

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：  
最大エントロピー法による多成分解析

<sup>1</sup>理研・田原分子分光, <sup>2</sup>理研・光量子工学領域

Bidyut Sarkar<sup>1</sup>, ○石井邦彦<sup>1,2</sup>, 田原太平<sup>1,2</sup>

**Two-dimensional Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy with  
Pulsed Interleaved Excitation:  
Multicomponent Analysis by Maximum Entropy Method**

Bidyut Sarkar<sup>1</sup>, ○Kunihiko Ishii<sup>1,2</sup>, Tahei Tahara<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN, Japan*

<sup>2</sup>*RIKEN Center for Advanced Photonics, RIKEN, Japan*

**【Abstract】** Two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy (2D FLCS) can resolve conformational inhomogeneity of biopolymers utilizing fluorescence lifetime measurement of FRET-labeled molecules and enables us to examine conformational transitions with a microsecond time resolution. We have recently reported a new method that incorporates pulsed interleaved excitation (PIE), in which the donor and acceptor dyes are excited alternately, for improving the accuracy of 2D FLCS. In the present work, we introduce the maximum entropy method for analyzing photon data obtained with PIE 2D FLCS in order to establish a protocol for separation of contributions of co-existing species in the sample and for determination of the dye stoichiometry, donor fluorescence lifetime, and FRET efficiency for each species. The result of this new analysis on experimental and simulated photon data will be presented.

**【序】** 二次元蛍光寿命相関分光法 (2D-FLCS) は、構造不均一性を示す生体高分子の構造分布を蛍光寿命を指標として分離し、各構造間の遷移をマイクロ秒の時間分解能で調べることができる手法である[1-3]. 2D-FLCS では通常、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した測定を行うために FRET のドナー・アクセプターとなる二つの蛍光色素を測定対象分子に標識し、そのうちドナーの蛍光を計測してその蛍光寿命から FRET 効率を求める. ドナー蛍光寿命のみで FRET 効率の議論を行うこの方法では、信頼できる構造の帰属を行うことが困難な場合があった. 最近我々は、この問題を解決して 2D-FLCS による計測の信頼性を改善するため、FRET のドナー・アクセプターとなる蛍光色素を交互に直接光励起するパルス交替励起 (PIE) 方式の 2D-FLCS 装置を製作し、昨年 of 討論会で報告した[4]. 本装置を用いて得られた光子データを用いて、系に存在する分子種を分離して各々について色素標識の有無・ドナー蛍光寿命・FRET 効率を決定できるようにするため、今回最大エントロピー法 (MEM) を応用した解析方法を導入した. 本講演では、実験とシミュレーションにより得た光子データを用いて、本解析法の信頼性を検討した結果を報告する.

**【方法 (実験・理論)】** PIE-2D-FLCS 実験は昨年報告した装置[4]を用いて行った. 検出された各光子を①励起波長 (ドナー励起="d"/アクセプター励起="a"), ②検出波長 (ドナー蛍光="D"/アクセプター蛍光="A"), および③励起パルスからの遅延時間  $t$  (ドナー励起・ドナー蛍光 (dD) の場合のみ), の三つの属性を用いて分類した.

次に、全光子データを探索してある時間 $\Delta T$ の間隔で検出された二つの光子のペアを集め、各光子の属性に従ってこれらを分類した Fig.1 のような二次元ヒストグラムを構築した。この二次元マップを独立な成分の寄与に分解するため、各成分の dD 領域の蛍光寿命分布、dA, aA の蛍光強度をパラメータとして MEM を用いたフィッティング[2]を行った。試料としてはヘアピン構造を取る DNA[2] および相補的な配列をもつ二つの一本鎖 DNA オリゴマーの混合物[4]を用いた。またこれらとは別に、PIE-2D-FLCS 実験に対応する光子データを動的モンテカルロシミュレーション[1]により人工的に発生させ、同様の解析を行った。

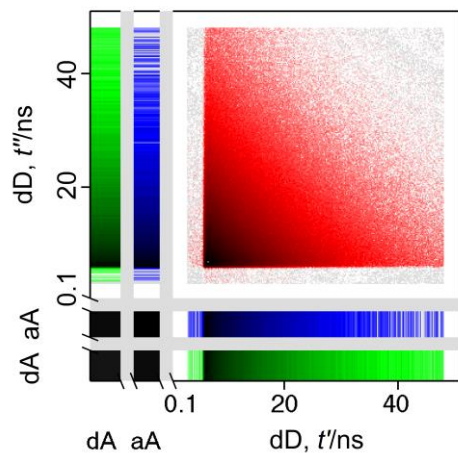


Fig. 1. Example of 2D correlation map obtained with PIE 2D FLCS.

