

色素修飾を必要としない単一タンパク質分光
Single-protein spectroscopy without dye-labeling

東京工業大学 物理 藤芳 暁

あるタンパク質の生体内での機能を考えるとき、タンパク質の種類だけで決まる機能を常に画一的に発揮しているわけではない。それぞれのタンパク質分子は、どの細胞のどの場所に在るかといった、局所環境に応じて酵素としての触媒機能を調節したり、シグナル伝達の過程として別の分子との会合定数を変えたりしている。こうしたタンパク質一分子ごとの振舞いを解明し制御するための切り札となるのが単一タンパク質分光である。特に、我々は、タンパク質が天然状態で持つ色素を温度数ケルビンで一分子ごとに分光することで、タンパク質の構造の多様性を研究することに興味を持っている。

数ケルビンの単一タンパク質分光は、1998年オランダ、ライデン大学の J. Schmidt らにより、光合成細菌の光受容色素タンパク質複合体を試料として世界で初めて実現した[1]。この色素タンパク質複合体には、天然状態で近赤外光を吸収する色素を持つ。この色素が太陽光を集めるアンテナとして働く。Schmidt らは試料を凍結し、熱揺動による構造変化を抑制することで、色素1分子の吸収スペクトルからタンパク質の局所構造を1分子ごとに観測できることを実験的に実証した。しかし、以下の実験的な制約のため、その応用例は上記のタンパク質のみに限られていた。一つの分子を長時間(1時間以上)に渡り測定するためには、試料と共に、対物レンズも低温下に配置する。しかし、色収差が十分に補正された組レンズ型の対物レンズは低温で動作しないため、色収差が顕著な単レンズが用いられていた。このため、約10年にわたり、測定可能な波長領域は近赤外領域(>800 nm)に限定されていた。ほとんどのタンパク質は近赤外光を吸収する色素を持たないため、生理機能を持つ他のタンパク質への応用は不可能であった。

このような状況で、我々は2004年から本研究をスタートさせた。はじめに取り組んだのが、低温で使える反射対物レンズの開発である。レンズ自身を独自に設計・試作・評価を重ね、2007年、上記の色収差の問題を解決した[2]。この作成した対物レンズはSchwartzchild型の反射対物レンズをモデルにしている。Schwartzchild 対物レンズは二枚の球面鏡からなり、原理的に色収差は無い。しかし、これら球面鏡の相対配置に高い精度が要求されるため、低温下では使用できない。そこで、我々はこれらの球面鏡を一個の合成石英上に作ることで、低温でも動作可能な一体成型型の反射型対物レンズを開発した。この技術を元に、反射光学系を用いた数ケルビンの光学顕微鏡を開発することで、2008年に世界で初めて数ケルビンの可視域の単一タンパク質分光に成功した[3]。さらに、この技術により色素修飾せずに、ミドリムシの光回避反応を司るタンパク質自身の蛍光を、一分子レベルで観察することに成功した[4]。

我々は、山田財団の研究助成によって、この技術を細胞系へ応用するため、数ケルビンの試料の3次元イメージング法を確立した[5]。上に述べたように試料と対物レンズを数ケルビンに冷却しているため、試料の位置を走査することができない。そこで、試料と対物レンズの相対位置は変えずに、ヘリウム槽の外部においた4枚の凹面鏡の位置を変えることで、レーザースポットを3次元に走査させる共焦点顕微鏡を設計、制作した。すでに、この顕微鏡を用いて、数ケルビンの1分子の3次元イメージングに成功している。

1. A.M. van Oijen, M. Ketelaars, J. Köhler, T.J. Aartsma, J. Schmidt; *Science* **285**, 400 (1999).
2. S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, C. Kim, M. Matsushita, A.M. van Oijen, J. Schmidt; *Appl. Phys. Lett.* **91**, 051125 (2007).
3. S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, M. Matsushita; *Phys. Rev. Lett.* **100**, 16801 (2008).
4. S. Fujiyoshi, M. Hirano, M. Matsushita, M. Iseki, M. Watanabe, *Phys. Rev. Lett.* **106**, 078101 (2011).
5. M. Maruo, H. Inagawa, M. Matsushita, S. Fujiyoshi; in preparation.