B818

合成小分子とレーザーを用いた細胞内タンパク質の不侵襲的不活性化法

○余郷 能紀¹、菊地 和也^{1,3}、井上 尊生¹、廣瀬 謙造²、飯野 正光²、長野 哲雄¹ (¹ 東大院薬、² 東大院医、³ 科技団・さきがけ)

生体分子の機能解明には、分子生物学・薬理学・生化学等様々な手法を用いて標的分子を不活性化する研究が有効であるが、中でもレーザー分子機能不活性化法 (Chromophore-assisted Laser Inactivation: CALI) は時間的・空間的に厳密に制御した不活性化ができるため注目を集めている。CALI は、色素が結合した抗体を細胞内に導入し、標的分子に結合した後、この結合体にレーザーを照射し色素から生じるラジカルにより標的分子を不活性化する方法である。CALI はレーザー照射により不活性化の時間と場所を厳密に制御できるという大きな利点を持つものの、標的分子の認識に抗体を用いるために細胞内導入が難しく、生理的条件下解析をすることが困難であった。そこで、我々は膜透過性の合成小分子を CALI のプローブとして新たに開発し、有効に機能することを昨年報告した。本年度では、膜透過性プローブを用いて細胞内 Ca^{2+} 動態における IP_3 受容体の機能を解析した結果を報告する。小分子プローブ、MGIP₃/PM を DT40 細胞の細胞外液に加え、続いて単一細胞にレーザーを照射し、その後 IP_3 を産生する刺激を行った。その結果、レーザーを照射した細胞では Ca^{2+} 応答が大きく抑制された。その条件において IP_3 受容体の関与が示唆されている、細胞外からの Ca^{2+} 流入 (capacitative Ca^{2+} entry, CCE) を誘導した。その結果、CCE には CALI の効果は現れなかった。この結果から IP_3 受容体の活性化は CCE 機構に関与しないことが示唆された。以上のように、膜透過性の CALI プローブを用いることで、複雑な細胞内 Ca^{2+} 動態における IP_3 受容体の機能を生理的条件下解析できることが示された。

T. Yogo, K. Kikuchi, T. Inoue, K. Hirose, M. Iino, T. Nagano : Inactivation of intracellular protein function using synthetic probes and laser beam in intact cells

B820

新しい全反射顕微鏡の開発と応用

○西坂 崇之¹、奥野 貴士²、大川 潤也¹、小椋 光²、圓谷 真人¹、野地 博行³、大岩 和弘⁴ (¹ 学習院大学・理・物理、² 熊本大・発生病学研究センター、³ 東大・生産研、⁴ 通信総合研究所・生体物性 G)

全反射照明は、屈折率の異なる界面に発生するエバネッセント場により、界面近傍の蛍光色素だけを励起する照明方法である。ガラスと水溶液の境界に光が入射する場合、エバネッセント場の侵入長がわずかに 100nm であるため (開口数 ~ 1.4)、背景光のノイズは極限まで抑えられ、単一蛍光色素分子を観察することも可能である。今回、広い範囲 (直径 $\sim 100 \mu\text{m}$ の円の領域) にわたって分布する色素を均一に励起する目的で、以下の 2 点を考慮した光学系を作製した。(1) 境界に入射するレーザーが平行であること。これは対物レンズ型の全反射照明を用いれば容易に実現できる。あらかじめ平行にコリメートしたレーザー光 (波長 532nm) を、対物レンズの back focal plane (以下 BFP) に集光すれば、レーザー光は試料面で平行な光になる。(2) 発生するエバネッセント場が極端に偏光しておらず、xyz すべての偏光成分を持つこと。通常の本一のレーザーを用いた照明方法では、エバネッセント場は入射方向 (x とする) の偏光成分をほとんど持つことが出来ず、偏光の向きは y と z に限定される。そこでまず輪帯状の平行な光線を作り、それを対物レンズの縁の部分を通しながら、BFP の位置に集光させた。試料面においては、光線は全反射の臨界角以上ですべての方向から均一に照射されるため、xyz すべての偏光成分を持つことになる。また干渉パターンを消すため、光路の途中にある拡散板によってレーザー光をスクランブルした。

現在、この新しい全反射照明を用いて、蛍光色素 1 分子からの信号を解析している。蛍光標識した蛋白質をガラス表面に固定し、輝点の明るさを観察すれば、蛋白質の会合の様子を定量化することも可能になる。

T. Nishizaka, T. Okuno, J. Okawa, T. Ogura, M. Tsumuraya, H. Noji and K. Oiwa : Exploration and application of innovative TIRF microscopy.

