

全反射顕微鏡を用いた蛍光寿命相関分光法の開発と生体膜研究への応用

埼玉大院理工

○乙須拓洋, 山口祥一

Development of total internal reflection fluorescence lifetime correlation spectroscopy and its application to the study of biomembrane

○Takuhiro Otsu, Shoichi Yamaguchi

Department of Applied Chemistry, Saitama University, Japan

【Abstract】 Biological membrane is a complex lipid bilayer which is composed of lipids, membrane proteins, cholesterol, and so on. To fully understand the relationship between the complexity of the membrane and various biological functions expressed on the membrane, one needs to analyze the dynamics of multiple molecules simultaneously. To this aim, we developed fluorescence lifetime correlation spectroscopy with total-internal reflection microscopy (TIR-FLCS). High depth resolution achieved by the evanescent-wave and the correlation analysis of fluorescence lifetime in TIR-FLCS enables us to elucidate the diffusion and the conformational dynamics of multiple molecules in/on a supported lipid bilayer (SLB), a model membrane formed on a glass coverslip, without suffering from the substantial background signals from the bulk phase. The usefulness of TIR-FLCS is demonstrated by analyzing the diffusion of fluorescent lipids in inner and outer leaflets of SLB.

【序】 生体膜は様々な組成の脂質や膜蛋白質, コレステロールなどからなる非常に複雑な二次元膜であり, その複雑性により生体膜特有の機能を発現している. それゆえ生体膜機能の真の理解のためには, 生体膜を構成する様々な分子の動きを同時計測し, それらの協動的な挙動について理解する必要がある. この点に関して, 我々は蛍光寿命の違いに基づいて試料内の異なる分子種を検出, 解析する手法として二次元蛍光寿命相関分光法 (2D FLCS) の開発とその応用を行ってきた[1,2]. 本研究ではこれまで主に水溶性生体高分子を対象として応用がなされてきた 2D FLCS を生体膜研究に応用するため, 全反射顕微鏡 (TIR) と 2D FLCS を組み合わせた新たな手法として TIR-FLCS の開発を行った.

【方法】 Fig. 1 には開発を行った装置の概略図を示す. 装置の基本設計は通常的全反射顕微鏡と同様だが, 蛍光寿命の相関解析を行うためパルスレーザーと単一光子検出器を導入している. パルスレーザーにはピコ秒ダイオードレーザー (510 nm, 50 MHz) を使い, 検出されるすべての蛍光光子に対して, 実験開始からの検出時間であるマクロタイム(T)と励起パルスから蛍光光子検出までの発光遅延時間であるミクロタイム(t)を記録した. 解析では得られた光子データをもとに異なる ΔT での二次元発光遅延時間マップを作成し, global 2D MEM 解析を行うことで独立蛍光寿命成分の抽出を行った[1]. その後得られた独立蛍光寿命成分から各成分の蛍光減衰カーブを算出し, それらを FLCS 解析に適用することで各成分の相関カーブを抽出した[3] (Fig. 2).

【結果・考察】 Feasibility Study として, 蛍

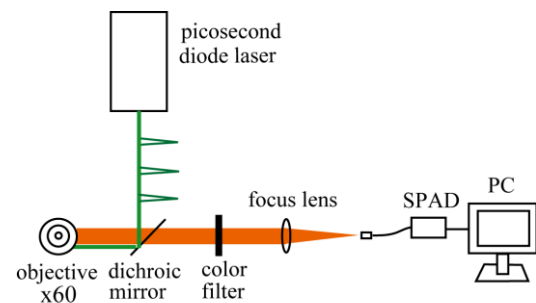


Fig.1. TIR-FLCS instrument

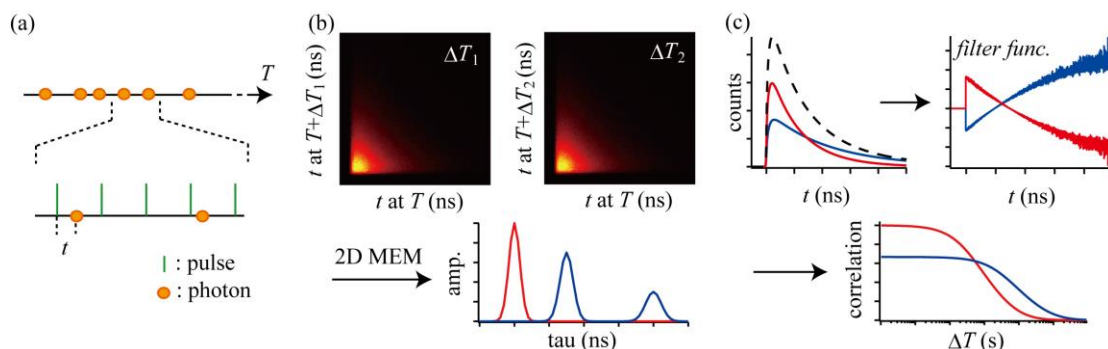


Fig.2. (a) Schematic of photon data. (b) 2D FLCS. (c) FLCS.

