

## 二次元蛍光寿命相関分光法による支持脂質二重膜中脂質の拡散特性に関する研究

埼玉大院理工

○乙須拓洋, 山口祥一

### Diffusion property of lipids in a supported lipid bilayer studied by two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy

○Takuhiro Otsu, Shoichi Yamaguchi

Department of Applied Chemistry, Saitama University, Japan

**【Abstract】** To fully understand the various biological functions expressed on biological lipid membranes, one needs to understand the dynamical properties of lipids on lipid membranes. In this regard, we have developed fluorescence lifetime correlation spectroscopy with total-internal reflection microscopy (TIR 2D-FLCS) and applied it to measure the diffusion of lipids in each leaflet of a supported lipid bilayer (SLB). The results presented in the last conference have shown that the diffusion property of lipids in each leaflet can be quantitatively analyzed by TIR 2D-FLCS. In this study, we performed TIR 2D-FLCS to analyze the effect of solution pH on the diffusion properties of lipids in each leaflet of SLB deposited on a glass coverslip. The results showed that the interaction between a glass and lipids in the proximal leaflet becomes stronger with decreasing pH. On the other hand, the diffusion property of lipids in the distal leaflet was not strongly affected by the change in pH. We believe that the results in this study give the fundamental insight into the interleaflet coupling (friction) of a lipid bilayer.

**【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など機能分子が埋め込まれた複雑な二次元膜である。この生体膜が示す多彩な機能の真の理解には、生体膜を構成する脂質二重膜の物性に関する基礎的な知見が重要となってくる。この点に関して、我々は全内部反射二次元蛍光寿命相関分光法 (TIR 2D-FLCS) をモデル生体膜である支持脂質二重膜の物性研究に適用することで、脂質二重膜を構成する二つの脂質単層膜それぞれにおける脂質の拡散計測に成功し、昨年の本討論会で発表を行った[1-3]。今回は得られた結果のさらなる考察のため、脂質二重膜を取り囲む溶液の pH を変えて同様の計測を行い、pH が支持脂質二重膜を構成する各単層膜中脂質の拡散に与える影響について検討を行った。

**【方法】** Fig. 1 には測定に使用した試料のイメージ図を示している。本研究では、双性イオンを親水基に有する DOPC を用いてカバーガラス上に支持脂質二重膜を作製し、その後二重膜上層のバルク層に蛍光消光剤として知られているヨウ化カリウム(KI)を 50 mM になるように加えた。ヨウ化カリウムは脂質二重膜不透過であることが知られており、バルク層に親水基を向けている単層膜(distal leaflet)中蛍光脂質のみが消光作用を受けることが予想される。これによりガラス基板側の単層膜(proximal

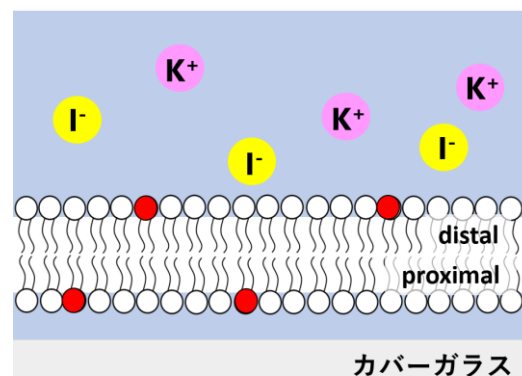


Fig.1. Sample image

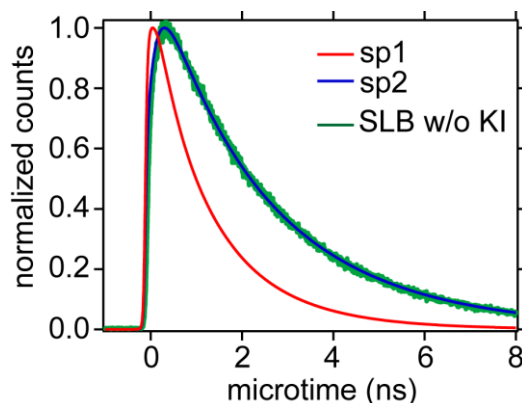
leaflet)中蛍光脂質との間に蛍光寿命の差が生じる. TIR 2D-FLCS ではこの蛍光寿命の違いを検出, 解析することにより, 各単層膜中脂質の相関関数を抽出する.

