

2013年3月

## STMを用いた蛍光タンパク質のナノスケール観察と発光分光

物質系専攻 47-116035 仲村 裕也

指導教員：川合 眞紀(教授)

キーワード：STM、STM 発光、蛍光タンパク質、ナノスケール観察

### 【研究背景】

緑色蛍光タンパク質に代表される蛍光タンパク質の発見と応用は生物学に大きな影響を与えた。蛍光標識化や蛍光共鳴エネルギー移動による生きた細胞内の物質移動・反応・相互作用などのリアルタイム観測は現在では必須の技術となっている。これらの技術では光を励起源として蛍光の観測を行うが、測定技術の発展に伴い空間分解能は数 10 nm 程度まで向上している。

一方、走査型トンネル顕微鏡(Scanning Tunneling Microscope, STM)はナノスケールの優れた空間分解能を持つ顕微鏡である。また顕微鏡としての機能だけでなくトンネル電子を注入することで試料の発光を励起する STM 発光が可能である。生きた細胞内の観測はできないものの、基板上に固定化された導電性試料ならば光励起の顕微鏡観察では到底不可能な高空間分解能で観察・発光励起することができる。

そこで蛍光タンパク質の蛍光励起・観測に STM を用いることで、生体内での蛍光タンパク質の働きがより詳細に分かるのではないかと考えた。例えばナノスケールでの周囲環境が蛍光に及ぼす影響や、蛍光共鳴エネルギー移動の分子間距離の依存性などは STM 発光を用いて調べることができると考えられる。

当研究室では以前 STM を用いて室温・大気圧下で蛍光タンパク質にトンネル電流を注入し蛍光を励起することに成功した。しかし発光測定中の測定環境の不安定化のため表面構造観測を行うことができず、ナノスケールの空間分解能観測という顕微鏡としての長所を活用できなかった。本研究ではこの問題を解決し、蛍光タンパク質の発光測定と表面構造観測を同時に行うことを目標に実験を行った。

### 【実験方法】

図 1 に示す様に蛍光タンパク質を基板上に吸着させて固定化し、その上から探針を近づけて STM 表面観測または発光励起を行った。また発光測定中のトンネルギャップの安定化のため絶縁性の高く極性の小さい有機溶媒(1-フェニルオクタン)で表面を覆った。

基板には金と銀を用いた。金は他の金属基板に比べて大気中で非常に安定であるため、安定な発光測定のためには銀ではなく金を用いることが必須である。しかし STM 発光によって励起できる蛍光タンパク質のエネルギー領域が金基板で狭く銀基板では広い、これまでの研究では銀基板を用いた場合のみ蛍光が観測されていた。そこで金基板でも励起可能な励起エネルギーを持つ新たな蛍光タンパクと組み合わせることで発光励起できることを狙った。蛍光タンパク質は赤色蛍光タンパク質(Red Fluorescent Protein, RFP)と近赤外 RFP(near infra-RFP, iRFP) [1]を用いた。

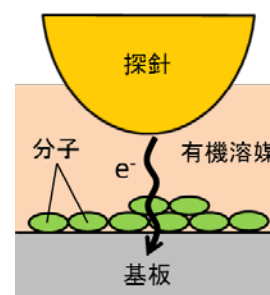


図 1 有機溶媒中での STM 測定の模式図

STM によって励起された試料の発光はレンズを用いて集光し分光器に導入され、各波長毎に分光され CCD によって電気信号として検出されることで発光スペクトルが得られる。

## 【実験結果・考察】

### 1. 有機溶媒中での蛍光タンパク質の蛍光励起

図 2 は銀基板上に吸着した RFP 分子膜の有機溶媒中での発光スペクトルを試料電圧を変えて測定したものである。このスペクトル中には波長 600 nm 付近に RFP からの蛍光ピークがあり、それ以外の発光は銀基板・銀探針によるプラズモンによって生じたものである。また同様にして作成した試料を図 3(a) のように波長 532 nm の単色光で励起して得た発光スペクトルを図 3(b) である。RFP の強い蛍光ピークが 606 nm に現れているが、これは図 2 中の RFP の蛍光ピークと良く一致している。この実験結果から RFP は有機溶媒中であっても大気中と同様に蛍光を示し、かつトンネル電流でも励起可能であることが分かる。

