

## 4B14 拡散係数の時空間依存性を直接測定する新しい蛍光相関分光

(理研) 丑田公規, 益田晶子, 岡本隆之

【序】蛍光相関分光 (FCS) 法は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、蛍光分子の数やその拡散係数を求める事のできる分光法で、すでに市販の装置もあるスタンダードな測定法である。FCS 法は生物関係の研究者が、様々な物質の相互作用や化学反応、情報伝達物質の移動状況を把握するために精力的に用いているが、そもそも生体系などの不均一系では、一般的に拡散係数は定数とならず、サンプリング時間、サンプリング空間の形や大きさによって、毎回異なる Observable となる。我々はサンプリング空間を調整する事により、空間の関数として拡散係数を測定する新しい装置を開発して実験を行なったので報告する。

【実験装置】FCS 装置は、オリンパス IX71 を中心に構築した。レーザーの照射領域の大きさを変化させる原理を図 1 に示す。対物レンズの視野口径一杯にレーザービームが広がっていれば、最も小さな照射体積を与え、逆にレーザービームの口径を小さくすると、照射体積は大きくなる。共焦点体積 (Confocal Volume) は、照射体積とピンホール像との重なり (直積) になるので、トータルで共焦点体積が調整することができる。自動ズームレンズを用いたビームエキスパンダを用いているので、連続的に変化することができる。

受光部の共焦点位置に置いた 50,100,200mm 径の光ファイバーでピンホールを代用し、センサーはアバランシェフォトダイオード (EG&G) が、浜松のモジュール型光電子増倍管を用いたフォトンカウンティングモジュールを用いている。フォトンパルスデータは ALV 社製のタウコリレータボードで直接積算し、時間相関関数データをフィッティングして観測値としての拡散係数  $D_{obs}$  を得た。今回の測定範囲では、不均一性による時間相関関数の大きなひずみは観測されず、フィッティング関数は良好な結果を与えた。

【測定試料】測定は、糖鎖化合物ヒアルロン酸 (HA) の水溶液に、色素 (Alexa488) を導入した系で行った。拡散係数として Rhodamine 123 の値が既知であったので、最初にこれを用いて、レーザービーム径に対応した共焦点体積の大きさを見積もった後、測定を行った。

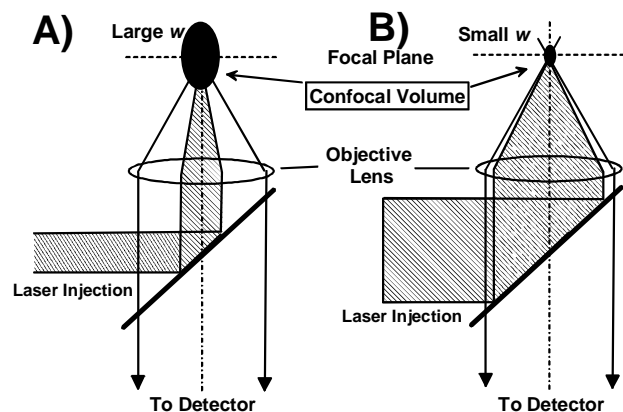


図 1 共焦点体積を変化させる原理図

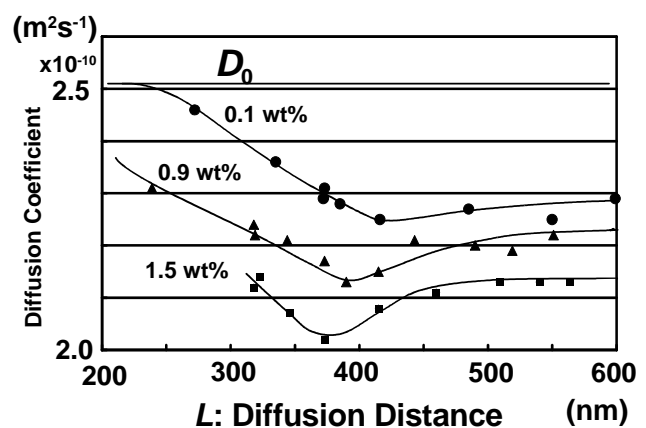


図 2 Alexa488-HA 系で観測される、共焦点体積の半径に対する拡散係数の変化

HAはグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンからなる2糖を単位ユニット(長さ1nm)にした1次元高分子化合物(ポリアニオン)で、細胞外マトリックス(ECM)の構成分子として著名である。直線性がよく、持続長は5-10nmと言われているので、水溶液中では自然に絡み合い、編み目構造を作ると言われている。実際に我々の過去のシトクロームcに対する拡散係数の測定でも、編み目構造の形成を示す結果が得られている。<sup>1</sup>

