

2D20

蛍光寿命と蛍光強度比の同時測定による二次元 FRET 蛍光相関分光

(理研・田原分子分光) ○石井 邦彦、Chao-Han Cheng、田原 太平

Development of two-dimensional FRET-FCS utilizing fluorescence lifetime and fluorescence intensity ratio

(Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN) ○Kunihiko Ishii, Chao-Han Cheng, Tahei Tahara

我々は最近、生体高分子の自発的な構造ダイナミクスを一分子レベルで調べることができる二次元蛍光寿命相関分光法 (2D-FLCS) を開発し、その有用性を示してきた[1-3]。本手法では原理的にサブマイクロ秒オーダーの平衡化過程を可視化することができるが、実際の実験では得られる光子数に限界があるため、長時間のデータ積算が必要であった。本研究ではデータ収集効率を改善する試みとして、FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) を利用した実験の場合について、アクセプター由来の蛍光光子の情報を加えた二次元 FRET 蛍光相関分光法を開発した。

【原理】2D-FLCS では、測定対象生体高分子に標識した蛍光プローブの蛍光寿命の変化を利用して、異なる分子構造の間の平衡化過程をある遅延時間での二次元マップとして表す。FRET を用いる場合、ドナーの蛍光寿命を用いてエネルギー移動効率 E を $E = 1 - \tau/\tau_0$ (1) と表し (τ, τ_0 はそれぞれアクセプター有り・無しでの蛍光寿命)、これを Förster の式を通してドナー・アクセプター間距離に対応させることで構造変化を議論する。

一方、FRET 効率はドナー・アクセプターの蛍光強度 I_D, I_A を用いて $E = I_A / (I_D + I_A)$ (2) と表される。式(1),(2)から分かるように、FRET 効率が上がるとドナー蛍光寿命が短くなるが、より多くの励起エネルギーがアクセプターに移動するため、FRET 効率が低いほど信号収集効率が低下する。以下に述べる二次元 FRET 蛍光相関分光法では、ドナーの蛍光減衰曲線とともにアクセプター蛍光の強度を同時に観測し、ドナーの蛍光寿命 (式(1)) とドナー・アクセプター蛍光強度比 (式(2)) の両面から分子種を同定することで、特に高 FRET 効率種の検出精度の改善を図る。

【実験と解析】時間相関光子計数法 (TCSPC) による蛍光相関分光計[1]の通常の見出し系 (図 1a) に、ダイクロイックミラーを介してアクセプター蛍光を分離・検出する光学系を追加した (図 1b)。これを用いてドナー側の蛍光光子の到着時間 T と励起パルスからの遅延時間 t に加えて、アクセプター側の蛍光光子の到着時間 T' を同時に計測した。ここでアクセプター側の光子を検出した場合はそれを示す値を遅延時間の代わりに t' に代入した。このようにして得られた T, t のリスト (図 1c) から $T_{p''} - T_{p'} = \Delta T$ となる光子の対 p', p'' を探し出し、対応する t, t' の値を参照して二次元ヒストグラムを作成した (図 1d)。得られた二次元マップに対して 2D-FLCS の解析法 [2] に従って最大エントロピー法に基づく逆ラプラス変換と独立成分への分解を行

