OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	エバネッセント場照明による1分子偏光測定
Author(s)	齋藤, 究
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3129357
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【 42 】

氏名	齋藤 究（さいとう きわむ）
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	第 13343 号
学位授与年月日	平成 9 年 6 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	**エバネッセント場照明による 1 分子偏光測定** (Polarization measurement of single fluorophores with evanescent field)
論文審査委員	(主査) 教授 柳田 敏雄 (副査) 教授 葛西 道生　教授 佐藤 俊輔

論文内容の要旨

タンパク質分子の動作原理を解明するためにはその構造変化を 1 分子のレベルで検出することが重要である。タンパク質の活性を保ったまま構造変化を測定するにはタンパク質を蛍光色素で特異的に標識し，色素が放出する蛍光シグナルを測定する方法が有効である。本研究では蛍光色素の偏光度からタンパク質の構造変化を検出することを試みた。そのために，蛍光色素 1 分子を水中で実時間観察する顕微鏡を組み立て，これを使ってモータータンパク質ミオシンに結合したテトラメチルローダミン（TMR）の励起ダイポールの偏光度を 1 分子レベルで測定した。

本研究では存在するタンパク質分子が 1 分子であることを確認する必要があるので，水溶液中で蛍光色素 1 分子を可視化できるように対物レンズ型エバネッセント場照明を改良した。その結果，蛍光色素の TMR と Cy3 を 1 分子レベルで可視化することが可能になった。蛍光シグナルと背景光の比は約12であった。従来から使用されてきたプリズム型エバネッセント場照明と同様に 1 分子観察に十分な特性を備え，なおかつ，サンプルの操作性が向上し，他の装置と組み合わせることも容易になった。

また，タンパク質分子は他の分子と相互作用することによってその機能を発現するので，二つの分子を同時に観察する必要がある。そのために二重標識された試料を簡単な光学系で観察する方法を開発した。この方法は波長532 nm のレーザを励起光とし，BODIPY FL のアンチストークス蛍光と TMR または Cy3 のストークス蛍光を観察する方法である。この観察法と対物レンズ型エバネッセント場照明法を組み合わせることにより BODIPY FL で標識した 1 本のアクチンフィラメントと TMR で標識した 1 個のミオシン S1 を同時に可視化することができた。また，Cy3 で標識した蛍光性 An アナログ (Cy3-ATP) を使うことによりアクトミオシン運動再構成系で，ミオシン 1 分子による ATP 加水分解反応と BODIPY FL で標識したアクチンフィラメントの滑り運動を同時に可視化することができた。

以上の 1 分子観察技術と同時観察法を使用し，蛍光色素 1 分子の励起ダイポールの偏光度を測定できる顕微鏡を構築した。この顕微鏡でミオシン S1 に結合した TMR の偏光度を測定した結果，S1 の構造はサブ秒から数秒の時間範囲で揺らいでいることが 1 分子レベルで測定できた。S1 の SH1 に結合した TMR は S1 に固く結合しているが軽鎖に結合した TMR は大きく揺らいでいた。S1 に対するアクチンフィラメントの結合は S1 軽鎖部分のゆらぎに影響を与え

ていた。

本研究では対物レンズ型エバネッセント場照明による蛍光色素1分子水中実時間観察法とアンチストークス蛍光観察を使った2波長同時観察法，1分子偏光測定法を開発した。これらの新技術を使ってCy3-ATPアナログによる1分子酵素反応とそれに共役する力学反応の同時可視化を実現した。さらに，蛍光色素1分子の偏光状態からタンパク質分子の構造変化を1分子レベルで直接計測することができた。ここで開発した技術を組み合わせることにより，化学力学反応の同時可視化や二つのタンパク質の相互作用の可視化，化学反応と構造変化の同時検出などが1分子レベルで可能になる。これらの技術はタンパク質の機能解明の有効な手段となるであろう。

論文審査の結果の要旨

論文は，水溶液中でタンパク質分子の構造変化を1分子レベルで測定する技術について述べたものである。

論文の前半では新たに開発した二つの蛍光観察法を記述している。第一の蛍光色素水中1分子観察法は従来からある対物レンズ型エバネッセント場照明法に改良を加え，蛍光照明の背景光を減少させたものである。その結果，蛍光色素1分子を水中で実時間観察する事を可能にした。この観察法は，今まで蛍光色素1分子観察に使用されてきた落射蛍光照明法やプリズム型エバネッセント場照明法に比べ光学系が非常に簡単なこと，簡単な手順で1分子観察を可能にしたこと，そしてAFMを初めとする他の計測装置を組み合わせることが可能なことで非常に優れたものである。第二に開発した手法はアンチストークス蛍光観察法である。従来の蛍光顕微鏡は励起光よりも波長の長い蛍光を観察しているが，この方法は励起光よりも波長の短い蛍光を観察する全く新しい発想の方法である。この方法により二重標識した蛍光試料を簡単な方法で同時観察することが可能になった。以上新しい二つの観察方法をアクトミオシン運動再構成系に応用し，ミオシン分子による1分子ATP加水分解反応とそれとともに起こるアクチンフィラメント滑り運動の同時可視化に成功した。この1分子化学反応と力学反応の同時可視化は他の様々なタンパク質の研究に応用できる手法である。

論文の後半では蛍光色素1分子の偏光度からタンパク質分子の構造変化を測定する方法について記述している。対物レンズ型エバネッセント場照明を使って二つのエバネッセント場を形成，蛍光色素1分子を励起し，放出された蛍光をフォトンカウントすることにより蛍光色素1分子の励起偏光度を計測する。この測定方法によりミオシンS1に結合したローダミン分子の偏光度を測定し，S1の軽鎖部分が揺らいでいること，そのゆらぎがアクチンフィラメントの結合によって減少することを1分子のレベルで測定した。

近年，生物学の研究ではタンパク質の物理化学的測定を1分子レベルで測定する技術が急速に進歩している。1995年に論文提出者を共著者として水溶液中での蛍光色素1分子実時間イメージングの手法が発表されてからは，1分子を直接観察しながら計測を行ったという研究が数多く報告されるようになった。本研究で新たに開発した蛍光観察技術と1分子偏光測定技術は1分子計測における従来にない技術であると共に汎用的なものであり，タンパク質の動作原理の解明のために，今後，多くの研究者が使用していくに違いない。特に，アンチストークス蛍光を使った多色蛍光顕微鏡法の開発は，長い蛍光顕微鏡の歴史の中でも全く初めてという独創的な研究である。国際的にも高く評価された技術であり，一連の研究をまとめた本論文は博士論文として価値のあるものと認める。