

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20350009

研究課題名（和文） 単一分子計測による生体分子系の平衡点近傍の揺らぎダイナミクスの検出

研究課題名（英文） Study on the fluctuation of biomolecules around the thermal equilibrium point by means of single molecule measurements.

研究代表者

宮坂 博 (MIYASAKA HIROSHI)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授

研究者番号：40182000

研究成果の概要（和文）：

単一分子レベルの計測手法を応用し、従来のパルスレーザー励起とその時間分解測定では観測が困難であった溶液中の平衡点近傍の揺らぎに強く依存した分子ダイナミクス測定法を開発、確立した。この手法を液中における生体、あるいは人工系高分子系のサブナノ秒～ミリ秒ダイナミクス測定に応用し、その手法の有効性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Apparatus that can measure dynamic behaviors of a single molecule in solution phase was constructed by combining an optical microscope, detectors of the fluorescence, and laser light sources. This apparatus was applied to the elucidation of conformational changes of DNA in water in sub nanosecond to millisecond range. The analysis of photon bunching and anti-bunching behaviors of the fluorescence from a moiety connected with DNA led to the conclusion that the faster conformational rearrangement occurring in several hundreds of ns was followed by the slower one with several – several tens  $\mu$ s time region.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：単一分子計測、電子移動、DNA、構造揺らぎ、光子統計

## 1. 研究開始当初の背景

近年、パルス光源を用いた時間分解計測の時間分解能は飛躍的に向上し、アト秒領域の測定も可能となりつつある。測定対象もパルス光源の高性能化(短パルス化)と共に長寿命反応中間体の検出から、電子状態緩和、振動緩和、電子位相緩和などと変化し、化学反応ダイナミクスに関する多くの知見が蓄積されてきた。これらの測定の多くは、一般的に言えばパルスレーザー励起により、時間原点において“非平衡状態”を生成し、その緩和過程を高時間分解計測するもの

であり、平衡点から大きく離れた状態からの集団系の平均の変化を追跡したものといえる。

一方、自然界のダイナミクスには、平衡点近傍での揺らぎが重要な役割を果たしているものも多い。たとえば溶液中の高分子鎖はそのマイクロブラウン運動によって、その形状を時々刻々と変化させる。またタンパク質等の生体分子も、ある程度の構造揺らぎを伴いつつ、機能を発現している。さらに、生物系では平衡点近傍の揺らぎを積極的に利用し、低エネルギーで作動する仕組みを達成していることも指摘されている。

このような平衡点近傍の揺らぎを実時間で観測するためには、いくつかの方法が存在するが、本質的には、小数系を直接観測しその時間変化を解析することによって、集団系(アンサンブル)測定では平均化されてしまう「揺らぎ」を抽出することが最も直接的な方法と考えられる。このような観測手法としては、近年急速に進歩してきている単一分子計測があげられる。単一分子計測では、①各々の分子の置かれているミクロスコピックな環境の違いとそれに起因する各分子の状態、反応性の違い、②従来の集団測定では観測できない個々の分子の揺らぎに関する情報を得ることが可能となる。1990年代初頭に、Bashé, Moerner, Orrit らにより単一分子の蛍光分光計測が報告されて以来、ここ10数年の単一光子計数デバイス及び周辺エレクトロニクスの進歩により、分子分光の一つの究極型であると考えられていた単一分子計測も比較的一般的な計測手法になりつつある。例えば、De Schryver (ベルギー)らは、高分子マトリクス中に固定化された dendrimer 分子において、単分子レベルでの分子内エネルギー移動、 $S_1$ - $S_1$  annihilation 等種々の光化学諸過程を系統的に研究している。Barbara (米国)らは  $\pi$  共役系ポリマーのコンホメーションと電子・分光特性を単分子レベルで詳細に測定し、それらの相関を明らかにしており、van Hulst (オランダ)らは単分子の超高速ダイナミクス測定への試みを近年報告している。

