

○ 國田美穂子<sup>1,2</sup>, 櫻沢繁<sup>1</sup><sup>1</sup>公立はこだて未来大学大学院システム情報科学研究科, <sup>2</sup>JSPS 特別研究員

(〒041-8655 北海道函館市亀田中野町 116-2)

**[緒言]**

運動性タンパク質の位置情報を取得することは、運動性タンパク質と他の分子との相互作用から運動メカニズムを明らかにするために有効である。その方法の一つである蛍光顕微鏡を用いた方法では、蛍光標識したタンパク質分子の顕微鏡画像から 2 次元平面上でのタンパク質分子の位置情報を得ることが可能となる。また、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方法では、3 次元空間内でのタンパク質分子の位置情報を得ることが可能となる。これらの方法では、時間分解能や空間分解能の制約が大きいので、我々はエバネッセント場顕微鏡を用いた位置情報の取得を行った。これは、蛍光分子の輝度が光の全反射面からの距離に依存することを利用して、蛍光顕微鏡を用いた方法を 3 次元空間に拡張する方法である。

**[実験]**

光をガラス面に全反射させると、光の入射面とは反対側の面にエバネッセント場が発生する。このエバネッセント場での蛍光分子のガラス面からの距離は、理論的に、相対屈折率・光の入射角・光の波長・蛍光分子の輝度、ガラス面での蛍光分子の輝度に依存する。ここで、既にその値が固定されている相対屈折率と光の波長とを除くパラメータを測定系が理論式に従うものとして測定から推定した。

実験には、ウサギ骨格筋から抽出・精製したアクチンとミオシンとを用いた。アクチンを重合・蛍光標識した蛍光標識アクチン繊維を準備した。まず、蛍光標識アクチン繊維をガラス面上に固定したときの顕微鏡画像から、全反射面での蛍光分子の輝度を計測した。次に、蛍光標識アクチン繊維を白金線に固定したときの顕微鏡画像から得られたアクチン繊維の輝度と位置との関係に基づいて、光の入射角を推定した。顕微鏡画像の解析には、WIN32API を使用して C 言語で作成したプログラムを使用した。

**[結果・考察]**

白金線に固定された蛍光標識アクチン繊維の輝度は、理論式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蛍光分子だけでなく蛍光標識されたタンパク質分子集合体に対しても適用可能であることを示す。そのため、この測定データに基づいて光の入射角を推定し、蛍光標識アクチン繊維のガラス面からの距離を推定する計算式を決定した。

この方法を用いて、ガラス面に固定したミオシン分子上を運動するアクチン繊維を観察した。その結果、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。また、アクチン繊維の高さの分布から求めた標準偏差は、ミオシン分子と同程度の位置にあるときのほうがミオシン分子よりも高い位置にあるときに比べて小さかった。これは、アクチン繊維がミオシンの作用によって位置変化を制約された結果であり、測定の妥当性を示す。