B819

エバネッセント光励起による単一蛍光分子観察における励起光偏光の影響

○菊本 真人、中森 鈴奈、榊原 斉、大岩 和弘 (通総研・関西・生体物性)

エバネッセント光による蛍光分子励起法は、屈折率の異なる界面での全反射によって発生するエバネッセント場により、界面近傍の蛍光色素だけを励起する照明方法である。この方法を用いると背景光強度を極めて低く抑えることができるので、単一の蛍光分子の観察をビデオレートで行うことができる。一方向からのレーザー入射によってエバネッセント場を形成した場合、エバネッセント光は入射方向 (X 軸とする) の偏光成分をほとんど持たず、Y 軸と Z 軸に偏光の向きは限定される。円偏光した励起光が X 軸に平行に入射したとすると、そのとき生成されるエバネッセント光は Y 軸及び Z 軸方向に偏光を示すので、蛍光分子はこの 2 軸に偏光された励起光により励起される。このような励起光の偏光成分を加味して、ガラス面にランダムな方向に吸着・固定された蛍光分子 (吸収モーメントと発光モーメントの向きが同一と仮定) からの蛍光の強度を計算したところ、その強度分布はガウス分布ではなく、大きく正の歪みをもつ非対称な分布を示す事がわかった。この予測を確かめるために、蛍光性ヌクレオチド・バナジン酸モーター複合体を用いた単一蛍光分子観察を行なった。蛍光性 ADP アナログをバナジン酸と共に S 1 に加えて安定な複合体を形成させた。この複合体をガラス面に吸着させて全反射蛍光顕微鏡下で蛍光スポットとして観察した。この複合体では、S 1 一分子に一個の蛍光性ヌクレオチド分子が結合しているので、モデル予測の評価に適している。測定された蛍光強度の分布は予測されたような大きな正の歪みを持つ非対称な分布となり、励起光の偏光の寄与があることが示唆された。現在、偏光面を回転させて、複合体の蛍光強度変化を直接測定することを試みている。

M.Kikumoto, R.Nkamori, H.Sakakibara, and K.Oiwa : The effect of polarization of excitation light under the single fluorescent molecule observation excited by evanescent wave.

B821

半導体ナノ粒子のブリンキングを制御する

○寺田 尚史¹、奥村 政章¹、河内 康明²、山口 淳一¹、花木 賢一³、山本 健二³、船津 高志^{1,2} (¹ 早大院・生命理工、² 早大・理工・物理、³ 国立国際医療センター研)

半導体ナノ粒子 (量子ドット) は高輝度で、褪色するまでの時間が長いので、生細胞の内部での 1 分子の長時間観察などに使用できると考えられる。量子ドットの問題点は、蛍光強度が時間的に変化するブリンキングと呼ばれる現象を起こすことである。本研究では、溶液に電子受容体や電子供与体を加え、量子ドットのブリンキングに及ぼす影響を検討した。全反射エバネッセント顕微鏡を使用し、量子ドット (QdotTM QuantumDot 社) の蛍光を観察した。複数の量子ドットの 60 秒分の輝度データ (量子ドット個数 $n \times 60 \text{秒} \times 30 \text{ビデオフレーム}$) のヒストグラムを求めた (HEPES buffer のみの場合: 図 A: $n=72$)。電子受容体であるヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウム ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) を 10mM 加えると明るい時間の占める割合が減少した。一方、電子供与体であるピロール ($\text{C}_4\text{H}_5\text{N}$) を 10mM 加えると、明るい時間の占める割合が増加した (図 B: $n=49$)。以上の結果は、量子ドットのブリンキングを制御できることを示唆している。

図 量子ドットの蛍光強度のヒストグラム

N. Terada, M. Okumura, Y. Kawachi, J. Yamaguchi, K. Hanaki, K. Yamamoto, T. Funatsu : Control of the Blinking of Quantum Dots