解析の詳細は省略するが, 測定された蛍光光子データをもとに二次元発光遅延時間相関マップを作成, 逆ラプラス変換により独立蛍光寿命成分の蛍光減衰カーブを抽出した. 次に各独立成分の蛍光減衰カーブをもとにFLCS 解析を行う事で, 各独立成分の自己相関関数を得た[2].

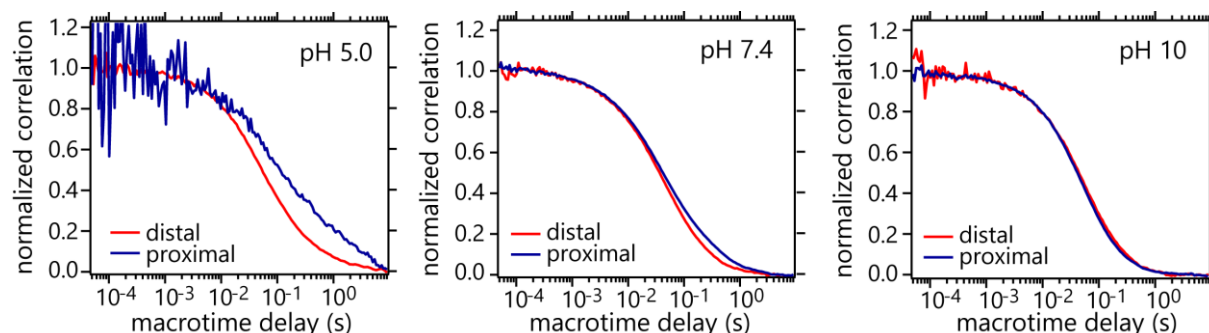
**【結果・考察】** 本研究では溶液の pH が各単層膜中脂質の拡散に与える影響について調べるため, pH 5.0, 7.4, 10 の pH 条件下で支持脂質二重膜を作製, 計測を行った. Fig. 2 には例として pH 7.4 の条件で 2D FLCS 解析を行って得た二つの独立蛍光寿命成分(sp1, sp2)の蛍光減衰カーブを示している. 比較として KI 非存在下で得た蛍光減衰カーブも合わせて示しているが, 二つの独立成分のうち長寿命成分である sp2 は KI 非存在下でのデータと完全に一致した. これはどの pH 条件でも同様であった. この結果より, sp2 は KI と相互作用しない proximal leaflet 中蛍光脂質由来の成分, sp1 は KI の消光作用を受ける distal leaflet 中蛍光脂質由来の成分であると帰属した.

この帰属に基づき, それぞれの蛍光減衰カーブを用いて FLCS 解析を行い, 各単層膜中蛍光脂質の自己相関関数を算出した. 各 pH 条件で得られた結果を Fig. 3 に示す. 結果より, pH 10 においては両 leaflet 中脂質の拡散時間がほぼ一致した一方で, pH が下がるにつれ proximal leaflet 中脂質の拡散が distal leaflet 中脂質と比較して顕著に遅くなる事が確認された. この結果は pH が下がるにつれてカバーガラスと proximal leaflet 中脂質の相互作用が強くなる事, またそれら相互作用が distal leaflet 中脂質の拡散に与える影響はそれほど大きくない事, を強く示唆する. これは単層膜間の疎水性相互作用の強さや, 摩擦力を考える上で重要な知見を与えるものであると考えている.

発表では今回得られた結果がどのような脂質-ガラス間相互作用に起因するのかについて議論を行う.



**Fig.2.** Fluorescence decay curves of the independent lifetime species (sp1, sp2) obtained by 2D FLCS analysis. For comparison, ensemble-averaged decay curve of fluorescent lipids in the absence of KI (SLB w/o KI) is also shown.



**Fig.3.** Fluorescence autocorrelation curves of fluorescent lipids in the distal (red solid line) and proximal (blue solid line) leaflets of a supported DOPC bilayer. Data measured at pH 5.0 (left), 7.4 (center) and 10 (right) are shown.

### 【参考文献】

- [1] K. Ishii and T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* **117**, 11414-11422, 11423-11432 (2013).
- [2] T. Otsu and S. Yamaguchi, *J. Phys. Chem. B* **122**, 5758-5764 (2018).
- [3] 乙須拓洋, 山口祥一 第11回分子科学討論会 1D04 (2017).

