水溶液中のCdSe/ZnS/TOPO 微結晶-分子シャペロン複合体の 形成と顕微画像計測

堀内 博視¹, 臼倉 英治¹, 大滝 証¹, 飯塚 怜¹, 小田 勝^{1, 2} 谷 俊朗^{1, 2}, 養王田 正文^{1, 2}

¹東京農工大学大学院工学府,²共生科学技術研究院ナノ未来科学研究拠点 〒184-8588 東京都小金井市中町2-24-16

In aqueous solution complex formation and interaction between CdSe/ZnS/TOPO nanocrystal and molecular chaperone and its characterization by single molecule imaging technique

Hiromi Horiuchi¹, Eiji Usukura¹, Akashi Ohtaki¹

Ryo Iizuka¹, Masaru Oda^{1,2}, Toshiro Tani^{1,2} and Masafumi Yohda^{1,2}

¹Graduate school of Engineering, ²Strategic Reserch Initiative for Future Nano Science

and Technology Tokyo, University of Agriculture and Technology

Naka-cho 2-24-16, Koganei-i, Tokyo, 184-8588, Japan

Abstract

In aqueous solution, CdSe/ZnS/TOPO nanocrystals (quantum dots: QDs) readily aggregate due to their hydrophobic property. Proteins are basically hydrophobic internal region and hydrophilic external one. Molecular chaperones are the proteins which recognize hydrophobic region of denatured proteins and encapsulate and refold them. It seems possible that the molecular chaperones can also capture the QD with similar characteristics and form a complex of QD-molecular chaperone. We have prepared prefoldin (PFD) as a molecular chaperone and selected butanol as the most dispersible water-soluble solvent of the QDs without their aggregation. While biochemical procedures are evaluated with ordinary fluorescence measurements, we have also provided possible experimental evidence of complex formation of QD-PFD in aqueous solution by single molecular imaging technique.

<u>1. はじめに</u>

配 位 溶 媒 Tri-octylphosphine oxide (TOPO)で保護された CdSe/ZnS/TOPO 半 導体ナノ微結晶(量子ドット:QD)は一 つの励起波長で粒径に応じて様々な波長 の蛍光発光が得られ,高発光量子効率と 光安定性が良好で有用性が高い.しかし, 疎水性表面を持つため有機溶媒中では安 定に分散するが,水溶液中では凝集する. 一方蛋白質分子は一般に外部が親水性で 水溶性となり、内部は疎水性の性質を持 つ.特に、疎水部を露出している変性タ ンパク質を捕獲する蛋白質である分子シ ャペロンに対して、同様に疎水性表面を 持つ QD を内部に捕獲した複合体を形成 [1]させることができれば、新たな分子デ バイス機能開発が期待される.現在、QD と分子シャペロンの複合化の条件検討を 進めているが、蛍光発光特性の変化と1 分子顕微画像計測から QD と分子シャペ ロンの相互作用に関する基礎的な情報を 得て,メカニズムの解析を行う事を目指 している.

<u>2. 実験方法</u>

1) 試料作製

測定に使用した CdSe/ZnS/TOPO 系量子 ドットは Bawendi[2], Alivisatos[3]グルー プらの手法を,使用する配位溶媒の蒸留 精製や配位溶媒 TOPO/hexadecylamine (HDA)の混合比や作製温度などの条件の 最適化等の改良を行い,作製した試料で ある.分子シャペロンとしては超好熱性 菌由来のプレフォルディン (PFD)を使用 した[4].図1に示すように PFD は生体内 で作用するので,疎水性の QD と PFD を 組み合わせる為には水溶液(緩衝液)に QD を分散させる事が必須である.



図1. プレフォルディンと量子ドット構造

そこで 2µM の濃度で QD を混合させた 種々の水溶性溶媒に,紫外励起光を照射し て蛍光を観察評価した結果,ピリジン,n-ブタノール,プロパノール,アセトニトリ ルの4種類が QD を凝集させずに良好に分 散させる水溶性溶媒の候補として挙げられ た.更にPFD を失活させないことを考慮す ると n-ブタノールが最適な水溶性溶媒(緩 衝液中に 5v/v%以下の添加量では PFD を失 活させないことを活性試験で確認)として 選び,この n-ブタノールに QD を濃度 5µM で分散した母溶液を作製した.母液を測定 目的に応じて次の QD 濃度になるよう希釈 して測定試料溶液を作製した;

a) QD 蛍光スペクトル測定用

緩衝液 (pH7.5: 25mM HEPES, 100mM KCl)
に予め濃度 k = 0~50 (k = PFD モル数/QD
モル数) で PFD を添加し分散させておく.
その液に攪拌しながら QD 濃度が最終的
に 25nM になるように n-ブタノール分散
QD 母液を添加し測定溶液を作製した.

b)1 分子顕微画像計測用

予め緩衝液中に 1v/v%の t-ブタノールを 添加しておき, ブタノール分散 QD 母溶 液を添加して超音波分散後, QD 濃度 1.6nM になる様に濃度調整し, 濃度 k = 5 の Cy5 ラベル化 PFD を添加する. この溶 液 10μl を石英基板 (25×55×1mm³) 上に滴 下, カバーガラスで封印(液層厚:40μm) し, 顕微画像計測用試料を作製した.

