

4C06

三次元相関分光による重畳した蛍光信号のブラインド分離

(理研・田原分子分光、理研・光量子工学) ○石井 邦彦、田原 太平

Blind separation of overlapped fluorescence signals using three-dimensional correlation spectroscopy

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

○Kunihiko Ishii, Tahei Tahara

【序】単一分子分光実験の目的を一般的に述べると、不均一な混合物試料に対して構成成分の寄与を分離し、独立成分の数および各成分の濃度や成分ごとの分光情報（スペクトルなど）を決定する、ということである。我々は近年、不均一系の各成分の寄与を分離する新しい方法として二次元蛍光寿命相関分光法を提案した[1,2]。この方法では、低濃度の蛍光性試料溶液から発せられる蛍光光子の励起 - 発光遅延時間を計測し、その時間揺らぎの相関を二次元蛍光遅延時間相関マップとして表現する。この二次元マップを指数関数減衰の和を用いてフィッティング解析することで、独立成分の数と各成分の蛍光減衰曲線を得る。本講演ではこの解析法を一步進めて、蛍光信号の揺らぎの三次相関を用いることで、指数関数などのモデルを使わずに独立成分の蛍光減衰曲線を一意的に決定できることを示す。これを応用すれば、蛍光寿命以外の分光パラメータに対しても多次元相関計測による解析法を有効に活用できると期待される。

【原理】蛍光強度の時間揺らぎを $I(T; \xi)$ と表す。 T は測定開始後の経過時間、 ξ は注目する分光パラメータであり、以下では ξ を励起 - 発光遅延時間とする。 $I(T; \xi)$ の揺らぎを表す二次元相関行列は $M(\xi, \xi') = \langle I(T; \xi) I(T; \xi') \rangle - \langle I(T; \xi) \rangle \langle I(T; \xi') \rangle$ と定義される。(ただし、相関の遅延時間は零としている。) $M(\xi, \xi')$ を独立成分の寄与に分割することを考える。異なる独立成分の間には揺らぎの相関がないため、 $M(\xi, \xi')$ は以下のように独立成分の和に分解される。

$$M(\xi, \xi') = \sum_{i=1}^n g_i d_i(\xi) d_i(\xi'). \quad (1)$$

n は独立成分数、 g_i , $d_i(\xi)$ はそれぞれ成分 i の自己相関振幅、蛍光減衰曲線である。我々の目標は、実験データから $n, g_i, d_i(\xi)$ をモデルフリーで決定することである。そこで、 $M(\xi, \xi')$ を以下のように固有値分解してみる。

$$M(\xi, \xi') = \sum_{i=1}^n \lambda_i v_i(\xi) v_i(\xi'). \quad (2)$$

すると非零固有値 λ_i の数 n ($M(\xi, \xi')$ の階数) から独立成分数を決定できるが、固有ベクトル $v_i(\xi)$ は互いに直交化されており、一般に $d_i(\xi)$ に一致しない。すなわち、 $v_i(\xi)$ と $d_i(\xi)$ の間には以下の直交変換の自由度が残されている。

$$\sqrt{g_i} d_i(\xi) = \sum_{j=1}^n u_{ij} \sqrt{\lambda_j} v_j(\xi). \quad (u_{ij} \text{ は直交行列の要素}) \quad (3)$$

u_{ij} を正しく決定できれば上記の目標が達成される。しかし、指数関数減衰など何らかのモデルを用いない限り、 $M(\xi, \xi')$ のみから u_{ij} を決定することはできない。

そこで $M(\xi, \xi')$ の自然な拡張として、 $I(T; \xi)$ の揺らぎの三次元相関テンソル $T(\xi, \xi', \xi'')$ を考える。

$$T(\xi, \xi', \xi'') = \langle I(T; \xi)I(T; \xi')I(T; \xi'') \rangle - \langle I(T; \xi) \rangle \langle I(T; \xi')I(T; \xi'') \rangle - \langle I(T; \xi') \rangle \langle I(T; \xi)I(T; \xi'') \rangle - \langle I(T; \xi'') \rangle \langle I(T; \xi)I(T; \xi') \rangle + 2\langle I(T; \xi) \rangle \langle I(T; \xi') \rangle \langle I(T; \xi'') \rangle. \quad (4)$$