このように、過去十数年で長足の進歩を遂げ、様々な分野に適用されつつある単一分子計測技術であるが、対象とする系としては結晶、高分子或いはガラスマトリクス中に固定化された単分子を測定するのが一般的である。これらの条件で一つ一つの分子に対して蛍光寿命、蛍光スペクトル、光子アンチバンチングなどを測定することが主な研究手法となっており、現在までの単一分子の研究では、主に冒頭に記した2つの特徴のうち、主に①の特徴に重点を置いたものが多く、固体表面の並進拡散の観測などへの応用はあるものの、②の個々の分子の揺らぎを高い時間分解能を持って観測することは、一般的には困難な課題と考えられてきた。

この理由の1つに、色素分子の光劣化がある。単一分子検出のための励起条件では、有機色素は、通常1秒あたり数10万回以上の励起と失活を繰り返す。そのため耐光性の高い分子であっても、一般的には数秒から数10秒以内に光分解するものがほとんどであり、信頼性のあるデータ取得のために必要な長時間の測定を困難としている。また溶液中の分子のブラウン運動の速度は非常に速く、またその不規則性から、量子効率90%程度を有する最新の超高感度 CCD カメラを用いたとしても、一般的な有機溶媒中で分子の動きを3次元的に追跡することは現状では不可能に近い。これらの試料劣化と測定機器の制約から、分子運動が可能な条件における単一分子の揺らぎダイナミクスの測定はな

か困難な課題であった。

一方、タンパクなどの生物系高分子では、分子の特定の部位に2つの色素をラベルしその両色素間での励起エネルギー移動を観測しタンパク質の基質に対する応答などの分子のコンホメーション変化を探る研究もなされている。これらの研究には優れたものも多いが、物理化学的視点、分光学的視点から見て誤った結論がなされている場合もはなはだ多い。これらの測定に対する確固たる実験的手法と解析法を確立することは、今後の物理化学の発展として重要な視点と考えられる。

## 2. 研究の目的

上述の通り、単一分子分光の研究では従来固体中か固体表面に分子を固定化し測定を行ってきた。この方法は単一分子計測に高い検出感度を与え、単一分子の Rabi 振動の観測、光子アンチバンチング、マイクロ環境の時間発展に伴う蛍光分子の電子状態変化、共役系高分子のコンホメーションと共役長・電子状態との相関等多くの新たな知見を与え科学の発展に寄与してきた。しかし先述の通り、分子の光劣化などが原因で、定法では分子運動に基づく揺らぎを長時間に渡り検出することは難しく、解析に値するデータを得ることは甚だ困難である。これらの問題を解決し、単一分子の揺らぎを測定するため、本研究では時間分解能を向上させた蛍光相関分光測定装置を構築し、1つ1つの分子を観測するがデータ全体としては単一分子レベルの測定の積算データとして情報を得る。観測試料としては主として室温溶液中で並進拡散する分子系を対象とする。これにより、光耐性の低い発色団を用いた場合でも、単一分子の揺らぎに関して信頼性の高い情報の取得が可能となる。

また下項に述べるように、検出系として非常に高速で動作可能な時間相関単一光子計数デバイスを用い、かつ測定用プログラムを自作することで、光子相関の実験結果に基づき、回転緩和時間、並進拡散速度、分子構造変化などの過程を蛍光寿命や励起状態寿命の制約無しに検出可能な装置を構築する。

これらの室温における分子運動が可能な状態での、単一分子レベル計測に基づく揺らぎのダイナミクスの測定結果には、従来の固定化された単一分子の計測では得られない情報が含まれており、集団測定結果と単一分子測定結果との比較から、今までのダイナミクス測定法では容易に観測ができなかった科学的に非常に基礎的で重要な問題についても動的な直接的な情報の取得を目指す。

## 3. 研究の方法

初年度は実験系の構築を行った。本研究で構築した光学系の概念図を図1に示す。励起光源として主として連続発振  $Ar^+$  レーザー (波長 488 nm) を用い、蛍光寿命等の測定にはフェムト

Ti:Sapphire 秒レーザー(波長 960 nm、パルス幅 ~70 fs)を用いた。フェムト秒パルスは、非線形結晶により二次高調波を発生させ、また EO 変調器により繰り返し周波数を変化させ用いた。光学顕微鏡にピンホールを設置し共焦点光学系を構築することで、溶液試料の微小体積部(直径 400nm、高さ 2 μm 程度)に存在する分子からの発光のみを選択的に検出した。これにより分子濃度が十分薄ければ観測体積には 1 つ以下の分子が存在する条件を実現可能とした。

