

単一顕微画像計測による量子ドット-分子シャペロン複合体の相互作用の検出

酒井 宏、臼倉 英治、伊藤 禎宣、小田 勝*、谷 俊朗*

東京農工大学大学院 工学府 物理システム工学専攻 *共生科学技術研究院
〒184-8588 東京都小金井市中町2-24-16

Search for novel intermolecular interactions in the complex formation of semiconductor quantum dots vs. molecular chaperons by single molecule imaging

H.Sakai, E.Usukura, Y.Itoh, M.Oda*, and T.Tani*

Department of Applied Physics, *Institute of Symbiotic Science and Technology,
Tokyo University of Agriculture and Technology
Naka-cho 2-24-16, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

Prefoldin (PFD) is one of molecular chaperon that captures denatured proteins which have hydrophobic property and transfers it to another molecular chaperon. In this work, we use hydrophobic CdSe quantum dots (QDs) instead of denatured proteins with hydrophobic surface. We expect that PFD would also capture QD and form hybrid conjugated system. We will show photophysical properties of the conjugates based on the results by single molecule imaging and will discuss the novel interactions PFD and QD.

1. 背景・目的

我々は1分子イメージングの手法による分子発光画像から位置情報だけでなく分子自体と周辺の局所環境情報を含めた精密光物理計測を目指し、これまで石英基板に化学結合させた有機色素分子の発光強度や発光の100ms毎の時間変化などを測定してきた。本研究ではナノサイズの発光体である量子ドット(以下:QD, 図1 (a))とタンパク分子へと対象を拡大し、本研究で作製しているCdSe/ZnS/TOPO系QDと分子シャペロンの複合体の発光強度や発光の時間変化について考察する。

生体内に存在するタンパク分子の一

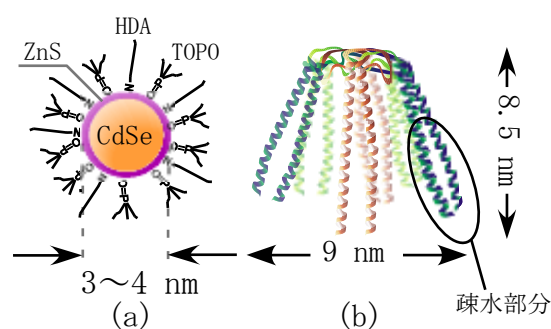


図1 (a) CdSe/ZnS/TOPO系量子ドット
(配位溶媒: TOPO, HDA)
(b) プレフォルディン (PFD)

種であるプレフォルディン(以下:PFD, 図1 (b))は生体内で熱などのストレスを受けて変性し疎水基が露出して機能を失ったタンパク分子を捕獲する。さらに、修復機能を持つ別のタンパク分

子まで運搬し受け渡す機能を持つとされている。QDのサイズは3 nm程度と生体分子サイズで、その表面が疎水性である。この特性を利用しQDを変性したタンパク分子に見立ててPFDに捕獲させ、複合体を形成した場合とそうでない場合のQDの発光特性を考察することにより分子シャペロンの機能解明を目指す。

2. 試料作製

分子シャペロン(PFD)は中性の水溶液中で活性を持つため、緩衝溶液(Hepes-KCl pH7.5)でPFDを希釈しQDとの混合溶液を用意した。これを石英基板上に滴下しカバーガラスを用いて封入した試料を作製した。緩衝溶液によってPFDを濃度~10数nM程度に調整したものを使用するが、QDは表面が疎水性のため、混合すると緩衝溶液中でPFDに捕獲される前に凝集してしまい、目標とする複合体が形成されない。そのため、QDはブタノールに分散させ、濃度を数nM程度に調整したものを混合した。これはブタノールがQD表面を覆いミセル状となるので一時的に表面が親水性になると考えられ、緩衝溶液中で分散した状態でPFDとの複合体を形成させることが期待できるからである。PFDとQDの混合溶液10 μ lを石英基板上に滴下し、カバーガラスで覆い、その周囲をマニキュア(主成分：ニトロセルロース)によって囲んで混合溶液を石英基板とカバーガラスによって封入した。

3. 測定光学系

図2に示すように光学系は光源、倒立顕微鏡TE-2000U、2次元CCDカメラC

ascade512Fを組み合わせ構築した。光源は532nmの半導体励起固体レーザーと633nmのHe-Neレーザーを使用する。QDとPFDのラベル剤であるCy5の吸収波長はそれぞれおよそ図3上示す通りなので励起光を変えることにより、それぞれの蛍光を観測することができる。光源からの光をミラー、集光レンズやプリズムを介し石英基板と混合溶液の界面で全反射さ