## 三次元蛍光相関分光：蛍光分光信号の時間揺らぎの独立成分分析

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

○石井邦彦<sup>1,2</sup>, 坂口美幸<sup>1</sup>, 田原太平<sup>1,2</sup>

## Three-dimensional Fluorescence Correlation Spectroscopy: Independent Component Analysis of Temporal Fluctuation of Fluorescence Signals

○Kunihiko Ishii<sup>1,2</sup>, Miyuki Sakaguchi<sup>1</sup>, Tahei Tahara<sup>1,2</sup>

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

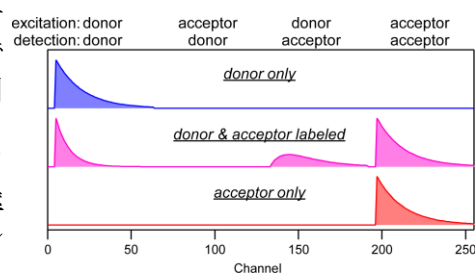
<sup>2</sup>RIKEN Center for Advanced Photonics, Japan

**【Abstract】** When a mixture sample is measured with a spectroscopic method, the sum of contributions from multiple components are observed. Therefore, it is necessary to separate them to determine their amplitudes and individual spectroscopic signatures. Independent component analysis (ICA) is a data processing method used in combination with multichannel signal detection to resolve a mixed signal into independent components by examining the high-order correlations, or non-gaussianity, of the fluctuation of the signal. Previously, we showed that it is possible to analyze fluctuations of time-resolved fluorescence signals obtained under the single-molecule condition by examining third-order correlations to separate independent components [1]. In this work, we have attempted to apply ICA to single-molecule FRET measurements for elucidating conformational heterogeneity of biopolymers. We report on an experimental apparatus to apply ICA to a sample containing multiple species with different FRET efficiencies and/or different dye stoichiometries, as well as the numerical method to analyze the obtained photon data.

**【序】** 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いて生体高分子のコンフォメーションの分布を調べる場合のように、混合物の分光計測を行う実験においては、通常複数の成分の分光信号の和が観測される。そのため得られた計測データに対し、各成分の寄与を分離してその信号形状・強度を個別に決定する必要がある。多チャンネル信号計測で広く用いられる独立成分分析 (ICA) は、信号揺らぎの高次相関成分 (非ガウス性) を通して独立に変動する複数の成分を分離・同定する解析手法である。我々は以前、一分子レベルの濃度条件で観測される時間分解蛍光信号の揺らぎに対して、三次相関を調べることで独立成分を分離できることを示した[1]。今回、この原理を一分子レベルの FRET 計測に適用し、生体高分子の構造不均一性の解明に応用することを試みた。本講演では、ドナー/アクセプター色素の有無や FRET 効率が異なる複数の分子種が含まれる試料に対して ICA を適用するための実験装置と、得られる光子データの解析方法について述べる。

**【方法 (実験・理論)】** 一分子 FRET 実験ではドナー色素とアクセプター色素を数 10 ナノ秒の間隔で交互に励起するパルス交替励起 (PIE) 方式を採用し、時間相関光子計数装置でドナー/アクセプターの各光子の検出時刻を計測した[2]。本装置を用いると、図 1 に示すように色素の有無・FRET 効率の違いによって分子種それぞれが固有のパターンをもって観測される。

濃度を  $10^{-9}$  M 程度に調整した混合試料溶液に対



**Fig. 1.** Fluorescence patterns obtained with the PIE-based single-molecule FRET setup.

して共焦点蛍光顕微鏡を用いて上記の計測を行うと、観測領域に含まれる分子の数が数個程度になるため、ブラウン運動による分子の出入りを反映して蛍光信号が時間的に揺らぐ。図1の横軸のチャンネル毎にこの時間揺らぎを計測してチャンネル間の揺らぎの相関を調べ、独立に変動する成分のパターンを特定するのが本研究の目的である。