2) 実験装置

顕微画像計測は2波長励起全反射蛍光 顕微鏡によって行われる(図2参照). 主な光学系は倒立型光学系顕微鏡(TE-2000, Nikon)を改造し対物レンズは×100, NA = 1.45 油浸タイプを使用している.



励起光源としては 2 個の異なった波長 (532 と 633nm)のレーザーを備えている. QD と Cy5 のそれぞれの励起波長での各 吸収スペクトルの重なりが殆どないので 励起波長を変えることによりそれぞれの 蛍光顕微画像上の蛍光点を区別できる. 画像の読み出しには 2 次元 CCD カメラ (Cascade-512B, Roper Science)を用い, 100ms/imageの露光時間で 300 枚の画像が 蓄積される. ピクセル数は512×512 個で, 試料上で 110nm/pixel に一致する.

3. 結果と考察

 緩衝液中の QD 蛍光スペクトル測定結果
 図3に示されているように PFD 濃度の増加に伴い蛍光強度 (λ_{ex} = 430nm)が増加し, k = 50 の PFD 添加時は, PFD が無い時に比べ蛍光強度が約1オーダー以上増加した. 挿入図に見られるように添加 PFD 量に対しほぼ線形の蛍光強度増加が観測された. PFD の存在により QD と PFD が結合した複合体が形成され, k = 0 の QD の 蛍光が回復されることを示唆する.



図 3. 緩衝液中の QD 蛍光スペクトル k の増加に伴う蛍光強度の増加を示す. 挿入図は k に対する積分蛍光強度値を再 プロットしたグラフを示す.

更に,緩衝液中のQDの分散性を向上させるために,水に対して非常に溶解性の高いt-ブタノールを緩衝液に予め添加し, QD 母液混合時に超音波を印加しながら作製した分散溶液に,PFDをk=25で添加した.この分散試料溶液を2700G-5分間遠心沈降させた上澄み液のQD発光スペクトルを測定した結果,約20%以上の蛍光強度が良好に保持された(図4).



度の遠心効果 (a) t-ブタノール予備添加, (b) n-ブタノール予備添加

t-ブタノールでなく n-ブタノール予備添 加では,2700G-5 分遠心後は蛍光を殆ど検 出できない. ブタノールのアルキル鎖の 形状の差が QD の凝集・分散性に影響を 与えていると考えられる.

2) 1 分子顕微画像計測結果

石英基板上に形成させた QD と Cy5 ラベ ル化 PFD の顕微画像計測用試料を,2つ のレーザー波長でのエバネッセントと光 照射励起により1分子顕微画像計測した [5]. 図 5 (a)は $\lambda_{ex} = 532$ nm での QD の画像, (c)は $\lambda_{ex} = 633$ nm での PFD(Cy5)の画像を 示す.(b),(d)はそれぞれの拡大画像であ りそれぞれの中心蛍光スポットが分解能 限界内で同位置に観察され,QD-PFD 複 合体の形成が示唆された.この図 5 の(b), (d)の2D-gaussian fitting から得られたQD と PFD(Cy5)のスポットプロファイルから スポット間の距離: 19.5nm ± 25.5nm の値が得られた.複合体を形成させる試 料作製条件を検討し,複合体の信号とし て計測可能な顕微画像の蛍光スポット数 を増加させて,更なる詳細な位置情報を 得て QD と PFD の相互作用の基礎的な情 報を得る予定である.



- 図 5.1 分子顕微画像と 2D-Gaussian fitting プロファイル
- (a):λex = 532nm の QD 蛍光スポット

(c):λex = 633nmのPFD (Cy5)蛍光スポット

- (b), (d):それぞれの拡大像と 2D-Gaussian fitting プロファイル
- 等高線は(b)では 100 カウントの強度間隔, (d)では 500 カウントの強度間隔を示す.

フィッティング中心(ピクセル単位); (b)では、 $X_0 = 273.0$, $Y_0 = 113.4$ HWe⁻¹M_x = 1.454 HWe⁻¹M_y = 1.340 (d)では、 $X_0 = 272.9$, $Y_0 = 113.6$ HWe⁻¹M_x = 1.189 HWe⁻¹M_y = 1.217 <u>4. まとめ</u>

QD ブタノール溶液を緩衝液に分散さ せるときに t-ブタノールを予め添加する 効果的な分散方法等を述べてきた.これ らの生化学的な実験過程を通常の蛍光測 定で評価をしてきたが,1分子顕微画像計 測により QD と PFD の複合体の形成の初 期段階を観測できた.今後更に複合体形 成メカニズムの解析を行っていく予定で ある.

<u>5. 謝辞</u>

本研究は農工大 21 世紀 COE"ナノ未来 材料",の支援の下で行われたことに深く 謝意を表する.

参考文献

- D. Ishii, K. Kinbara, Y. Ishida, N. Ishii, M. Yohda, T. Aida, *Nature*, **423** (2003) 628.
- [2] C.B. Murray, D.J. Norris, M.G. Bawendi, J. Am. Chem. Soc., 115 (1993) 8706.
- [3] X. Peng, E. Troy, A, Wilson, P. Alivisatos, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 36 (1997) 45.
- [4] M. Okochi, T. Nomura, T. Zako, T. Arakawa, R. Iizuka, H. Ueda, T. Funatsu, M. Leroux, M. Yohda, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 31788.
- [5] e.g. T. D. X. Michalet, F. Pinaud, D. S. Chemla, A. Paul Alivisatos, S. Weiss, *PNAS*, 97, **17** (2000) 9461.