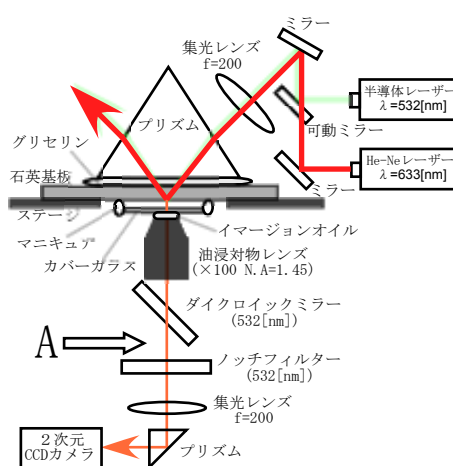


図2 測定光学系
可動ミラーにより励起波長を選択できる。

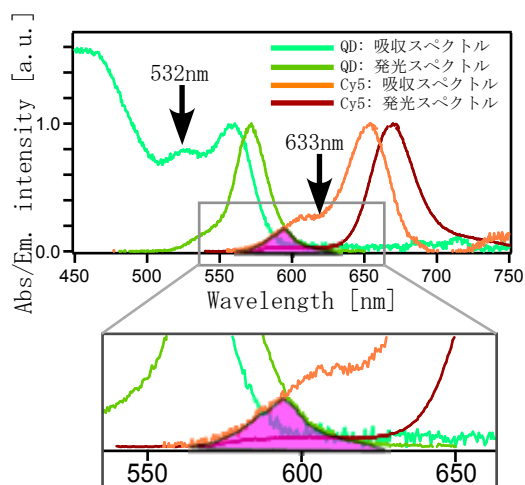


図3 上：QDとCy5の吸収と蛍光スペクトル
下：QDの蛍光スペクトルとPFD(Cy5)の吸収スペクトルの重なり

せ(図4)、その界面近傍にエバネッセント光を発生させる。エバネッセント光を発生させることによって基板表面に吸着しているPFDのラベル剤であるCy5やQDのみを励起させることができる(図4)。Cy5やQDからの蛍光は、油浸対物レンズ(N.A=1.45, $\times 100$, 532nmと633nmにおける分解能はそれぞれ224nm, 266nm)で集光し2種類の光源の励起光をカットするノッチフィルターや結像レンズを通過しCCDカメラの受光面で結像させ、2次元の発光画像として検出する。この方法によってCy5やQD個々からの微弱光をリアルタイムで観測することが可能となる。

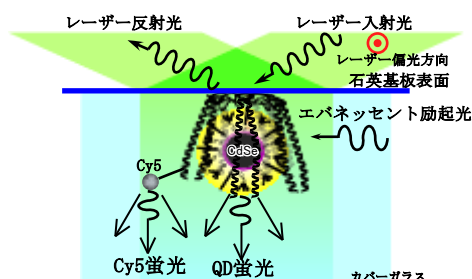


図4 QDとPFD混合溶液試料基板界面
石英基板表面に吸着しているPFDやQD
のみを光励起させている。

4. 結果・考察

これらの計測により得られた発光画像から発光点(以下:輝点)を選び出す。輝点選出は発光の振る舞いに関して解析・評価するために組んだ独自のプログラムによって行った。図5に示すように選出した輝点は単一分子系で特有に観測される発光の明滅現象が確認できることから1分子からの発光を捉えていると考える。選出したQDの輝点からさらに複合体を形成していると思われるものと、そうでないものを選出した。

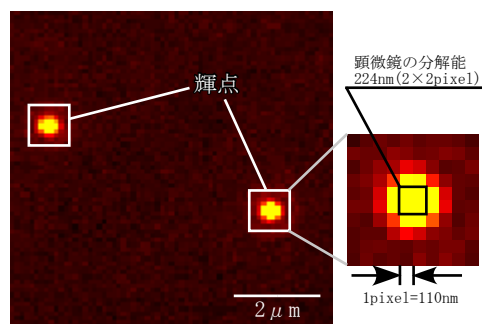


図5 測定画像の選出された輝点
試料を532nmレーザーで励起して得られる
QDの発光画像、露光時間100msで測定。

図6 (a)にはQDが単独で存在している輝点についての発光強度の時間変化を示した。このデータから、17sを境とした明確な明滅をしていることが確認できる。図6 (b)には複合体を形成している場合のQDの発光強度の時間変化を示した。(a)に比べると、明滅現象は確認することができず、発光強度が減少し揺らんでいることが確認できる。

