

3F09

新規蛍光相関分光法に基づく生体膜中分子の拡散計測に向けた 観測サイズ補正法の開発

(埼玉大院理工) ○乙須拓洋, 山口祥一

Calibration of the observation area for the accurate diffusion analysis on lipid membranes by novel fluorescence correlation spectroscopy

(Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.) ○Takuhiro Otsu and Shoichi Yamaguchi

【序】生体膜はリン脂質からなる脂質二重膜中に膜蛋白質やコレステロールといった様々な分子が埋め込まれた非常に複雑な二次元膜である。さらに生体膜は蛋白質繊維によって形成された網目構造(細胞骨格)によって下支えされているため、溶液中とは異なり空間的に非常に不均一な場となっている。そのように不均一な生体膜中を拡散する分子の見かけの拡散係数は、計測を行う空間分解能に依存することが過去の報告により示唆されている¹。拡散係数の空間分解能依存性は、生体膜の構造特性(網目構造の大きさ等)を理解するための重要な情報を提供することから、異なる空間分解能での拡散係数の計測が強く求められている。その点に関して我々は最近、生体膜中分子の拡散係数を計測するための新たな手法として、エバネッセント波の干渉により発生する定在エバネッセント波を励起光として用いる蛍光相関分光法(SEW-FCS)の開発を行った。本手法の利点は定在エバネッセント波励起を行うことで干渉縞一本の幅(w_{fringe})と観測領域全体の幅(w_{whole})に対応する二つの空間分解能で拡散係数の同時計測が可能な点にある。しかしながら、 w_{fringe} は励起光の入射角より容易に決定できる一方で w_{whole} は様々な要因に影響を受けるため、正確な拡散係数の算出には w_{whole} に対する補正が必要となる。そこで本研究では測定で得られる自己相関関数を参照することによる観測サイズ補正法の開発を行った。

【実験】試料にはガラス基板上に作製した平面脂質二重膜である支持脂質二重膜を用いた。本研究では拡散係数が空間分解能に依存しないと報告されている DOPC 支持脂質二重膜を用い、蛍光脂質を少量加えることで拡散係数の計測を行った²。装置の概略図を図 1 に示す。532 nm の励起光をビームスプリッターで均等に二つに分けたのち、対物レンズの辺縁部にそれぞれ入射した。対物レンズから出た二つの励起光はカバーガラス表面の同位置で全反射するため、エバネッセント波は干渉し定在エバネッセント波が発生する。試料から発せられる蛍光は同対物レンズで収集したのちアバランシェフォトダイオード (SPAD) で検出し、検出された各蛍光光子の到着時間をもとに自己相関関数を算出した。

定在波励起により得られる自己相関関数の理論式は既に報告されている³。本研究では理論式を改良した以下の式を用いてフィッティングを行った。

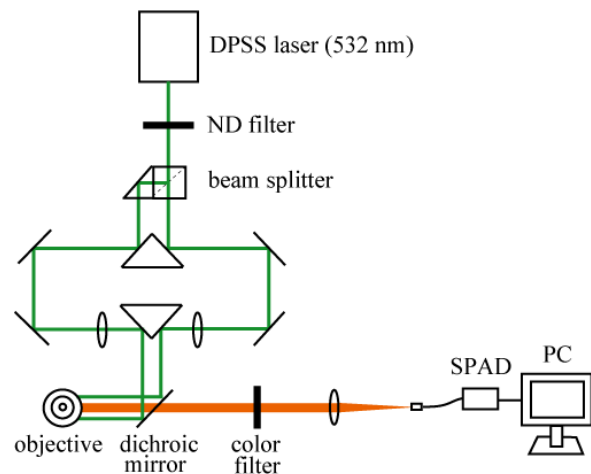


図 1 : SEW-FCS 装置の概略図

$$G(\Delta T) = A + \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + \Delta T / \tau_{D1}} \right) \left\{ 0.5\alpha \exp\left(-\Delta T / \tau_{D2}\right) + 1 \right\}, \quad \tau_{D1} = w_{\text{whole}}^2 / 4D_1, \quad \tau_{D2} = w_{\text{fringe}}^2 / 4D_2.$$

式中 N は観測領域内の平均分子数, τ_{D1}, τ_{D2} はそれぞれ観測領域または干渉縞一本を通過するためにかかる時間(拡散時間)であり, それぞれの空間分解能から見かけの拡散係数(D_1, D_2)を算出することができる. α は干渉縞のコントラストによって決定される係数であり, 測定点における両エバネッセント波の強度が等しければコントラスト最大で $\alpha=1$ となり, 強度差があれば $\alpha < 1$ となる.