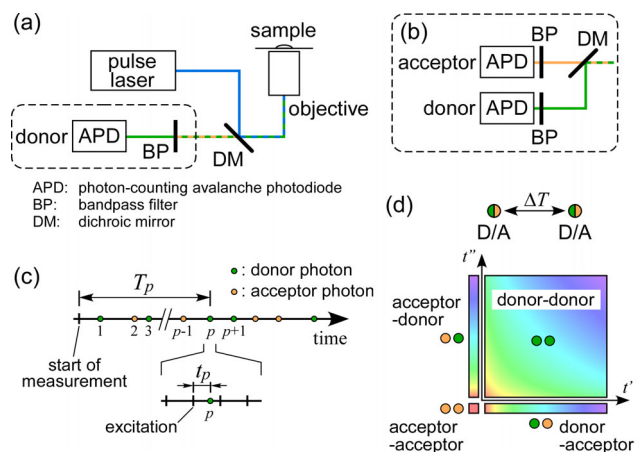


図 1 二次元 FRET 蛍光相関分光法。

い、各成分の蛍光寿命分布とアクセプター蛍光強度を得た。

【結果と考察】図2にFRET標識したヘアピンDNA試料[2]の二次元蛍光遅延時間相関マップ($\Delta T = 10\text{-}30\ \mu\text{s}$)から抽出した1)第一、第二光子が共にドナー側であった場合、および2)第一光子がアクセプター側、第二光子がドナー側であった場合の第二光子の蛍光減衰曲線を示す。ヘアピン構造を形成した状態を表す短寿命成分は、ドナー-ドナーの自己相関への寄与は少ないが、アクセプター-ドナーの相互相関に顕著に現れることが分かる。これは短寿命成分が高FRET効率種に対応しており、ドナー側よりもアクセプター側で強く発光することを示している(式(1),(2))。図3は異なる ΔT での二次元蛍光遅延時間相関マップ($\Delta T = 10\text{-}30\ \mu\text{s}$, $30\text{-}100\ \mu\text{s}$, $100\text{-}300\ \mu\text{s}$)を2D-FLCSによりグローバルに解析して得た3つの独立成分の蛍光寿命分布およびアクセプター蛍光強度である。ここでも短寿命種が高いアクセプター蛍光強度を示していることが確認される。(なお、最も蛍光寿命が長い成分はアクセプターを欠いたDNA分子に帰属される[2]。)3つの成分の自己相関曲線をEnderleinらの方法[4]を応用して計算した結果を図4に示す。アクセプター蛍光強度を含めた場合の結果(a)と、ドナー蛍光のみを用いて計算した結果(b)を比較すると、長寿命成分ではあまり差がないのに対して、短寿命成分では100倍以上の信号雑音比の改善が見られた。これは図2に示したようにアクセプター-ドナーの相互相関に短寿命種の情報が多く含まれているためと解釈できる。本解析で使用したデータは1時間の露光時間で取得したものであり、この方法を利用することで、FRET効率が低い分子種が関与するダイナミクスを比較的短時間で精度良く観測できることが示された。

【参考文献】

1. K. Ishii and T. Tahara, *Chem. Phys. Lett.* **519-520**, 130 (2012).
2. 石井邦彦・田原太平, 第5回分子科学討論会, 1B09 (2011); K. Ishii and T. Tahara, *submitted*.
3. 乙須拓洋・石井邦彦・田原太平, 第5回分子科学討論会, 1B10 (2011); 第6回分子科学討論会, 1B05 (2012).
4. I. Gregor and J. Enderlein, *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**, 13 (2007).

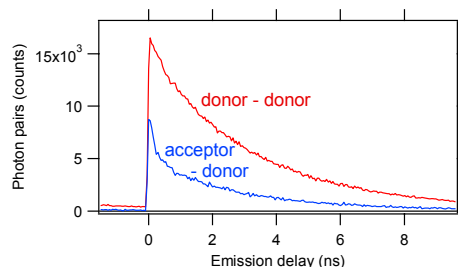


図2 ヘアピンDNAの二次元相関マップから抽出した第二光子(ドナー側)の減衰曲線。

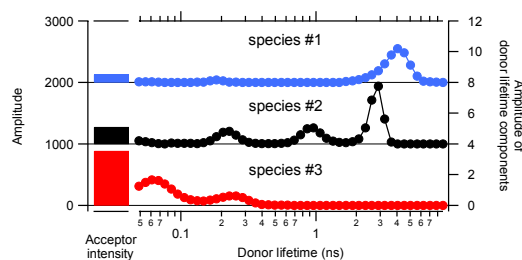


図3 2D-FLCSにより得られた独立成分のドナー蛍光寿命分布とアクセプター強度。

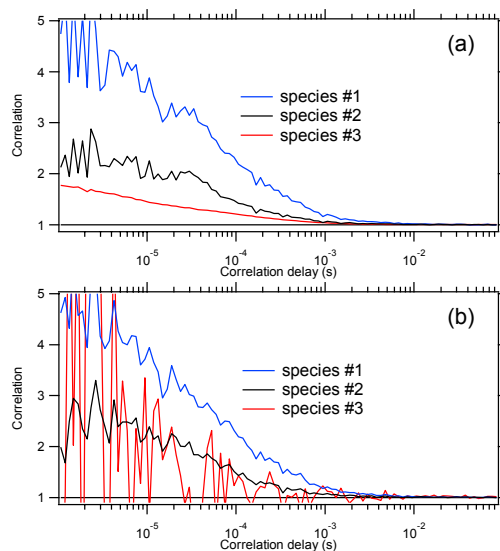


図4 各独立成分の自己相関関数。(a)アクセプター蛍光強度を含めて計算した場合、(b)ドナー蛍光のみで計算した場合。