式(1)に対応して $T(\xi, \xi', \xi'')$ は独立成分の和として

$$T(\xi, \xi', \xi'') = \sum_{i=1}^n h_i d_i(\xi) d_i(\xi') d_i(\xi'') \quad (5)$$

と分解できるが、三次のテンソルの場合、二次の行列の場合とは異なりこのような成分分解は一意的であることが知られている[3]。すなわち、三次元相関分光を行って $T(\xi, \xi', \xi'')$ を評価し、これを式(5)の形に分解すれば、各成分のスペクトル情報 $d_i(\xi)$ が求められる。さらに $d_i(\xi)$ と式(1-3)より二次の自己相関振幅 g_i が求められ、 i の濃度を決定できる。

【方法】 解析に用いる蛍光光子のデータは、共焦点顕微鏡を用いた蛍光相関分光計を用いて収集する。パルスレーザーと時間相関光子計数装置により、各光子について励起 - 発光遅延時間を計測する。得られた励起 - 発光遅延時間の時系列データを基に揺らぎの二次元相関行列 $M(\xi, \xi')$ と三次元相関テンソル $T(\xi, \xi', \xi'')$ を構築する。次に $M(\xi, \xi')$ を固有値分解し、有意に零でない値をもつ固有値の数 n を調べるとともに、非零固有値 $\lambda_i (i=1 \sim n)$ に対応する固有ベクトル $v_i(\xi)$ を求める。これらを用いて、 $T(\xi, \xi', \xi'')$ を以下のように変形する。

$$\tilde{T}(i, i', i'') = \sum_{\xi, \xi', \xi''} T(\xi, \xi', \xi'') v_i(\xi) v_i(\xi') v_i(\xi''). \quad (i, i', i'' = 1 \sim n) \quad (6)$$

こうすることで、三次テンソルの要素数が n^3 に縮減される。このテンソルは式(3,5)から

$$\tilde{T}(i, i', i'') = \sqrt{\lambda_i \lambda_{i'} \lambda_{i''}} \sum_j \frac{h_j}{g_j^{3/2}} u_{ji} u_{ji'} u_{ji''}. \quad (7)$$

のように表される。そこでフィッティングにより直交行列の要素 u_{ji} を求め、さらに式(3)から g_i , $d_i(\xi)$ を決定する。

【応用】 以上に述べた方法の妥当性を検証するために、動的モンテカルロシミュレーション[1]により人工的に作成した光子データに対して応用した。シミュレーションでは蛍光寿命が 1 ns, 5 ns の2つの独立成分を仮定した。図にこのデータに対して計算した $M(\xi, \xi')$ の固有ベクトル $v_i(\xi)$ (a) と上記の方法で求めた $d_i(\xi)$ (b) (それぞれ $i=1,2$) を示す。(c) は光子データから2つの独立成分それぞれに由来する光子を抽出して蛍光減衰曲線を再構成したものである。(b) と (c) は良い一致を示しており、本手法が期待通りの結果を与えていることが分かる。講演では、本手法を実験データに適用した結果についても紹介する。

【参考文献】

- [1] K. Ishii and T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* **117**, 11414-11422 & 11423-11432 (2013).
- [2] T. Otsu, K. Ishii, and T. Tahara, *Nat. Commun.* **6**, 7685 (2015).
- [3] T. G. Kolda and B. W. Bader, *SIAM Review* **51**, 455 (2009).

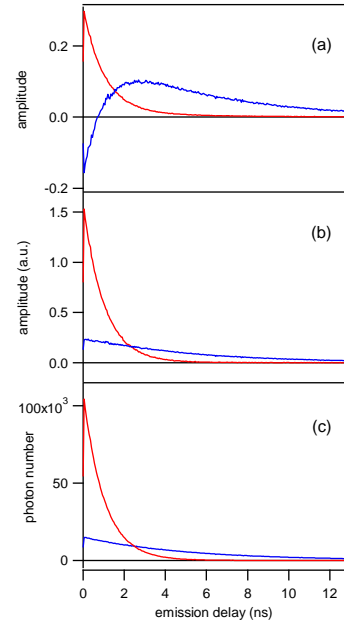


図 シミュレーションデータに対する応用結果。