

選択的蛍光寿命相関分光法の開発

(理研・田原分子分光、理研・光量子工学) ○石井 邦彦、田原 太平

Development of selective fluorescence lifetime correlation spectroscopy

(Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN; RIKEN Advanced Photonics Center)

○Kunihiko Ishii, Tahei Tahara

【序】我々が最近開発した二次元蛍光寿命相関分光法 (2D-FLCS) を用いると、マイクロ秒の時間分解能で平衡状態にある生体高分子の準安定構造を蛍光寿命分布として同定することができる[1]。得られた蛍光寿命分布を基に各構造状態の自己相関関数と状態間の相互相関関数を計算すれば、構造変化の時定数が求められる。この相関計算はやや煩雑だが、Enderlein らによって提案された蛍光寿命相関分光法 (FLCS) を用いれば、既知の蛍光減衰データを基に状態選別的な相関関数を効率的に計算できる[2]。これを 2D-FLCS と組み合わせて用いることで、未知の試料に対して構造状態の分布を決定すると同時に、構造変化のダイナミクスを定量的に議論するというスキームが完成する。しかし従来の FLCS では背景光や夾雑物の寄与を含めすべての相関成分を対等に扱って計算するため、信号雑音比が低下しやすいという問題があった。本講演では、相関成分を適切に選択しながら計算を行うことで信号雑音比を大幅に改善できることを示す。

【方法】2D-FLCS, FLCS の実験では、時間相関光子計数法 (TCSPC) を用いて顕微鏡下で希薄な試料溶液からの蛍光を時間分解観測し、検出された光子ごとに測定開始からの経過時間 (T)、直近の励起パルスからの遅延時間 (t) の 2 種類の情報を取得する。測定を継続して行うことで各遅延時間チャンネル t ごとに蛍光強度の時間変化 $I(T; t)$ が求められる。FLCS では、試料中に含まれる全ての分子種の蛍光減衰曲線が既知であるとする。分子種 ξ の蛍光減衰曲線を $d_{\xi}(t)$ として、これをまとめた行列 \mathbf{D} : $D_{i\xi} = d_{\xi}(t)$ を作る。これを基に、次のように計算されるフィルター行列を求める。

$$\mathbf{F} = \left\{ \mathbf{D}^T \text{diag}(\bar{\mathbf{I}})^{-1} \mathbf{D} \right\}^{-1} \mathbf{D}^T \text{diag}(\bar{\mathbf{I}})^{-1}. \quad (1)$$

ここで、 $\bar{\mathbf{I}}$ は T について平均した蛍光減衰曲線を表し、 $\bar{I}_t = \langle I(T; t) \rangle$ である。このフィルター行列の要素 $F_{\xi t} = f_{\xi}(t)$ と $I(T; t)$ を使って以下のように状態選別的な相関関数が求められる[2]。

$$C_{\alpha\beta}(\Delta T) = \sum_t \sum_{t'} \langle f_{\alpha}(t) I(T; t) f_{\beta}(t') I(T + \Delta T; t') \rangle - \sum_t \langle f_{\alpha}(t) I(T; t) \rangle \sum_{t'} \langle f_{\beta}(t') I(T; t') \rangle. \quad (2)$$

2D-FLCS で用いる $\mathbf{M}(\Delta T)$: $M_{tt'}(\Delta T) = \langle I(T; t) I(T + \Delta T; t') \rangle - \bar{I}_t \bar{I}_{t'}$ [1] を使ってこれを行列表示すると、

$$\mathbf{C} = \mathbf{F} \mathbf{M}(\Delta T) \mathbf{F}^T. \quad (3)$$

となる。式(3)は、実験で得られた t ごとの蛍光強度の相関の二次元マップ $\mathbf{M}(\Delta T)$ にフィルター行列を掛けるだけで状態選別的な相関関数の全ての組み合わせが同時に求められることを示している。これは、 $\mathbf{D} \mathbf{C} \mathbf{D}^T \approx \mathbf{M}(\Delta T)$ となるような \mathbf{C} の要素を最小二乗解として求めるのと等価である。しかし実際の応用においては、多くの場合 $d_{\xi}(t)$ として与える蛍光減衰曲線には、溶媒のラマン散乱や検出器の暗計数などその由来から相関を与えないことが明らかである成分や、溶液中の不純物のように自己相関をもつが測定対象分子との相互相関をもたないとみなし得る成分が存在する。式(2,3)ではこれらが与える自明な相関を未知数として扱い最小二乗計算を行うことになるため、解の誤差が本来期待されるよりも大きくなる。今回新しく提案する方法では、式(3)の \mathbf{C} に代えて、 \mathbf{C} の要素のうち自明な相関の値を零に固定した \mathbf{C}' を作る。例えば、

$$\mathbf{C}' = \begin{pmatrix} C'_{AA} & 0 \\ 0 & C'_{BB} \end{pmatrix} \quad (4)$$

