

## 蛍光相関と蛍光寿命の同時測定による 不均一系の二次元蛍光寿命相関解析

(理研・田原分子分光) ○石井邦彦, 田原太平

【序】我々は蛍光相関分光(FCS)と時間相関光子計数法(TCSPC)による蛍光寿命測定を組み合わせ、生体高分子に代表される複雑な分子の構造・ダイナミクスを蛍光寿命の不均一性と揺らぎを通して調べることを試みている。これまでに、通常の蛍光相関関数に加えて蛍光寿命の重みを付けた相関関数を利用することで、複数の蛍光物質を含む試料の不均一性を検出できることを報告した[1]。本研究では、FCSとTCSPCの同時測定により得られる光子列データからさらに多くの情報を抽出するため、二次元蛍光相関マップを作成して混合物からなる試料の蛍光減衰曲線を分解する新たな解析法を提案する。

【TCSPC-FCS 測定による蛍光寿命相関分光】我々は希薄溶液からの蛍光強度の揺らぎ  $I(t)$  を観測する通常の蛍光相関分光計に加え、光源としてフェムト秒パルスレーザーを使用し、時間分解能を備えた検出器でTCSPC測定を行っている。これにより、試料分子からの個々の蛍光光子について、その(測定開始時点を基準とした)絶対到着時間  $t_i$  と励起パルスからの相対遅延時間  $T_i$  が同時に記録される。これらを用いて蛍光寿命  $T(t)$  の重みを付けた蛍光相関関数

$$G_L(\Delta t) = \frac{\langle I(t)T(t)I(t+\Delta t)T(t+\Delta t) \rangle}{\langle I(t)T(t) \rangle^2} = \frac{1}{C} \sum_{i,j} \{ T_i T_j : t_j - t_i = \Delta t \} \quad C: \text{normalization factor}$$

を計算し、通常の蛍光強度相関関数  $G_I(\Delta t)$  と比較すると、試料が均一な場合には  $G_L(\Delta t)$  と  $G_I(\Delta t)$  は同じであるが、蛍光寿命の異なる複数の物質が含まれている場合には、図1に示すように2つの相関関数の違いとして明確に不均一性を検出することができる[1]。

【二次元蛍光減衰相関マップ】以上の方法は蛍光寿命の不均一性の存在を簡便に検知するためのものであるが、同様の解析をより一般的な形で行うこともできる。 $\{t_i\}$  と  $\{T_i\}$  を用いてある遅延時間  $\Delta t$  での条件付き相関関数

$$C(\Delta t; T_1, T_2) = \langle I(t)I(t+\Delta t) : T(t)=T_1, T(t+\Delta t)=T_2 \rangle \\ = \sum_{i,j} \{ 1 : t_j - t_i = \Delta t, T_i = T_1, T_j = T_2 \}$$

を定義する。これは蛍光減衰曲線中の相対遅延時間  $T$  が異なる要素の間の相互相関関数に相当する。例としてこの量を図1の相関関数の計算に用いた色素混合溶液のデータを使って求め、 $T_1, T_2$  について二次元表示したものを図2に示す。

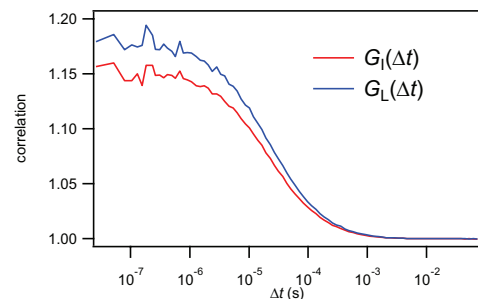


図1 ローダミン6G/ローダミンB混合溶液の蛍光相関関数

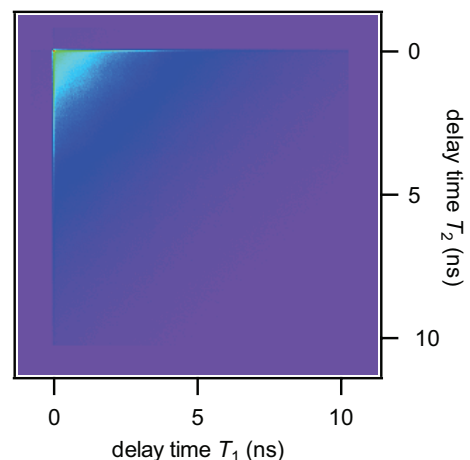


図2 ローダミン6G/ローダミンB混合溶液の二次元蛍光減衰相関マップ ( $\Delta t = 0 - 10 \mu s$ )