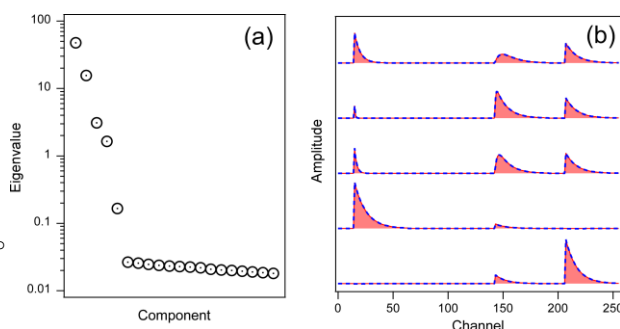
チャンネル間の共分散行列は二次の相関に相当し、これを対角化すれば独立な成分の数が求められる（主成分分析（PCA））。しかし PCA で得られる直交基底は独立成分のパターンに直接対応せず、これに回転行列を掛けたものに相当する。そこで ICA では、三次以上の高次の相関を利用して各成分の非ガウス性を最大化するようにこの回転行列を決定し、独立成分のパターン形状を求める。ICA でよく用いられるのは四次の相関であるが[3]、一分子 FRET 実験では溶液中を自由拡散する分子がポアソン分布的に観測されるため、奇数次の相関が強く現れることが期待される。そこで我々は、より計算量が少なく外れ値に強い三次の相関を利用することとした。

具体的にはまず、一定時間間隔（500  $\mu\text{s}$  程度）ごとに光子データをビンニングし、各ビンに入る光子の二つ組、三つ組を探索する。次に各組に属する光子のチャンネル情報を参照して二次元・三次元のヒストグラムを作る。これをすべてのビンにわたって積算し、二次の行列  $\mathbf{M}$ 、三次のテンソル  $\mathbf{T}$  を構築する。これらの各要素から無相関部分を差し引いた  $\mathbf{M}'_{\text{cor}}$ ,  $\mathbf{T}'_{\text{cor}}$  は独立成分の和で表されるため、 $\mathbf{T}'_{\text{cor}}$  の対角化により各成分を分離・決定することができる[1]。対角化を行う前に、チャンネル間のノイズレベルの違いを平準化するため各チャンネルの総カウント数の平方根でスケールする。得られた  $\mathbf{M}'_{\text{cor}}$  を対角化し、ノイズよりも有意に大きな固有値を持つ成分を見つける。対応する固有値  $\lambda_i$ , 固有ベクトル  $\mathbf{v}_i$  を用いてスケール後の  $\mathbf{T}'_{\text{cor}}$  を

$$\tilde{T}_{ijk} = \sum_{l,m,n} T'_{\text{cor},lmn} \lambda_i^{-\frac{1}{2}} v_{i,l} \lambda_j^{-\frac{1}{2}} v_{j,m} \lambda_k^{-\frac{1}{2}} v_{k,n}$$

のように変換すると、問題は  $\tilde{\mathbf{T}}$  を対角化する直交行列を探すことに帰着される[1]。テンソルの対角化を行うために、Jacobi アルゴリズム[4]を実装したプログラムを作成して用いた。得られた直交行列と  $\lambda_i, \mathbf{v}_i$  を用いて各独立成分のパターンを決定した。

**【結果・考察】** 本手法の有用性を確認するため、動的モンテカルロシミュレーション[1]を用いて人工的に生成した光子データを解析した。シミュレーションでは、FRET 効率が異なる3つの分子種およびドナー・アクセプターの片方のみ標識された分子種の合計5つの成分を仮定した。図2に解析結果を示す。図2aは  $\mathbf{M}'_{\text{cor}}$  の固有値を大きい順に並べたもので、5つの固有成分がノイズレベル以上の値を持っていることが分かる。図2bに示すのはこの5つの成分を用いて  $\tilde{\mathbf{T}}$  の対角化を行った結果得られた独立成分である。独立成分がシミュレーションで仮定した各成分のパターンとよく一致していることから、ICA が一分子 FRET 計測データに適用可能であることが示された。講演では、一分子 FRET 実験データに適用した結果も紹介する。



**Fig. 2.** Results of ICA on synthetic photon data. (a) Eigenvalues of  $\mathbf{M}'_{\text{cor}}$ . (b) Retrieved patterns by ICA (blue broken lines) and those assumed in the simulation (red filled traces).