のように相互相関にあたる成分を零とし、 C'_{AA}, C'_{BB} のみを使って $\mathbf{DC'D}^T \approx \mathbf{M}(\Delta T)$ となるような最小二乗解を求める。この計算のために、 \mathbf{C}' をベクトル化した表記 $\text{vec}(\mathbf{C}')$ に変更する。 $\text{vec}(\mathbf{C}')$ は行列 \mathbf{C}' を列ごとに分解して縦一列に並べ直したものである。そして $\text{vec}(\mathbf{C}')$ のうち零に固定する成分を省くため、

$$\mathbf{P}\text{vec}(\mathbf{C}') = \begin{pmatrix} C'_{AA} \\ C'_{BB} \end{pmatrix} \equiv \mathbf{c}', \quad \mathbf{P} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (5)$$

となるような行列 \mathbf{P} を導入する。これを用いて、 \mathbf{C} に対して $\mathbf{c}' = \mathbf{W} \cdot \text{vec}(\mathbf{C})$ となる変換行列 \mathbf{W} を以下のように導出した。($\mathbf{X} \otimes \mathbf{Y}$ は行列 \mathbf{X} と \mathbf{Y} のクロネッカー積である。)

$$\mathbf{W} = \left[\mathbf{P} \left\{ \mathbf{D}^T \text{diag}(\bar{\mathbf{I}})^{-1} \mathbf{D} \right\} \otimes \left\{ \mathbf{D}^T \text{diag}(\bar{\mathbf{I}})^{-1} \mathbf{D} \right\} \mathbf{P}^T \right]^{-1} \mathbf{P} \left\{ \mathbf{D}^T \text{diag}(\bar{\mathbf{I}})^{-1} \mathbf{D} \right\} \otimes \left\{ \mathbf{D}^T \text{diag}(\bar{\mathbf{I}})^{-1} \mathbf{D} \right\}. \quad (6)$$

従来のFLCSで計算される \mathbf{C} にこの \mathbf{W} を作用させることで、直ちに \mathbf{c}' を求めることができる。

【結果】 この方法を蛍光寿命の異なる分子種の混合物からなる系に適用した。試料は相補的な配列をもつ2種類の一本鎖DNAオリゴマーで、FRET対をなす蛍光色素を片方ずつ標識した。アクセプター鎖の濃度をドナー鎖の半分にするすることで、二本鎖を形成したDNA(1)とドナー鎖が一本鎖のままのDNA(2)が共存する条件とした。この時ドナー蛍光の蛍光寿命(図a)は、1でFRETが起こることを反映して二成分的な減衰を示す。ここから2のみで測定した蛍光減衰曲線をtail matchingにより差し引き、1と2それぞれの $d_i(t)$ を見積もった。これらを用いてFLCSの解析を行った結果が図b,cである。従来のFLCS(図b)の結果から、1と2の相互相関がほぼ零であることが分かる。これは二本鎖がFCSの時間スケールで十分安定で、1と2の交換が起こっていないことを示している。一方これらの相関曲線を注意深く見ると、2本の相互相関曲線 (C_{12}, C_{21})のノイズパターンが良く一致していること、それが自己相関曲線 (C_{11}, C_{22})のノイズと逆位相になっていることが分かる。そこで C_{12}, C_{21} を零に固定して自己相関曲線 C'_{11}, C'_{22} を求めると(図c)、このノイズが解消され、信号雑音比が向上することが分かった。講演では構成成分の蛍光寿命の比によって本手法の効果がどのように変化するかをモンテカルロシミュレーションを用いて検討した結果についても紹介する。

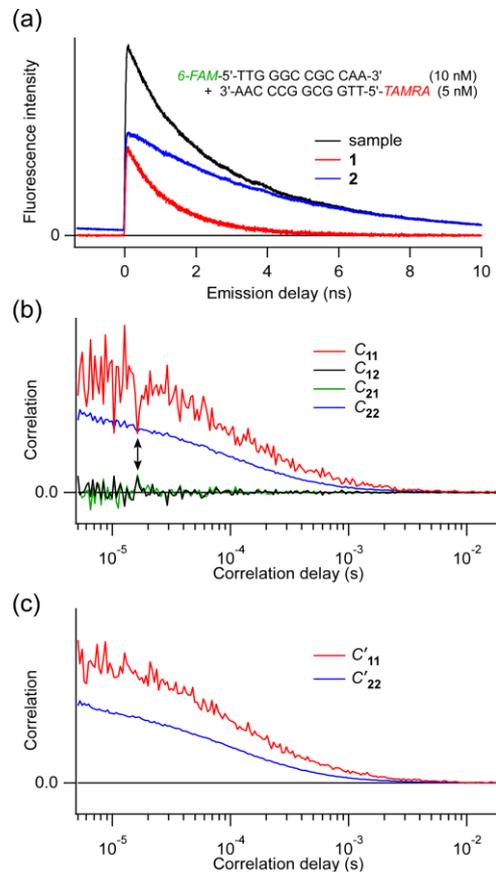


図 (a) 黒線：試料のドナー蛍光の蛍光減衰曲線。青線：ドナー鎖のみで測定したもの。赤線：黒線から青線を tail-matching して引いたもの。(b) FLCS 解析の結果。矢印でノイズが顕著に相関を示している部分を示した。(c) 選択的 FLCS 解析の結果。

【参考文献】

- [1] K. Ishii and T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* **117**, 11414 (2013), *J. Phys. Chem. B* **117**, 11423 (2013).
 [2] I. Gregor and J. Enderlein, *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**, 13 (2007).