【結果・考察】例として、ヘアピン DNA の実験データの解析結果を Fig.2 に示す。本解析法により 4 つの独立成分が求められた。各成分は dD の蛍光寿命分布、dA, aA の蛍光強度で特徴づけられ、そのパターンからアクセプターのみ持つ分子、ドナーのみ持つ分子、および両者とも持つ分子のうちヘアピン構造が解離した状態とヘアピン構造を取った状態、に帰属された。 $\Delta T$  の増加に伴うクロスピークの立ち上がりから、後二者が 100  $\mu$ s 程度で相互変換することが確認された。これらは従来法による結果[2]とよく対応しているが、本解析法により初めてドナーのみ・アクセプターのみ持つ分子の帰属を明確に行うことが可能となった。他の実験・シミュレーションデータの解析結果および本解析法の適用範囲については、当日ポスター発表にて議論する。

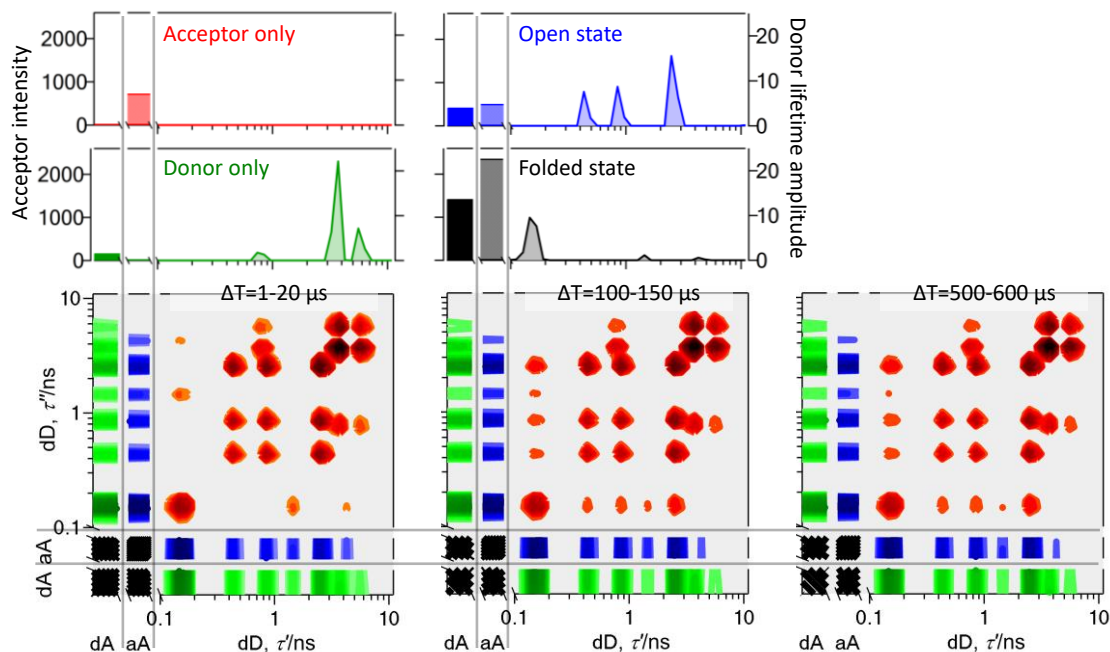


Fig. 2. Results of the MEM analysis on experimentally obtained data of the hairpin DNA.

### 【参考文献】

- [1] K. Ishii and T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* **117**, 11414-11422 (2013).
- [2] K. Ishii and T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* **117**, 11423-11432 (2013).
- [3] T. Otosu, K. Ishii, and T. Tahara, *Nat. Commun.* **6**, 7685 (2015).
- [4] 石井, 水野, 坂口, Sarkar, 田原, 第10回分子科学討論会, 2F04(2016).