

生体高分子の揺らぎを観る新しい手法：二次元蛍光寿命相関分光法

(理研・田原分子分光) ○石井 邦彦, 田原 太平

【序】生体高分子に標識した蛍光色素の蛍光寿命は生体高分子の構造の優れたプローブとなる。例えば FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) を利用すれば生体高分子の構造変化をドナー色素の蛍光寿命の変化として検出できる。我々は生体高分子の構造揺らぎを調べるための新しい手法として、蛍光寿命の変化を一分子レベルで追跡してその時間揺らぎを可視化する二次元蛍光寿命相関分光法を提案した[1]。本研究ではこのアイデアを実用化するため最大エントロピー法(MEM)に基づくフィッティング解析を導入する。この新手法を用いてヘアピン DNA の構造転移[2]を観測し、実際の生体高分子の構造揺らぎへの応用可能性を検証した。

【方法】本手法では蛍光相関分光計の光源としてフェムト秒パルスレーザー(76 MHz)を用い、蛍光検出器からの光子信号を時間相関光子計数回路で処理することにより図 1 のような蛍光光子の発光遅延時間の時系列データを得る。これに対して以下の手順で解析を行う。

1. 発光遅延時間二次元相関マップの作成 ある時間間隔 ΔT をもつ光子の対を集め、各対の2つの光子の発光遅延時間(t', t'')により分類して光子対のヒストグラム $M(\Delta T; t', t'')$ を作る。行列 $M(\Delta T; t', t'')$ の各要素は異なる発光遅延時間の間の相互相関を表す。

$$M(\Delta T; t', t'') = \langle I(T; t') I(T + \Delta T; t'') \rangle \quad (1)$$

2. 無相関成分の除去と一分子相関の抽出 こうして得られた $M(\Delta T; t', t'')$ にはバックグラウンド発光や異なる分子からの蛍光光子の対といった無相関成分が含まれている。これを除くため、相関が失われる $\Delta T \rightarrow \infty$ での値を差し引く。

$$M_{\text{corr}}(\Delta T; t', t'') = M(\Delta T; t', t'') - M(\infty; t', t'') \quad (2)$$

その結果、一分子で相関を計測したのと等価な $M_{\text{corr}}(\Delta T; t', t'')$ が得られる。

3. MEM によるフィッティング：逆ラプラス変換 構造揺らぎの情報を得るためには、発光遅延時間の相関 $M_{\text{corr}}(\Delta T; t', t'')$ から蛍光寿命の相関に変換する必要がある。一般に蛍光減衰曲線 $I(t)$ から蛍光寿命分布 $a(\tau)$ への変換 (形式的に逆ラプラス変換となる) は数値的に不安定であることが知られており、物理的に妥当な分布を推定するため情報エントロピー

$$S(a) = \int \left\{ a(\tau) - m(\tau) - a(\tau) \ln \frac{a(\tau)}{m(\tau)} \right\} d\tau \quad (3)$$

を指標とし、実験データを再現する解の中から過剰に複雑な構造を持たない最も自然な解 (最大エントロピー解) を求めることが行われてきた ($m(x)$ はエントロピーの基準となる初期分布) [3]。本研究ではこの逆ラプラス変換を二次元蛍光寿命分布に拡張し、MEM を用いて

$$M_{\text{corr}}(\Delta T; t', t'') = \iint \tilde{M}(\Delta T; \tau', \tau'') \exp(-t'/\tau') \exp(-t''/\tau'') d\tau' d\tau'' \quad (4)$$

と表される $\tilde{M}(\Delta T; \tau', \tau'')$ を求める。 $\tilde{M}(\Delta T; \tau', \tau'')$ は系内に存在する種 i ごとに

$$\tilde{M}(\Delta T; \tau', \tau'') = \sum_i a_i(\tau') a_i(\tau'') \quad (5)$$

と分解できる。そこで i の最大値を設定した上で $a_i(\tau)$ をフィッティングパラメータとし、(4),(5) を満たす解の中から(3)を用いて最大エントロピー解を求めた。

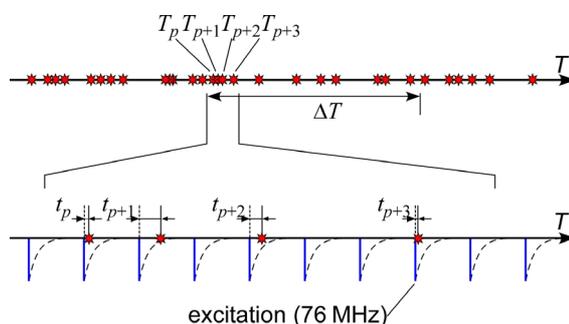


Fig. 1. 本実験で得られる蛍光光子の時系列データ。各光子の検出時刻について測定開始からの経過時間(T)と直近の励起パルスからの遅延時間(t)が記録される。

【結果】 1. 動的モンテカルロシミュレーション 図2は蛍光寿命の異なる二状態間の構造変化（単分子反応）を仮定して人工的に発生させた時系列データに対し本手法を適用して得られた $\tilde{M}(\Delta T; \tau', \tau'')$ である。各状態の平均滞在時間(200 μs)より十分短い時間スケールの ΔT を選

