

走査型二次元蛍光寿命相関分光法の開発と ヘアピンDNAの構造ダイナミクスへの応用

¹埼玉大院理工, ²理研・田原分子分光, ³理研・光量子工学領域
○長谷川一途^{1,2}, Vaidya Rohit², 石井邦彦^{2,3}, 田原太平^{2,3}

Development of scanning 2D FLCS and application to structural dynamics of hairpin DNA

○Kazuto Hasegawa^{1,2}, Vaidya Rohit², Kunihiko Ishii^{2,3}, Tahei Tahara^{2,3}

¹ Department of Chemistry, Saitama University, Japan

² Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN, Japan

³ RIKEN Center for Advanced Photonics, Japan

【Abstract】 Two Dimensional Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy(2D FLCS) is a new method of single-molecule measurements, which enables us to observe structural dynamics of biomolecules in the microsecond time region. In 2D FLCS, however, the observation time window has been limited to several milliseconds because of the translational diffusion of the molecules. In this work, we attempted to extend the observation time window of 2D FLCS by immobilizing the sample molecules on a glass substrate. We name this new method scanning 2D FLCS because the sample stage is scanned continuously for preventing photobleaching. It was confirmed that the observation time window can be extended to hundreds of milliseconds by this approach. We applied this method to structural dynamics of hairpin DNA and observed the interconversion between the closed form and the open form in the micro- to millisecond time region. It is anticipated that the scanning 2D FLCS will become a powerful tool to elucidate temporally hierarchical dynamics of biomolecules.

【序】 生体機能の発現機構の解明には生体分子の静的な構造を知るだけでなく、その構造が時間変化する様子を捉えることが重要である。近年、生体分子の自発的な構造変化を観測するための手法として一分子計測法が発展している。当研究グループでは、従来の一分子計測法では観測することが困難であったマイクロ秒からミリ秒スケールの速い構造ダイナミクスを捉えることができる新規の一分子計測法として二次元蛍光寿命相関分光法(2D-FLCS)を開発した[1]。しかしながら、2D-FLCS 測定では溶液中の拡散運動のために観測分子がレーザー照射領域内に留まる時間が限られているため、数ミリ秒より遅いダイナミクスを観測することは不可能であった。本研究では基板に固定した分子に対して 2D-FLCS 計測を行うことで、マイクロ秒から数百ミリ秒の幅広い時間領域における構造ダイナミクスを観測可能にする新しい方法、走査型二次元蛍光寿命相関分光法(Scanning 2D-FLCS)を開発した。これを FRET 対を標識した一本鎖ヘアピン DNA のダイナミクス計測に適用した結果と合わせて報告する。

【方法 (実験・理論)】 高繰り返しパルス光源(Fianium sc-400-4)及び時間相関光子計数装置(Becker&Hickl SPC-130 EM)を用いた従来の 2D-FLCS 測定装置に加え、顕微鏡の試料部にピエゾステージ(ナノコントロール B16-055)を設置した。試料を固定した基板を 1 $\mu\text{m/s}$ の速度で走査しながら計測を行うことで、蛍光色素の褪色を防ぎつつ観測時間の延長を可能にした[2]。走査中の焦点ずれを防ぐためにパーフェクトフォーカスシステムを搭載した倒立顕微鏡 (ニコン Ti-E)を用いたフィードバック制御を行った。

測定対象としてヘアピン構造をとった状態 (Closed)と解離した状態(Open)が室温下で平衡となるような塩基配列をもつ一本鎖 DNA を使用した(Fig.1). AF488 及び AF594 をそれぞれ FRET のドナー, アクセプターとし, 基板固定化用のビオチンを標識した DNA(日本バイオサービス)を用いた. 試料の非特異的な吸着を防ぐために, カバーガラス基板をポリエチレングリコール(PEG)で被覆した. PEG

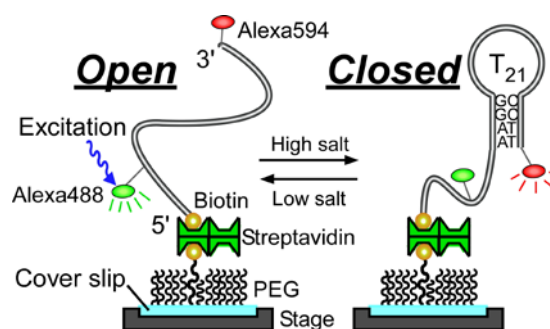


Fig. 1. Schematic illustration of immobilized hairpin DNA on glass substrate.

