## CdSe 系量子ドットー色素ラベル化分子シャペロン複合系の 1分子顕微計測

<u>酒井 宏</u>、荒木大輔、 臼倉英治、 伊藤禎宣、 小田 勝<sup>A</sup>、 谷 俊朗<sup>A</sup> 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<sup>A</sup> 〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16

# Single molecule measurements of the hybrid conjugates of CdSe quantum dots vs. Cy5-labelled molecular chaperones

H. Sakai, D. Araki, E. Usukura, Y. Itoh, M. Oda<sup>A</sup>, T. Tani<sup>A</sup> Department of Applied Physics, <sup>A</sup>Institute of Symbiotic Science and Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology Naka-cho 2-24-16, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

In this work, we use CdSe/ZnS/TOPO nanocrystals (quantum dots: QDs) with hydrophobic surface. Prefoldin (PFD) is one of the molecular chaperones that captures denatured proteins, which have hydrophobic property, in their central cavity and transfers it to another molecular chaperone for repairing. We have confirmed that PFD can also capture QD, and form their hybrid conjugates. We present the results of single molecule imaging, single molecule FRET measurement and polarization rotating modulation microscopy on single QDs and PFD-QD hybrid conjugates, and discuss the observed difference of photoluminescence properties between the QDs in their isolated and conjugated states.

#### <u>1. はじめに</u>

蛋白質分子は生きた細胞の中で動作している。特 に分子シャペロンとよばれる一群の蛋白質分子は、 変性蛋白質の"修復"とそれに伴う"捕捉"や"輸送"と 呼ばれる機能を担っている。我々は、自ら作製した半 導体量子ドット(以下:QD、図1(a))と蛋白質分子間の ミクロな相互作用を単一分子レベルで計測することで、 蛋白質分子の動作状態をリアルタイムで観測し、その 動作状態(捕捉、輸送)を詳細に解明することを目指 している。本研究では、蛋白質分子の一種である分子 シャペロンの持つ捕捉機能を利用した分子シャペロン とQDの複合体の形成を試みている。

今回用いる分子シャペロンはプレフォルディン(以下:PFD、図1(b))と呼ばれるものを使用する。PFDは 触手状のコイルドコイル構造をとっており、触手部の



先端及び内側に疎水基を持っている[1]。その機能は、 変性して疎水基を露出した蛋白質分子を捕捉し、正

常な分子へと修復する機能を持つ別の分子へと輸送 する。QDの特徴としては①:高い量子効率、②:光耐 性が高い、③:表面効果が高く、雰囲気依存性がある といったことが主に挙げられる。また、その表面には 有機配位子(Trioctylphosphine-Oxide:TOPO、 Hexadecylamine:HDA) があり疎水性である。QDのサ イズは有機配位子を含め 6 nm 程度でPFDに内包さ れ得る。これらの特徴を生かし、QDを変性した蛋白 質分子に見立ててPFDに捕捉させ、QD-PFD複合体 形成を試みた。QDは複合体を形成するとその表面状 態が変化するため、発光特性が複合体を形成してい ないQDのときと異なってくることがわかってきた[2]。 今回、直接的にQD-PFD複合体形成を実証するため に、QD-PFD間の蛍光共鳴エネルギー移動(以下:F RET)の検出を行い、エネルギー移動検出したので報 告する。

#### <u>2. 試料作製</u>

PFDは中性の水溶液中でのみ活性を持つため、pH の変化を抑制する緩衝溶液でPFDとQDとの混合溶 液を用意した。

QDは表面が疎水性のため、そのまま混合すると緩 衝溶液中でPFDに捕捉される前にQD同士で凝集し てしまい、目標とする複合体が形成されない。そのた め、PFDを含む緩衝溶液中に数パーセントの割合で t-ブタノールを混合させたものを用意し、そこに n-ブタ ノールに分散させたQD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 が親水性に保たれると考えられ、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。QDとPFDの最終的な濃度は~数 nM とした。

QD-PFD混合溶液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。なお、PFDは別途シア ニン系色素の"Cy5"でラベルしたものを用いた。

#### <u>3. 測定光学系</u>

図2に示すように光学系は光源、倒立型顕微鏡 (TE-2000U)、2次元CCDカメラ(Cascade512B)、分光



#### 図3 石英基板界面近傍

カバーガラス

器(Spectra Pro-300i)を組み合わせて構築した。

作製した試料はカバーガラスを下にした状態でステ ージに置き、グリセリンを介してプリズムで押さえつけ て固定した。励起光源は波長が 532 nm の半導体励 起固体レーザーと波長が 633 nm の He-Ne レーザー を使用する。これらのレーザーはQDと、PFDにラベ ル化した Cy5を選択的に励起できる。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QD-PFD混合溶液の界面で全反射させ、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 せることにより基板表面に吸着しているQDやPFDに ラベルした Cy5 のみを励起させることができる(図3)。 得られた発光は対物レンズで採光し、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、1分子発 光画像計測を行う2次元CCDカメラまたは、1分子ス ペクトル計測を行う分光器に取り込まれる。

1分子発光画像計測ではQDや Cy5 からの微弱な 発光をリアルタイムで観測し、輝点が複数個存在する 領域を見て、輝点の発光強度の時間変化をみること が可能で、複合体を形成している輝点とそうでない輝 点とを区別することができる。1分子スペクトル計測で は一つの輝点からの発光をファイバー端面に結像さ せて分光器で取り込むことが可能で、複合体と思われ る輝点の発光スペクトルを観測することでQDをドナー、 Cy5をアクセプターとしたFRETを検出することが期待 できる。