ぶと（図2a）2つの蛍光寿命成分の交差ピーク（ $\tilde{M}(\Delta T; \tau', \tau'')$ の非対角項）は現れない。（5）からこれはこれらの蛍光寿命成分が別の種に由来するためと解釈できる。一方 ΔT を大きくすると（図2b）、交差ピークが現れる。これは反応の進行に伴い2つの種の区別がつかなくなり、あたかも2つの蛍光寿命成分をもつ1つの状態であるかのように振舞うことを表している。この結果から、交差ピークに注目することで反応（構造変化）の時間スケールを知ることができるということが分かる。

2. ヘアピン DNA の構造転移 我々は以前に蛍光寿命相関分光法[4]を用いて両端に相補的な塩基配列をもつ一本鎖 DNA のヘアピン構造形成・解離過程を観測し、約 100 マイクロ秒で蛍光寿命を変化させるような構造揺らぎが存在することを見出した[2]。今回図3に示す一本鎖 DNA に対して本手法を適用し、ダイナミクスの帰属を試みた。図4は約 100 マイクロ秒の構造変化の前で蛍光寿命相関マップを比較したものである。これを見ると、構造変化とともに新たに現れた交差ピークが存在する一方（図4b中A）、0.3-1 ミリ秒後でも依然として交差ピークを伴わない蛍光寿命成分（同B）も同時に見られることが分かる。これらの特徴はマイクロ秒領域の構造変化が比較的蛍光寿命の短い（ドナー-アクセプター間距離が近い）構造の間で起こっており、蛍光寿命の長い成分はこの時間領域の変化に関与していないことを示している。このように、二次元蛍光寿命相関解析を行うことでマイクロ秒領域の構造揺らぎについて以前よりも詳細な情報を得ることが可能となった。

【結論】 本研究で示されたように、本手法は生体高分子のマイクロ秒領域での高速な構造揺らぎの観測に応用可能である。そのため、これまでの一分子 FRET 計測による揺らぎ観測[5]の限界を超える時間分解能をもつ新しい手法として活用されることが期待できる。

- [1] 石井邦彦・田原太平, 第3回分子科学討論会, 4P091 (2009); K. Ishii and T. Tahara, submitted for publication.
 [2] 石井邦彦・田原太平, 第4回分子科学討論会, 1B21 (2010).
 [3] J. -C. Brochon, *Methods Enzymol.* 240, 262 (1994).
 [4] K. Ishii and T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* 114, 12383 (2010).
 [5] A. Hoffmann et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 1857 (2011)など.

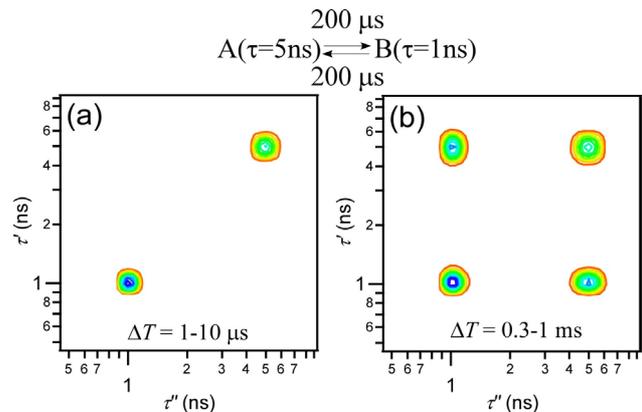


Fig. 2. 反応スキーム（上）に基づくシミュレーションデータの蛍光寿命相関マップ。

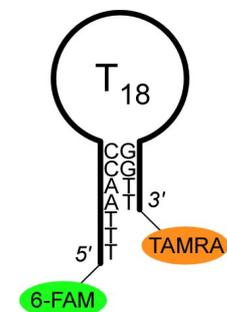


Fig. 3. 実験に用いた FRET ラベラー一本鎖 DNA。

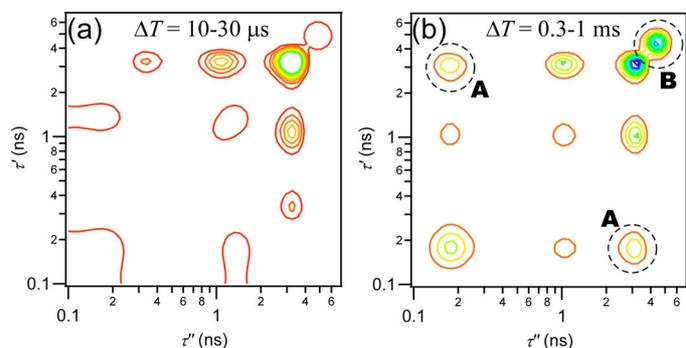


Fig. 4. ヘアピン DNA の蛍光寿命相関マップ。