

2F04

パルス交替励起方式を用いた二次元蛍光寿命相関分光法の開発

(¹理研・田原分子分光、²理研・光量子工学領域、³Carleton College)

○石井邦彦^{1,2}、水野耀^{1,3}、坂口美幸¹、Bidyut Sarkar¹、田原太平^{1,2}

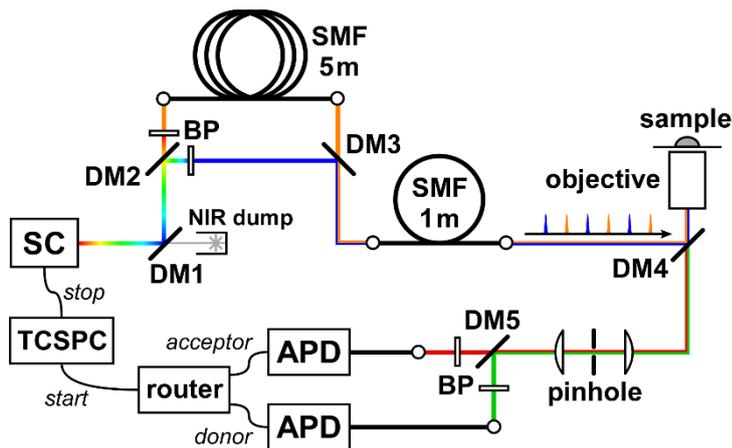
Development of two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy with pulsed interleaved excitation

(¹Mol. Spectrosc. Lab., RIKEN; ²RIKEN Center for Advanced Photonics; ³Carleton College)

○Kunihiko Ishii^{1,2}, Hikaru Mizuno^{1,3}, Miyuki Sakaguchi¹, Bidyut Sarkar¹, Tahei Tahara^{1,2}

【序】生体高分子などの複雑な分子系の物理化学においては、不均一な構造分布や構造間の自発的な遷移が重要なテーマになる。我々は最近、蛍光寿命を利用した一分子レベルの蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 測定と光子相関計測を組み合わせた二次元蛍光寿命相関分光法 (2D-FLCS) を開発し、生体高分子の構造多様性とマイクロ秒オーダーの構造間遷移の観測に応用してきた[1-4]。FRET を用いた実験では測定対象をドナー・アクセプターの二種類の蛍光色素で標識するが、現実にはすべての分子に確実に標識することは難しく、また測定中に色素の褪色が進むため、片方の色素しか含まない分子の共存が避けられない。最近一分子 FRET の分野では、より精度の高い計測を行うため、パルス交替励起 (PIE) の実験が提唱され、成果が上げられている[5,6]。PIE の特長は、アクセプターを直接励起するパルス光を新たに導入することで、アクセプターが失活した分子の影響やドナー色素とアクセプター色素の吸収/蛍光スペクトルの重なりの影響を定量的に評価でき、FRET 効率を正確に定められる点である。本研究では、2D-FLCS に PIE を取り入れるために新たな装置を製作し、得られた光子データの二次元相関解析を試みた。

【装置】構築した装置の概略を図 1 に示す。光源としてドナー励起用・アクセプター励起用の二色のパルス光が必要になるため、スーパーコンティニウム光源 (Fianium WL-SC400-8PPC) を用いて 20 MHz の白色パルス光出力を得、これを二分割してそれぞれ異なるバンドパスフィルターを用いて波長を選択した。PIE では二色の光パルスを時間的にずらして同一分子に交互に照射し、これらの光に対する応答を調べる。そこで本装置では長波長側 (563 nm) の光を 5 m のシングルモードファイバーに通して約 25 ns の遅延を与えた。これを短波長側の光 (482 nm) と合わせて別のシングルモードファイバーに通し、二色の光の空間的な重なりを確保した。この光パルス列をデュアルバンドダイクロイックミラー (DM4, Chroma ZT488/561rpc) を用いて水浸対物レンズ (Nikon Plan Apo VC 60×A WI) に導き、希薄な FRET 標識試料溶液 (数 nM) に集光した。DM4 を透過した蛍光光子のドナー/アクセプター成分を分離し、それぞれ別の光子検出器で検出した。各光子の到着時刻と 20 MHz の参照信号からの遅延時間を時間相関光子計数モジュール (Becker & Hickl SPC-130EM) を用いて記録した。