### 【参考文献】

- [1] 石井, 田原, 第9回分子科学討論会, 4C06 (2015).
- [2] 石井, 水野, 坂口, Sarkar, 田原, 第10回分子科学討論会, 2F04 (2016).
- [3] 村田昇, 「入門独立成分分析」, 東京電機大学出版局 (2004).
- [4] J. Li, K. Usevich, and P. Comon, *SIAM J. Matrix Anal. & Appl.* **39**, 1 (2018).

複雑分子系の挙動に迫る時空間分解振動分光研究：  
細胞からハイブリッド材料まで

関学大院理・理工

○重藤真介

**Time- and Space-Resolved Vibrational Spectroscopic Approaches  
To Elucidate Complex Molecular Systems:  
From Cells to Hybrid Photovoltaic Materials**

○Shinsuke Shigeto

*Department of Chemistry, Graduate School of Science and Technology,  
Kwansei Gakuin University, Japan*

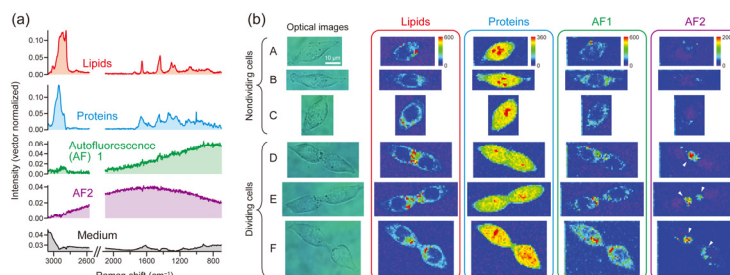
**【Abstract】** In recent years, an increasing amount of research effort in molecular science has gone into elucidation of the characteristics and functions of complex molecular systems such as living cells and energy-related materials. These studies require methods that are capable of looking at molecules with high chemical, space, and time specificities. Space- and time-resolved vibrational spectroscopy meets all of the requirements and is therefore very powerful for a “top-down” approach to complex molecular systems. In this presentation, I will present applications of the space- and time-resolved vibrational spectroscopies that we have developed. The topics to be covered include: space-resolved Raman spectroscopy of living cells that is combined with multivariate data analysis of hyperspectral imaging data and with stable isotope labeling; and time-resolved IR spectroscopy of organic–inorganic hybrid perovskite solar cells. I will also report on present recent progress along this line.

**【序】** 細胞やその集団，太陽電池などのエネルギー関連材料は，多様な分子がさまざまな時間と場所で協働することで精緻な機能を発現する複雑分子系であり，その分子レベルでの解明は分子科学が目指すべき大目標の一つである。このような複雑分子系の挙動を観察し，機能解明への基盤を構築するためのアプローチとして，時間と空間を分解した振動分光法はきわめて有用である。振動分光法は「分子の指紋」といわれる振動スペクトルに基づいているため高い分子特異性を有し，顕微鏡やパルスレーザーを用いることにより空間的に不均一で，ダイナミックに変化する現象を追跡することが可能となる。我々はこれまでに，多変量データ解析や安定同位体標識と組み合わせた顕微ラマン分光法の開発とその生細胞への応用，およびナノ秒時間分解赤外分光法を用いた次世代太陽電池材料における過渡現象の解明に取り組んできた。本講演では，これらの手法の原理といくつかの応用例を概説するとともに，現在展開している最新の研究の成果についても紹介する。

**【MCR-ALS を用いた細胞分裂のラマンハイパースペクトルイメージング】**

細胞のラマンスペクトルはタンパク質やリン脂質，核酸など数多くの生体分子のラマンバンドが重畳した複雑なパターンを示し，それらの寄与を完全に分離するのは困難である。この問題を克服するため，我々は多変量データ解析法の一つである multivariate curve resolution–alternating least-squares (MCR-ALS) を多数の時空間分解ラマンスペクトルからなるラマンハイパースペクトルデータに適用した[1]。この

「MCR-ALS ラマンイメージング」をヒト大腸がん HCT116 細胞に応用し、体細胞分裂中の細胞の分裂溝付近にのみ特異的に観測される、非常に長波長 (~700 nm) の発光極大を持つ自家蛍光性脂質を見出した (図 1 中の AF2) [2]。この成分を内在性プローブとして用いることで、体細胞分裂の新規 *in vivo* 無標識イメージングを開発できると期待される。