の一部はビオチン化されたものを用い, ここにビオチン-アビジン相互作用を介して DNA 試料を固定し測定を行った.

【結果・考察】 Fig.2(a)にドナー蛍光の自己相関関数を示す. 溶液系(緑線)においては数ミリ秒以内に相関が消失している一方で, 固定系(赤線)では数百ミリ秒まで相関が残っており, 本手法で観測時間領域を延長できることが確認された[2]. ステージ走査による信号に加え, 数マイクロ~1 ミリ秒付近の速い時間領域にヘアピン形成・解離によるドナー蛍光強度の揺らぎを反映していると考えられる反応成分(黒点線,速度定数 $k=1.16 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$)が観測された. 2D-FLCS による二次元解析から, ダイナミクスに関してより詳しく検討した. Fig.2(b)に示した二次元蛍光寿命マップは任意の時間間隔 ΔT で検出された光子対の相関を蛍光寿命の違いから区別したものである. 対角線のピークが蛍光寿命の異なるそれぞれの成分の自己相関に対応する. クロスピークは相互相関を表しており, クロスピークの出現は指定した ΔT 領域においてそれらの成分間の交換が起きていることを示している. FRET 効率の高い Closed 状態は FRET 効率の低い Open 状態に比べて蛍光寿命が短いと考えられ, $\Delta T=50 \mu\text{s}$ においてすでに交換が起きている成分は Open であり (赤点線), それらと交換が起きているさらに蛍光寿命の短い成分を Closed であると帰属した (青点線). 4 ns 付近の最も蛍光寿命の長い成分(緑点線)は, $\Delta T=100 \text{ ms}$ においても他の成分との交換が見られないことから, アクセプターが機能していないものであると帰属した. $\Delta T=100 \text{ ms}$ において Open-Closed 間の交換に対応するクロスピーク(青矢印)が観測され, 従来の溶液系条件下では観測不可能であった幅広い ΔT におけるヘアピン DNA のダイナミクスに関する知見を得ることに成功した. 今後は Scanning 2D-FLCS の応用範囲を広げ, 階層的なダイナミクスを有する複雑な生体高分子に対して適用していきたいと考えている.

【参考文献】

- [1] K. Ishii and T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* **117**, 11414-11422; 11423-11432 (2013).
 [2] H. Bi, Y. Yin, B. Pan, G. Li, X. Zhao *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 1865-1871 (2016).

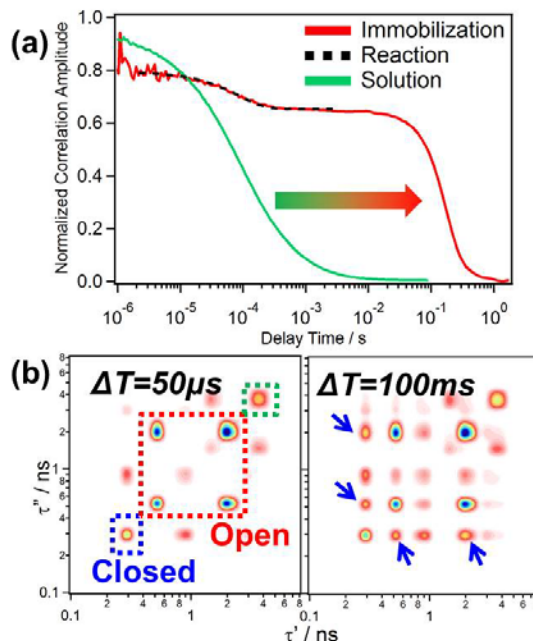


Fig. 2. Analysis of photon data. (a)Auto correlation of donor fluorescence. (b) ΔT dependence of two-dimensional fluorescence lifetime correlation map obtained by 2D FLCS($\Delta T=50 \mu\text{s}$, $\Delta T=100 \text{ ms}$).