【結果と考察】図2に、0.1, 0.9, 1.5 wt% HAにおけるAlexa488の拡散距離 $L = 300-700\text{nm}$ における拡散係数を視野半径に対してプロットした。これは、拡散距離に対して拡散係数が連続的に変化する様子を表している。平均編み目の大きさは0.1, 0.9, 1.5 wt%において、それぞれ33 nm, 15nm, 7 nmと考えられるので、視野半径は編み目に対して1-2桁大きな領域をスキャンしている事になる。この領域は、いわゆるパーコレーション理論のAnt in The Labyrinth(迷路の中のアリ)問題<sup>2</sup>に対応して、編み目のフラクタル構造を感じながら徐々に拡散係数が小さくなっていく領域と考えられる。この領域より短い極限では、拡散距離はHAの編み目より極端に小さくなり、拡散係数はHAのない水溶液中の値 $D_0$ に近づく。(短距離拡散モード)一方で、拡散距離の長い極限では、拡散分子はHA水溶液を抵抗を持った連続媒体と感ずるので、この場合も一定の値 $D_{ave}$ に近づく。(長距離拡散モード)この2つの極限領域の近傍では拡散分子の平均2乗変位は時間に線形になり、拡散係数は定数になるので、図2でも拡散係数は定数になるだろう。

しかし図2の測定結果は、 $D_0$ から $D_{ave}$ への連続的な変化を示さず、一旦ターンオーバー(TO)領域が見られる。このTO領域はHA濃度が濃いほど深く顕著である。しかし、TO領域の現れる拡散距離は、0.1, 0.9, 1.5 wt%で420 nm, 400nm, 370nmとあまり変化がなく、HAの編み目の大きさへの依存性が小さい。しかし拡散時間に変換すると、ほぼTO領域の位置は $120\mu\text{s}$ 程度に一致する。このことから、編み目の運動に関係しているものと考えた。

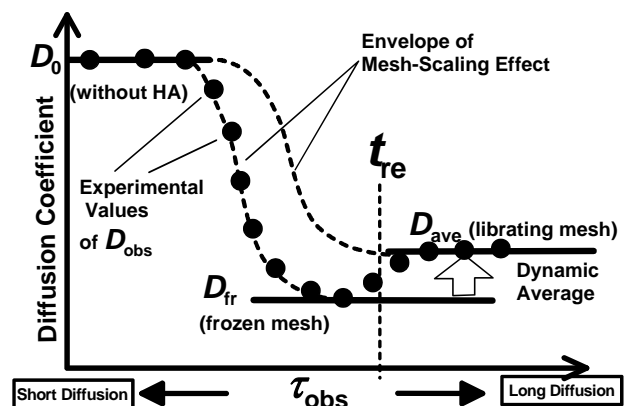


図3 TO領域の現れるメカニズムの説明

図3にそれを模式的に示す。HAの編み目は弱い物理的相互作用により否応なしに作られているもので、ある時間領域( $t_{re}$ )に編み目の再構築の特性時間があるとする。すなわち編み目の寿命と考える。 $t_{re}$ より遅い時間領域では拡散粒子は運動し続ける編み目を平均的に感じながら移動するので、ある拡散係数 $D_{ave}$ を示す運動をする。一方 $t_{re}$ より短い時間領域では、編み目は固定されており、それに対応した拡散係数 $D_{fr}$ を示す。場合によっては不均一な編み目が考えられるが、今回は時間相関関数に著しいひずみが見られなかったので不均一性は小さいものと考えられる。 $D_{fr} < D_{ave}$ となる理由は、高分子鎖の運動によって障害が取り除かれるたびに、粒子の到達可能な体積が大きく増加するものと思われる。

1) Masuda et.al J. Am. Chem. Soc. 123(46), pp 11468-11471 (2001)

2) D.Stauffer, A.Aharony "Introduction to Percolation Theory" (1991) Taylor & Francis