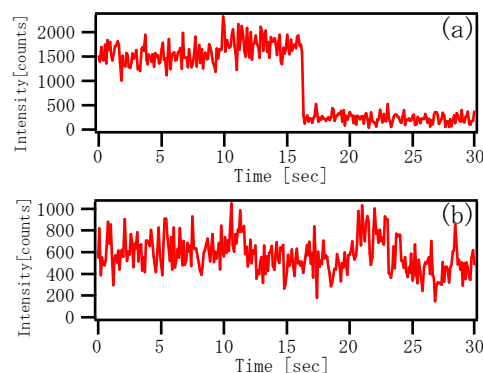


図6 QDの発光強度の時間変化
(a)QDが単独で存在している場合
(b)QDとPFDが複合体で存在している場合

このような現象の要因のひとつに、QDをドナー、Cy5をアクセプターとした蛍光共鳴エネルギー移動(以下:FRET)が起こっている可能性が考えられる。FRETの発生条件であるドナーとアクセプターそれぞれの蛍光と吸収スペクト

ルに重なりがあること(図3下)やドナーとアクセプター間の距離(<10nm)を満たしている。また、発光強度が揺らいでいることの要因のひとつとしてPFDに捕獲されたQDがPFDや溶媒分子から何らかの影響を受けて動いているのではないかと考えられる。これを検証するために、QDの遷移双極子と結晶軸には対応があるので、QDの遷移双極子の動きを捉えることができればQD自体の動きも捉えられると考え、光学系の検出側(図2のA)にモーターによって回転させた偏光子を組み込み、QDとPFDの混合溶液試料の発光画像の解析を行っている。現段階では、単独で存在するQDについてはその発光画像から遷移双極子の動きを捉えることができていると思われる(図7)。

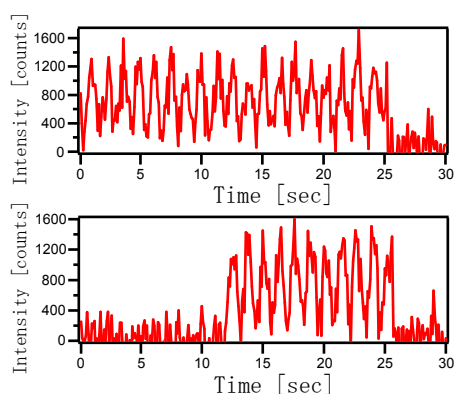


図7 光学系(検出側)に回転偏光子を組み込んだ場合のQDの発光強度の時間変化(PFDとQDの混合溶液中)

5. まとめ・展望

PFD活性を持つ水溶液中において、QDを一時的に分散させることにより混合溶液中でPFDとQDの複合体を形成させることができると仮定し、その混合溶液を石英基板上に封入した試料をエバネッセント光で光励起することで得られる微弱な発光を捉え解析した。そ

の結果、複合体を形成していると思われるQDの輝点とそうでないQDの輝点から得られる発光強度の時間変化に明らかな違いがあった。発光強度の違いからFRETの可能性を、発光強度が時間経過と共に揺らいでいることから捕獲されたQDが動いている可能性をそれぞれ考えた。現在、FRETの可能性については、封入試料を532nmレーザーで励起し光学系の検出側にQDの蛍光をカットしCy5の蛍光は透過する光学フィルターを挿入することで発光しないであろうCy5から得られる発光画像から検証できるのではないかと考えている。PFDに捕獲されたQDが動いている可能性については、光学系の検出側にモーターによって回転させた偏光子を挿入し、そこから得られる発光画像を解析することでQDの遷移双極子の向きを検出しQDの動きを捉えられると考え、実験を進めている。現段階では単独のQDについては遷移双極子の向きを捉えているような発光画像が得られたが、複合体を形成しているQDについては発光強度が弱く、かつ時間変化と共に揺らぐため解析が困難であるので、遷移双極子の動きを捉えるまで至っていない。これら2つの可能性において更なる検証を進め、分子シャペロンの機能解明を行う予定である。

参考文献

- [1] Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd ed. ;Kluwer Academic: New York, 1999.
- [2] S. A. Empedocles, R. Neuhauser and M. G. Bawendi, Nature, 399(1999) 126.
- [3] C. B. Murray, D. J. Norris, and M. G. Bawendi, J. Am. Chem. Soc., 115, 1993, 8706-8715