SC: supercontinuum light source
 DM: dichroic mirror
 BP: bandpass filter
 SMF: single-mode fiber
 APD: avalanche photodiode
 TCSPC: time-correlated single-photon counting module

図1 PIE-2D-FLCS 装置の概略。

【解析】二次元相関解析は、既報の 2D-FLCS および二色検出 2D-FLCS[7]に準じて行った。光子列データを検索して任意の時間間隔 (ΔT) で検出された光子対を抽出し、それらの検出波長 (D:525nm/A:609nm) と参照信号からの遅延時間に従って分類した二次元ヒストグラムを作成した (図2)。さらに無相関バックグラウンドを差し引き、以降の解析に用いた。

【測定例】試料として、相補的な配列をもつ2種類の一本鎖DNAオリゴマーに FRET 対をなす蛍光色素 (ドナー: 6-FAM、アクセプター: TAMRA) を片方ずつ標識し、2:1の濃度比で混合したものを用いた。図2a-dは $\Delta T=10-500 \mu s$ での二次元相関マップである。482nm 励起時のドナー蛍光光子の遅延時間分布は対をなす蛍光光子の種類ごとに変化しており (図3)、アクセプター励起光を導入した効果が見られる。講演ではこのデータの詳細な解析について述べる。

【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] 乙須・石井・小井川・新井・高橋・田原、第8回分子科学討論会 3A13 (2014). [4] Cheng・石井・田原、第8回分子科学討論会 3A14 (2014). [5] J. Hendrix and D. C. Lamb, *Methods Enzymol.* **518**, 205 (2013). [6] L. Olofsson and E. Margeat, *Opt. Express* **21**, 3370 (2013). [7] 石井・Cheng・田原、第7回分子科学討論会 2D20 (2013).

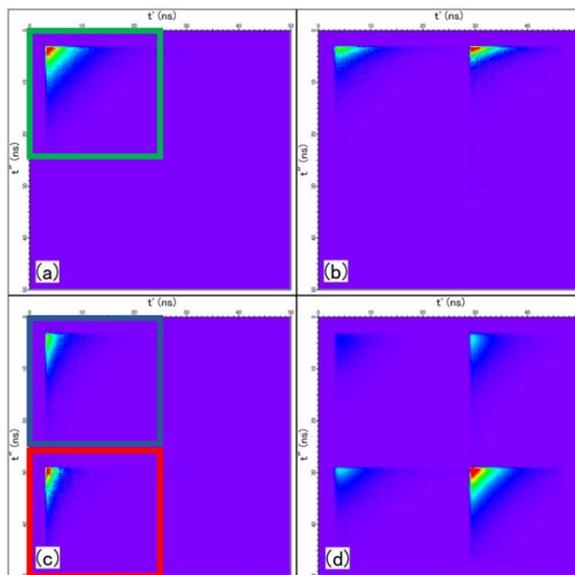


図2 二次元光子相関マップ。各パネルに2つの検出波長での自己/相互相関を示す ((a) D-D, (b) A-D, (c) D-A, (d) A-A)。各パネルの左(上)側が482nm 励起時(prompt)、右(下)側が563nm 励起時(delayed)の蛍光信号を表す。

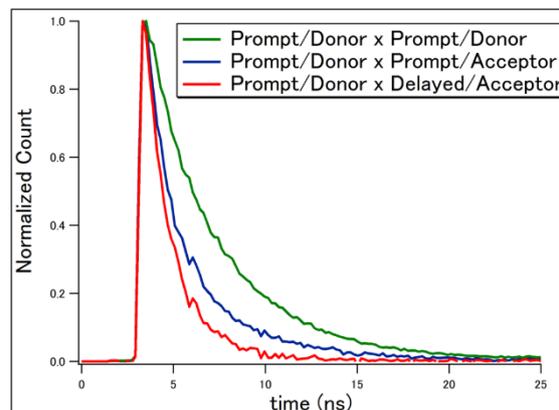


図3 図2に示した3つの領域を縦に積分して得たドナー蛍光の遅延時間分布。