

国田美穂子^{1,2}, 櫻沢繁¹¹公立はこだて未来大学大学院システム情報科学研究科, ²JSPS 特別研究員

(〒041-8655 北海道函館市亀田中野町 116-2)

[緒言]

タンパク質分子の運動を解析することは、運動性タンパク質の運動メカニズムを解明するための有効な手段である。これまで、蛍光顕微鏡を用いたタンパク質分子の運動観察から、2次元平面上でのタンパク質分子の運動が解析されてきた。その一方で、タンパク質分子の運動をより詳細に調べるために、共焦点レーザー顕微鏡や高速原子間力顕微鏡などを用いたタンパク質分子の3次元空間内での運動観察が多く試みられている。その一つとして、我々は、エバネッセント場顕微鏡を用いてタンパク質分子の運動の3次元位置座標を解析することを試みた。

[実験]

エバネッセント場の理論にしたがうと、屈折面からのタンパク質分子の高さは、蛍光分子の蛍光強度・相対屈折率・光の入射角・光の波長・屈折面での蛍光分子の輝度に依存する。そこで、蛍光強度を除くパラメータを固定パラメータとして設定し、蛍光分子の蛍光強度から高さを推定した。

はじめに、スライドガラスの屈折率と水の屈折率から相対屈折率を求め、レーザー光を用いることで光の波長を固定した。タンパク質分子は、ウサギ骨格筋から抽出・精製したアクチンとミオシンを用いた。蛍光標識したアクチン繊維をスライドガラス上に吸着させ、エバネッセント場においてアクチン繊維を観察・記録した。記録された画像を解析して、ガラス面でのアクチン繊維の蛍光強度を測定した。さらに、エバネッセント場において、白金線に吸着したアクチン繊維を観察・記録した。記録された画像を解析して、白金線の曲率とアクチン繊維の輝度の関係からレーザー光の入射角を推定した。

次に、スライドガラス上にミオシン分子を結合させた後、まだら状に蛍光標識したアクチン繊維と ATP を加えてエバネッセント場でアクチン繊維の滑り運動を観察・記録した。記録された画像を解析して、蛍光標識されたアクチン繊維の2次元平面上での軌跡と蛍光強度とを取得した。エバネッセント場の理論を用いて、蛍光強度からアクチン繊維の高さを推定した。

[結果・考察]

白金線に吸着させたアクチン繊維の蛍光強度は、理論値と類似の減衰曲線を示した。これは、エバネッセント場の理論がタンパク質分子の測定系に対しても適用可能であることを示す。この測定系で得られたアクチン繊維の滑り運動を解析した結果、アクチン繊維が高さ方向の変位を持って運動していることが示された。