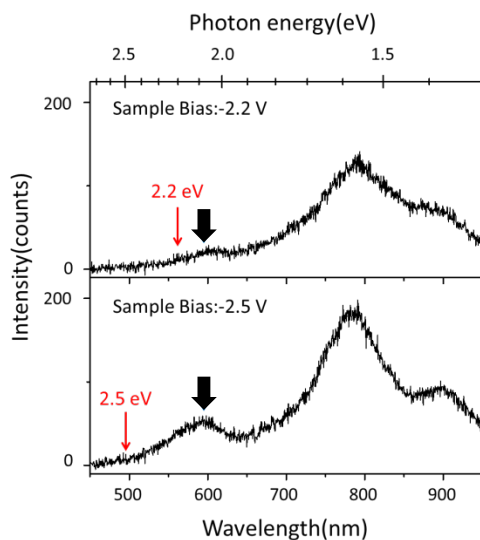


図 2 銀基板上の RFP の STM 発光スペクトル  
トンネル電流：10 nA，露光時間：30 秒

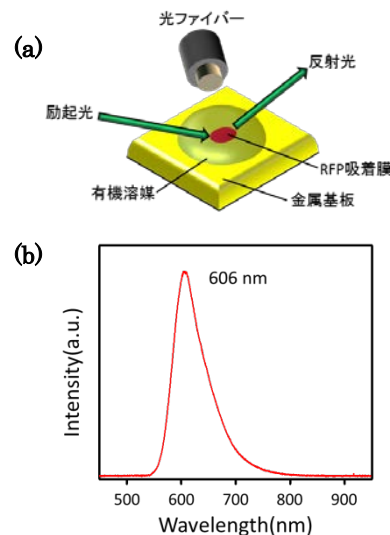


図 3 銀基板上の RFP の光励起発光測定の様式  
図(a)と発光スペクトル(b)

### 2. 金基板上のiRFP分子膜の表面観測と発光測定

図 4 は金基板上のiRFP分子膜の有機溶媒中におけるSTM像とSTM発光スペクトルである。まずSTM像(a)には広いテラスが広がっており、またステップの高さが約 3 Åであるため一見して金(111)面と区別出来ない。そこでSTM像(a)中央付近で  $50 \times 50 \text{ nm}^2$  の走査範囲で走査しながらSTM発光測定を行い、図 4 の発光スペクトルを得た。またSTM像(b)は試料電位が 1.8 Vの発光スペクトルの測定中の走査で得た像である。STM発光測定中の表面構造を安定して観察することに成功した。発光スペクトルには試料電位 1.8 Vにおいて太矢印で示した波長 740 nmの位置に発光ピークが現れている。銀基板上のRFPの場合と同様に単色光によるiRFPの蛍光スペクトルを測定したところ、この波長 740 nmの発光ピークと良い一致を示す蛍光スペクトルが得られた。よってこの発光ピークはiRFPの蛍光である。STM像(c)は発光測定後STM像(a)の走査範囲と同じ範囲で走査して得たものである。発光測定中に走査した  $50 \times 50 \text{ nm}^2$  の正方形の領域がくぼんでいることが分かる。この領域上で再度走査し表面構造を詳細に観測するとSTM像(d)の粒々した構造が得られた。iRFPの蛍光が

観測されたことからこれらの粒はiRFP分子であると考えられる。STM発光測定前のSTM像(a)では一様で平坦なテラスがSTM発光測定後にはiRFP分子が現れたことから、一様で平坦なテラスを形成していたiRFP分子膜がSTM発光測定中に探針の影響で崩れ、個々の分子が現れたと考えられる。