光寿命の異なる2つの蛍光脂質 (TRITC-DHPE, TopFluor PC) を含む支持脂質二重膜 (SLB) をガラス基板上に作製し、2成分の検出ならびに各相関カーブの抽出を試みた。まず得られた光子データに対し 2D FLCS により独立蛍光寿命成分を抽出した。結果を Fig.3a に示すが、解析の結果2成分が検出された。そこでこれらの成分について帰属を行うべく、ラプラス変換を行うことで蛍光減衰カーブを算出し、各蛍光脂質単独で別途測定した蛍光減衰カーブと比較を行った。その結果、短寿命成分である comp1 は TRITC-DHPE、長寿命成分である comp2 は TopFluor PC のデータと良好な一致を示した (Fig. 3b)。この結果は、2D FLCS により膜中に含まれる2つの分子種の蛍光寿命を正確に解析できることを示す結果となった。

次に各成分の蛍光相関カーブを抽出すべく、2D FLCS で得られた蛍光減衰カーブを用いてフィルター関数を算出し、FLCS により各蛍光脂質の蛍光相関カーブの解析を行った。得られた結果を Fig. 3c に示す。図に示すように、両成分の拡散時間はほぼ同じ値を示した。またこれらの拡散時間は各蛍光脂質単独で得られた拡散時間と良好な一致を示した。さらにこれら2成分の相互相関を算出した結果、相互相関は解析を行った全 ΔT 領域にわたり ~ 1 であった。この事は TRITC-DHPE と TopFluor PC がお互い独立な分子種であることと整合している。以上より、今回開発を行った TIR-FLCS は SLB 中の複数の分子種由来の信号から、各成分の蛍光寿命ならびに蛍光相関カーブを正確に抽出できる事が示された。

発表では本手法を用いて SLB を構成する2つの単脂質膜 (inner leaflet (ガラス基板側), outer leaflet (バルク側))中での脂質の拡散を測定した結果について議論を行う。

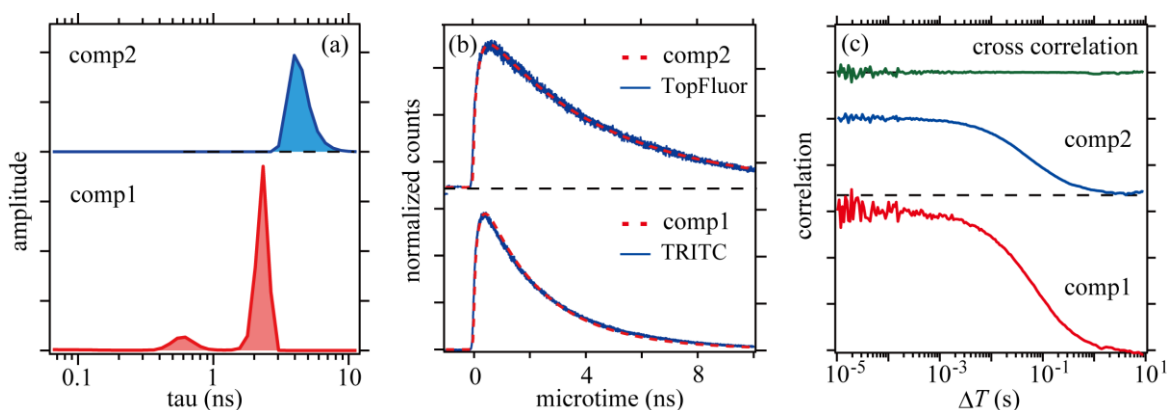


Fig.3. (a) Independent lifetime distributions. (b) Fluorescence decay curves of comp1 (red, lower) and comp2 (red, upper) as well as those of TRITC-DHPE (blue, lower) and TopFluor PC (blue, upper). (c) Autocorrelations of comp1 (red) and comp2 (blue), and the cross-correlation between these components (green).

【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**, 7695 (2015).
- [3] P. Kapusta, M. Wahl, A. Benda, and J. Enderlein, *J. Fluoresc.*, **17**, 43 (2007).