1. 蛍光寿命分布との対応 この相関マップから無相関成分を引いたものは混合物の蛍光減衰曲線に寄与する各化学種の自己相関の和になっていると考えられる。なぜならば異なる化学種間の相互相関は（それらに間に化学反応による相互変換が起こらない限り）ゼロになるからである。例えば2つの化学種が試料中に存在し、各化学種の蛍光減衰がそれぞれ時定数の異なる単一指数関数で与えられる場合を考える。このとき二次元蛍光減衰相関マップと

$$C(\Delta t: T_1, T_2) =$$

$$\int_0^\infty d\tau_1 \int_0^\infty d\tau_2 C(\Delta t: \tau_1, \tau_2) \exp(-T_1/\tau_1) \exp(-T_2/\tau_2)$$

のように関係付けられる二次元蛍光寿命相関分布  $C(\Delta t: \tau_1, \tau_2)$  においては、異なる蛍光寿命成分間のクロスピークが存在しない（図3 A）。逆に試料中に単一の化学種のみが存在し、その蛍光減衰が複数の指数関数の和で表される場合、それらの蛍光寿命成分の間にはクロスピークが現れる（図3 B）。このように、二次元蛍光減衰相関マップには蛍光減衰曲線に含まれる複数の指数関数成分が独立な化学種に由来するものかどうかという情報が含まれている。

## 2. 固有値解析による独立成分数の判定

より一般的には、二次元相関マップの固有値分解により、原理的にそこに含まれる独立成分数についての知見を得ることができる。これを図3のシミュレーションのデータに適用すると、有意な固有値の数と独立成分数が一致することが分かる（図4）。

【応用】この方法によって、試料に含まれる独立成分の挙動を  $\tau$  の関数として追跡できれば、構造変化・化学反応などによって系の不均一性が平衡化するダイナミクスを研究する手段になると期待される。また、 $a \rightarrow b$  のように一方向に反応が進行している系に対しては、二次元蛍光減衰相関マップに  $C(\Delta t: T_1, T_2) \neq C(\Delta t: T_2, T_1)$  となるような非対称成分が現れうると考えられ、この反応の途中の状態に関する知見が得られる可能性がある。

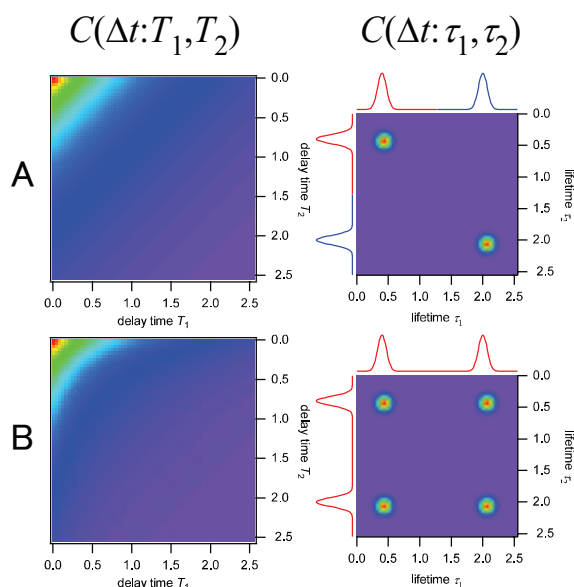


図3 2成分系 (A) と1成分系 (B) の二次元蛍光減衰相関マップのシミュレーション

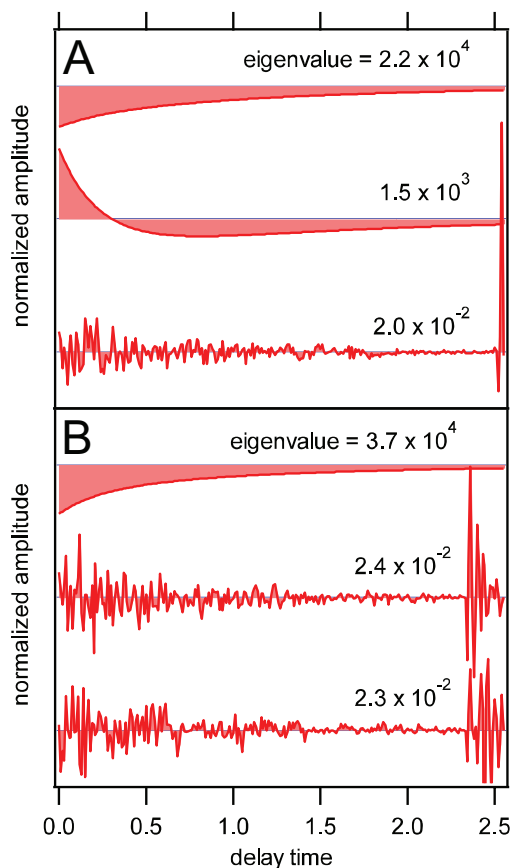


図4 図3の  $C(\Delta t: T_1, T_2)$  の固有値分解。A : 2成分系、B : 1成分系。