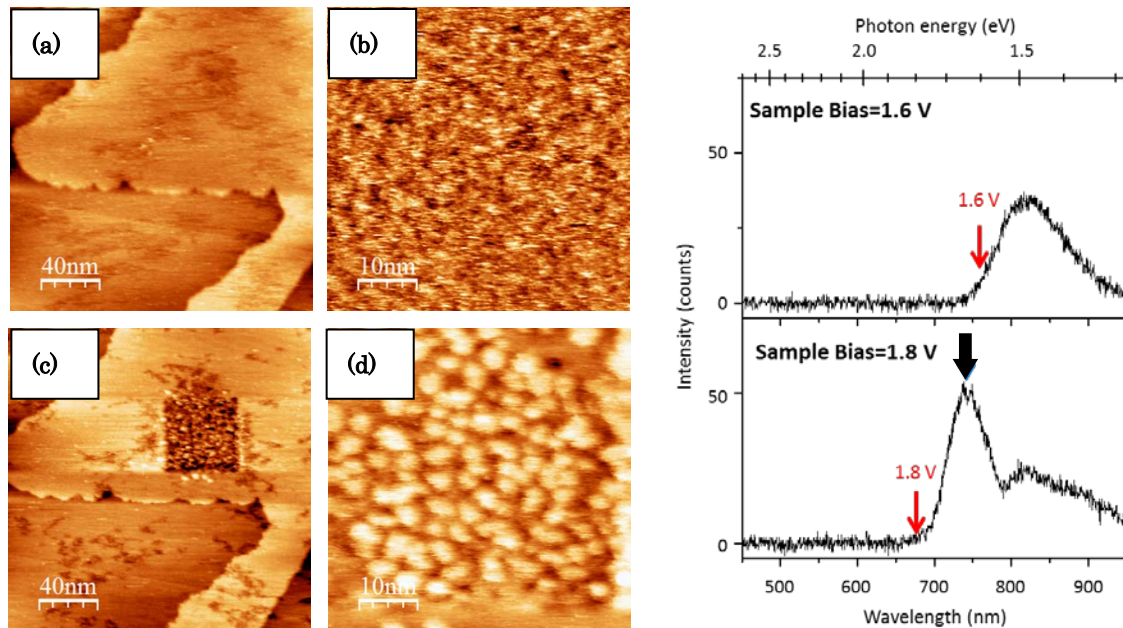


図4 金基板上的iRFP分子膜のSTM像(左)とSTM発光スペクトル(右)

(左)トンネル電流: 0.35 nA, 試料電位: (a)(c)(d) 0.5 V, (b) 1.8 V, 走査範囲: (a)(c) 200×200 nm<sup>2</sup>, (b)(d) 50×50 nm<sup>2</sup>, z方向スケール: (a)(c)(d) 6 Å, (b) 5Å  
(右)トンネル電流: 0.35 nA, 露光時間: 20秒

### 【総括】

まず銀基板とRFPを用いて有機溶媒中でもトンネル電子で蛍光が励起されることを確認した。次に有機溶媒・金基板の使用によって測定の安定化を図り、同時に金基板で励起可能なiRFPを選択することで蛍光タンパク質のSTM発光測定と表面構造観測を同時に行うことに成功した。生体分子のような複雑な構造を持つ分子であってもSTMを用いて室温・大気圧下でナノスケール表面観測と発光観測を同時に行う手法を確立できた。

[1] Grigory S Filonov et al., *Nature Biotechnology*, 29(2011), 757

### 【学会発表】

1. 仲村裕也、岩谷忠彦、松永宗一郎、山田太郎、川合眞紀、第72回応用物理学会学術講演会(山形、9月、2011年) 金属表面における蛍光タンパク質のトンネル電子励起発光
2. Yuya Nakamura, Tadahiko Iwaya, Soichiro Matsunaga, Taro Yamada, Maki Kawai, 6<sup>th</sup> International Symposium on Surface Science (Funabori, Japan) “*Fluorescence from protein molecules on metal surfaces induced by tunneling electrons*”