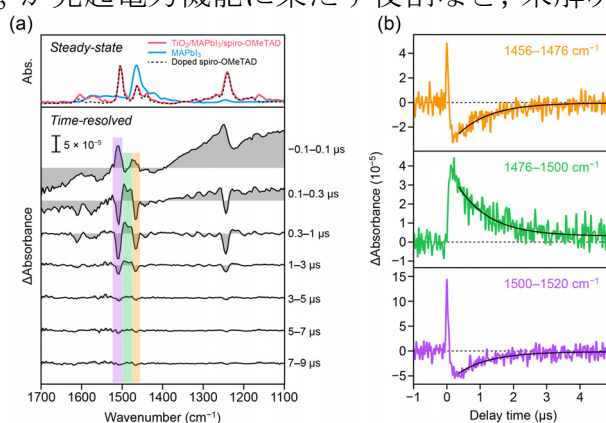
**Fig. 1.** Results of MCR-ALS Raman imaging of human colon cancer cells. (a) Raman spectra of the five components assumed in the MCR-ALS analysis. (b) Optical images of nondividing (A-C) and dividing (D-F) cells and corresponding Raman images of the four primary components of interest.

### 【安定同位体標識ラマン分光イメージングによる生細胞の代謝モニタリング】

ラマン分光法は蛍光法と異なり標識を必要としないのが長所の一つであるが、安定同位体 ( $^{13}\text{C}$  や  $^2\text{H}$ ) 標識と有機的に組み合わせることにより、細胞内で常に進行している代謝過程を非破壊で調べることが可能となる。我々は、通常の  $^{12}\text{C}$ -グルコースを主要炭素源として含む培地で培養した分裂酵母を  $^{13}\text{C}$  で標識したグルコースを含む培地に移した時点から、細胞質および脂肪滴 (lipid droplets) での空間分解ラマンスペクトルが培養時間とともにどのように変化するかを追跡した[3]。その結果、 $^{13}\text{C}$  標識グルコースから新たに合成されたタンパク質が長時間経過後、脂肪滴に局在化する様子を初めて *in vivo* で捉えることができた。これは、脂肪滴とタンパク質の密接な機能的相互作用を裏付ける直接証拠であり、細胞生物学的にも重要な結果である。

### 【ナノ秒時間分解赤外分光法による $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ ペロブスカイト太陽電池の研究】

有機無機ハイブリッドペロブスカイト太陽電池は、溶液プロセスで簡単・安価に作製でき、かつ 20% を超える高いエネルギー変換効率を示すため、近年大きな注目を集めている。ヨウ化鉛メチルアンモニウム  $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$  は有機無機ハイブリッドペロブスカイトのプロトタイプとして盛んに研究されているが、比較的遅い時間スケールで起こる電荷再結合や有機カチオン  $\text{CH}_3\text{NH}_3^+$  が光起電力機能に果たす役割など、未解明な点も多く残されている。我々は、分散型分光器と AC 結合増幅を組み合わせた高感度ナノ秒時間分解赤外分光装置を駆使して、平面ヘテロ接合構造を持つペロブスカイト試料  $\text{TiO}_2/\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3/\text{spiro-OMeTAD}$  を測定し、伝導帯電子のバンド内遷移、ファノ共鳴、*spiro-OMeTAD* カチオンに由来する過渡赤外信号の同時観測に成功した (図 3) [4]。この結果は、時間分解赤外分光法がペロブスカイト太陽電池内に生成する重要な過渡分子種とそれらの相互作用を包括的に理解するための強力な手法であることを示すものである。



**Fig. 2.** (a) Nanosecond time-resolved IR spectra of a  $\text{TiO}_2/\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3/\text{spiro-OMeTAD}$  film and (b) temporal profiles at three characteristic wavenumber regions.

### 【参考文献】

- [1] C.-K. Huang, M. Ando, H. Hamaguchi, and S. Shigeto, *Anal. Chem.* **84**, 5661 (2012).
- [2] J.-F. Hsu, P.-Y. Hsieh, H.-Y. Hsu, and S. Shigeto, *Sci. Rep.* **5**, 17541 (2015).
- [3] H. N. Noothalapati Venkata and S. Shigeto, *Chem. Biol.* **19**, 1373 (2012).
- [4] S. Narra, C.-C. Chung, E. W.-G. Diau, and S. Shigeto, *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 2450 (2016).