

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

¹理研・田原分子分光, ²理研・光量子工学
○石井邦彦^{1,2}, 坂口美幸¹, 田原太平^{1,2}

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

○Kunihiko Ishii^{1,2}, Miyuki Sakaguchi¹, Tahei Tahara^{1,2}
¹ *Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN, Japan*
² *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

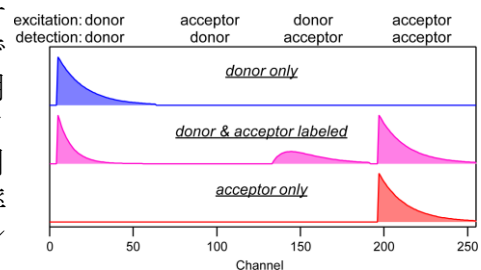


Fig. 1. Fluorescence patterns obtained with the PIE-based single-molecule FRET setup.

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 μs 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}'_{cor} , \mathbf{T}'_{cor} は独立成分の和で表されるため、 \mathbf{T}'_{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}'_{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 λ_i , 固有ベクトル \mathbf{v}_i を用いてスケール後の \mathbf{T}'_{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 λ_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}'_{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。

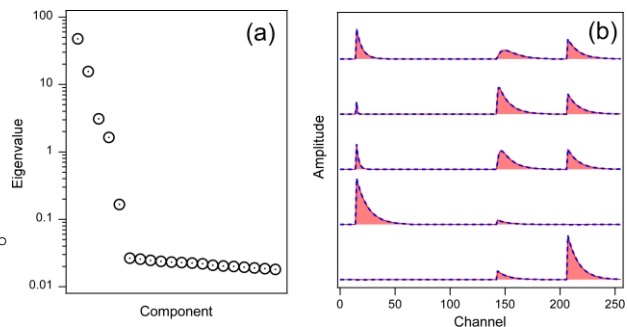


Fig. 2. Results of ICA on synthetic photon data. (a) Eigenvalues of \mathbf{M}'_{cor} . (b) Retrieved patterns by ICA (blue broken lines) and those assumed in the simulation (red filled traces).

【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).