#### 4. 結果·考察

図4は、QDの発光強度の時間変化を求めたものを 示している。 図4(a)は、532 nm 励起で得られた発光画 像と、633 nm 励起で得られた発光画像で場所が一致 していない輝点(QDが単独で存在していると思われ る輝点)に対する発光強度の時間変化を示している。 一致している輝点(QDとPFDが複合体を形成してい ると思われる輝点)に対するものを図4(b)に示した。 図4(a)からはQDの発光が 14 s を境として、突然無く なったことがわかる。これは単一分子系で特有に観測 される発光の明滅現象(連続的に光励起しているにも かかわらず、発光状態と非発光状態を不規則に繰り 返す現象)であることから、1分子からの発光を捉えて いると考えられる。図4(b)は(a)と比べると、発光の明 滅現象が確認されず、発光強度については減少して いることが確認できた。また、統計的に見て発光強度 が時間変化と共に揺らいでいることも確認できた。

明滅現象の消失の原因は、QDとPFDが複合体を 形成したことによって、QDの表面状態が変化したた めだと考えられる。発光強度の減少と、発光の揺らぎ に関しては今のところ原因が特定できていない。これ らの原因の追究とQDとPFDの複合体形成の詳細な 光物性の確認のため、1分子スペクトル計測によるQ Dをドナー、Cy5 をアクセプターとした蛍光共鳴エネル



図4 QDの発光強度の時間変化

- (a) QDが単独で存在している
- (b) QDがPFDと複合体を形成している

ギー移動(以下:FRET)の検証を行った。

FRETが生じる上で重要な要素であるドナーの発 光とアクセプターの吸収スペクトルの重なり[3]を大きく するために、QDの発光スペクトルと Cy5 の吸収スペ クトルの重なりがより大きなQDを新たに作製し、計測 に臨んだ。図5にそのスペクトルを示す。

図6は、QD-PFD混合溶液を532 nmの光で励起し、 その発光を分光器で取り込んだときに得られたスペク トルである。AとBはそれぞれ、フィルターでカットしき れなかった励起光(532 nm)の残光と、基板である石 英のラマン散乱である。図6(a)は532 nmの光では直 接励起することができない Cy5 のスペクトルが確認で きたことを示す。図6(b)は532 nmの光で励起可能な QDの発光と、励起できない Cy5の発光の両方を確認 することができたことを示す。これよりQDから Cy5 へ のエネルギー移動が確認できたと考えられ、QDとPF Dが近接(2~9 nm)していると言える。QD-PFDの複 合体形成が実証できたと思われる。



発光強度の減少については今のところ原因は解明 できていない。一方、発光強度の揺らぎに関してはPF Dに捕捉されたQDがPFDや溶媒分子から力学的な 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、まずはQDの動きを捉えるた めの実験を行った。QDの持つ遷移双極子の方向と 結晶軸には対応があり、QDの遷移双極子は c 軸方 向に垂直な向きに二次元に縮退していることがわかっ ているので[4]、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 系の検出部(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の遷移双極子の向きの特定 を試みた。現段階では、緩衝溶液中と空気中のQDに 対して実験を行い、雰囲気の違いによって基板に吸 着しているQDの動きや向きがどのように変化するか まで、を検証している。図7は空気中と緩衝溶液中で 実験を行った場合の結果を示している。測定において、 ランダムな方向で基板に吸着しているQDの二次元双 極子からの発光は偏光子の面に投影され、その面が モーターによって回転しているため発光強度の時間 変化が0まで落ちることが少ないと予想される。図7の 結果を見ると発光強度が0まで落ちていないことから、 QDの遷移双極子を捉えていることがわかる。図7を 三角関数でフィティングし、その平均値と振幅に着目 して解析を行ったところ、石英基盤に吸着したQDの 向きがある程度特定されることがわかってきた。



図7 光学系に回転偏光子を組み込んだときのQDの発光強度の時間変化上:空気中、下:緩衝溶液中

### <u>5. まとめ</u>

本研究では、PFDが活性を持つ緩衝溶液中におい 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 作製し、エバネッセント光で光励起することで得られる 微弱光を捉え解析した。その結果、発光画像計測で は複合体を形成しているQDと、単独で存在している QDの発光強度の時間変化に明らかな違いが3つあ った。①:明滅現象の消失、②発光の揺らぎ、③:発光 強度の減少。①に関してはQDとPFDが複合体を形 成したことによってQDの表面状態が変化したと考え られる。②と③ついては原因が特定できないので、こ れらの原因を探りかつQDとPFDの複合体形成の詳 細な確認も含め、1分子スペクトル計測を行った。そ の結果、QDをドナー、Cy5をアクセプターとしたFRET を観測することができた。②についてはQDと Cy5 の 発光遷移双極子の方向が原因ではないかと考え、光 学系に回転偏光子を組み込んで、QDの動きを捉える 実験を行った。実験結果について解析を行った結果、 石英基板に吸着したQDの向きがある程度特定され ることがわかってきた。③については今のところ解明 できていない。

#### 参考文献

- [1] Victor F.Ludin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 101 (2004) 4367
- [2] 酒井他, 第19回光物性研究会論文集,(2008) 270.
- [3] Joseph R.Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2<sup>nd</sup> ed.; Kluwer Academic: NewYork,(1999) 367.
- [4] I. Chung, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 100 (2003) 405.