【結果と考察】測定対象である脂質二重膜は厚さが ~ 5 nm の平面膜であるため, w_{whole} は深さ方向のずれに非常に敏感であることが予想される. そこで, 深さ方向(z 方向)のずれが測定結果に与える影響について検討すべく, z を変えながら自己相関関数の測定を行った. 図 2 には異なる z で得られた自己相関関数を示している. 相関振幅が最大(N が最小)となった点を $z=0$ とした. 焦点面と試料面が一致しているとき($z=0$)は τ_{D1}, τ_{D2} に対応する二つの相関減衰がはっきりと確認できる一方で, 試料面からのずれに従って α に対応する干渉縞由来 (τ_{D2} 成分)の相関振幅が減少していく様子が確認された. 図 3 には自己相関関数のフィッティングにより得られた結果を示している. 予想された通り z が試料面からずれるに従い (w_{whole} が大きくなるに従い) τ_{D1}, N は大きくなった. また, 図 2 に見られたように α は z に依存することが確認された. この α の z 依存性は, 試料面(\approx ガラス表面)からのずれに応じて二つのエバネッセント波の重なりがずれることにより, 干渉縞のコントラストが低下したことに起因していると考えられる.

本測定に用いた試料には先述のように拡散係数の空間分解能依存性はない($D_1 = D_2$)ので, w_{fringe} と τ_{D2} から算出される D_2 と τ_{D1} をもとにして w_{whole} (の z 依存性)を見積もることが可能となる. しかしながら, 拡散係数の空間分解能依存性が期待される別の試料に対して, すでに見積もられた w_{whole} を用いて解析を行うためには, 再び図 3 に対応するデータを取得して z の原点を決定するという冗長な作業が必要となる. そこで本研究では α の z 依存性に着目し, α を参照することによる迅速で簡便な観測サイズ補正法について報告を行う.

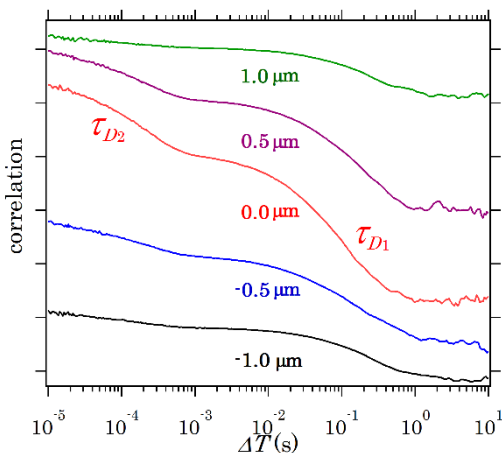


図 2 : 異なる z での自己相関関数

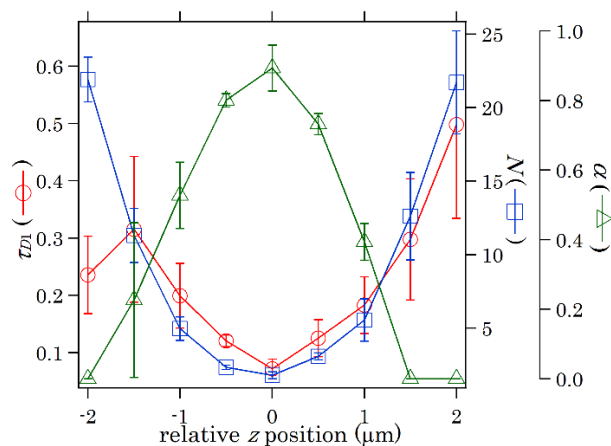


図 3 : τ_{D1}, N, α の z 依存性

【参考文献】

1. Wawrezynieck et al., (2005) *Biophys. J.*, **89**, 4029-4042.
2. Vicidomini et al., (2015) *Nano Lett.*, **15**, 5912-5918.
3. H. Asai, and T. Ando (1976) *J. Phys. Soc. Japan*, **40**, 1527.