電荷を展開し、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。本研究で用いた検出器の電荷転送時間は2 マイクロ秒である。以上の原理によって、シングルイベントの発光をマイクロ秒の時間分解能で測定する。

一分子検出は、ガラスキャピラリーの中に約 10^{-15} Mの希薄溶液を流すことによって行う。そこへアルゴンイオンレーザーの光をレンズで絞り、照射する。レーザー光照射体積中に精々1個の分子が存在する濃度条件で分子を励起することによって、一分子からの発光を検出する。

【実験と結果】 CCD 検出器によるマイクロ秒時間分解測定の実験を行った。光学チョッパーを用いてレーザー光強度に変調をかけ、上記の原理によってレーザー光強度の時間変化を測定した。チョッパーの周波数は固定し、露光時間を変化させた。そして、チョッパー周期を周期信号一周分分のピクセル数で割った1ピクセル当たりの時間と露光時間の関係を調べた。結果は図1に示すとおり、1ピクセル当たりの時間は、露光時間に対して係数1で変化した。これは、上記の原理で時間分解測定が行われていることを示して

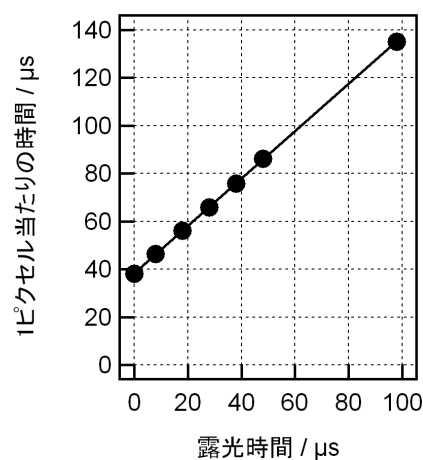


図1. 露光時間と電荷転送時間の和に対して1ピクセル当たりの時間をプロットしたもの。実線は直線にフィットしたもの。

いる。切片は電荷転送時間に相当し、38 マイクロ秒であった。これは本来ならば 2 マイクロ秒になるべき値であり、36 マイクロ秒余分に要する原因をメーカー側で調査中である。

次に、一粒子ごとの観測が可能であるかを確認する実験を行った。蛍光色素を含むビーズの水溶液を試料として用い、レーザー照射部分に精々一粒子ずつ存在するように濃度を調節した。試料からの発光を検出し、時間に対して強度をプロットしたところ、バンドが時々出現した。このバンドは、試料として水のみを用いたときには現れなかったもので、これを蛍光ビーズに由来するものと帰属した。そして、このバンドに関して、ビーズの相対濃度 1/4、1/2、1 のときの強度と出現頻度を調べた。その結果、強度の平均値は濃度によらずほぼ一定であった。また、図 2 に示すように、バンドの出現頻度は濃度に対して比例した。これらは、各バンドが蛍光ビーズ一粒子に由来することを示している。したがって、上に述べた原理によって一分子検出が可能であると考えられる。

続いて、蛍光ビーズ（発光極大 510 nm）と量子ドット（発光極大 655 nm）の混合水溶液の測定を行った。図 3 に混合水溶液の測定例を示す。585 nm 付近に観測された光は、水によるラマン散乱である。これは時間に対して連続的に観測された。一方、粒子による発光は、図に示すように筋状に観測された。これは、水分子はレーザー光照射体積中に常に存在しているが、粒子はレーザー光照射体積内に時々流れてくる様子を示している。図 3 では、二種類の粒子による発光が異なった時刻に、異なった波長に観測された。このように、本方法では、粒子のもつ不均一性を発光スペクトルの違いによって観測できる。

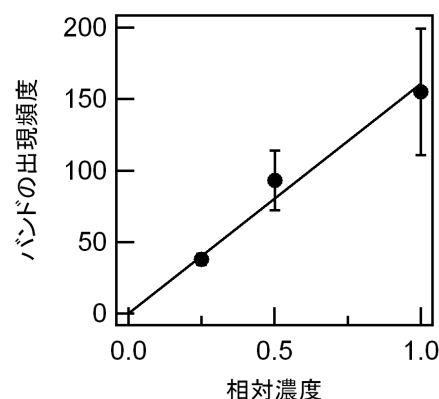


図 2. 蛍光ビーズの相対濃度に対してバンドの出現頻度をプロットしたもの。実線は 3 点で直線フィットしたもの。

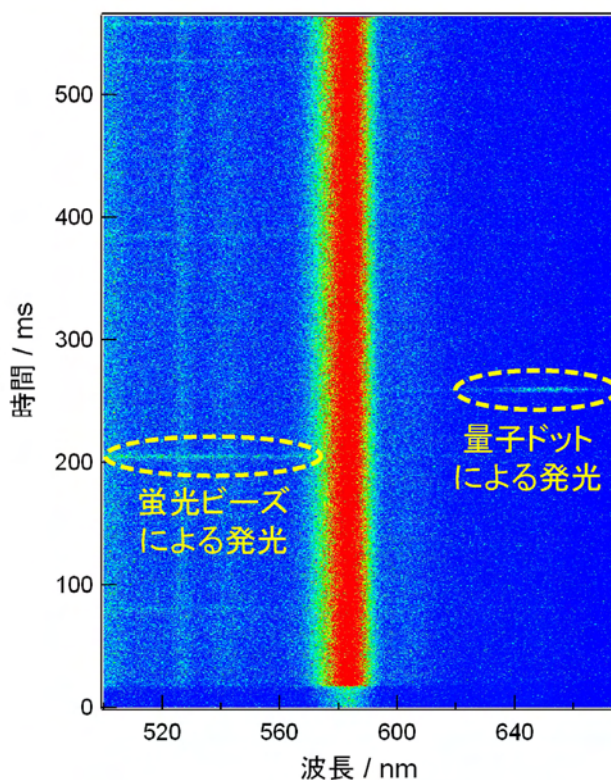


図 3. 時間分解データの例。横方向が波長軸に、縦方向が時間軸に対応する。