検出系に、ガイガー動作のアバランシェフォトダイオード(APD)を2台使用した。単一光子源からの発光では一回の励起に対して高々1つの光子しか放出しない。光子は分割できないため、APD1で発光を観測した場合には、APD2では光子が観測されない。繰り返し周波数  $\nu$  でパルス励起を行った場合には、時刻0では2つのAPDで同時に光子を観測するイベントは0になり、 $1/\nu$ の間隔でのみ光子間の相関が現れる(コインシデンス測定)。観測している発光分子の数に依存して、時刻0と $1/\nu$ の間隔で現れる信号の比は0から1まで変化する。したがってこの計測から視野内に存在する分子の個数を確認することができる。励起光を連続発振光とした場合は、APD1とAPD2で光子が検出された時間に対して相関をとると(光子相関)相関時間ゼロでは相関値が低くなり、蛍光寿命程度の時間幅を持つディップが観測される(光アンチバンチング)。

また、共焦点光学系と共にCCD検出器による

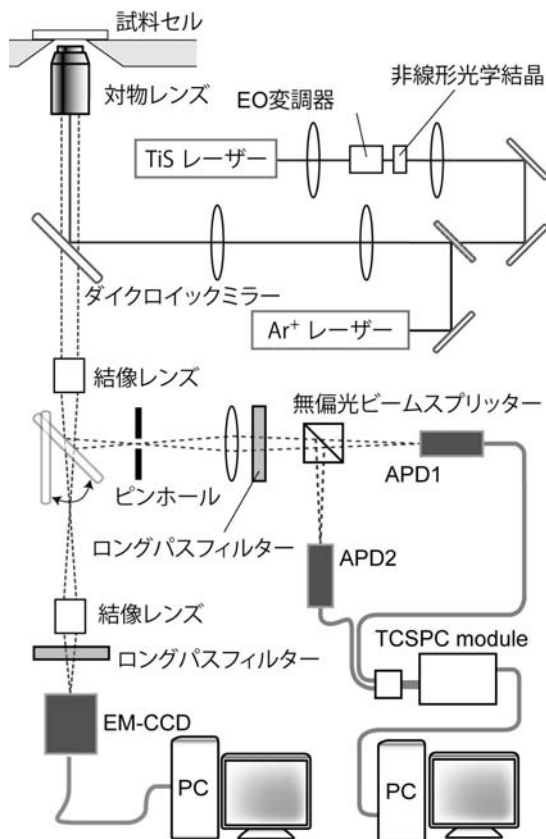


図1 本研究で構築した光学系の概要  
蛍光イメージングも可能な装置構成とし、ゲスト

蛍光分子の比較的遅い動きに関しては直接イメージングも可能な装置とした。

試料として、図2で示す一本鎖 DNA 群(G0 ~ G4)を用いた。これらの DNA にはフルオレセインをリンカーを介して修飾した。フルオレセインは DNA 中のグアニン塩基により電子移動消光されることが過去の研究より分かっており、溶液中での DNA のコンホメーション変化によりフルオレセインとグアニン塩基との距離が近づくと蛍光消光が起こる。その効果を系統的に調べるため、DNA のシーケンスを変化させ、フルオレセインとグアニン塩基の相対位置を種々変化させた試料を準備した。この DNA のバッファー溶液濃度を共焦点体積中で平均1個以下となるように調製し測定に用いた。

#### 4. 研究成果

まず1本鎖 DNA、G0~G4 に結合したフルオレセインの蛍光減衰挙動を時間相関単一光子計数(TCSPC)法を用い集団系で測定した。その結果を表1に示す。消光作用を示すグアニン塩基を持たない G0 では、その蛍光減衰挙動はフルオレセインと同じく単一指数関数的減衰であった。一方、グアニン塩基を持つ DNA、G1~G4 では、その蛍光減衰曲線は2成分の指数関数で再現され、G0 には見られなかった早い減衰成分が観測されたことより、グアニンによる消光が確認された。また早い蛍光減衰の成分比は DNA シーケンスにおけるグアニン塩基の位置、即ちフルオレセインとグアニンとの相対位置に依存した。

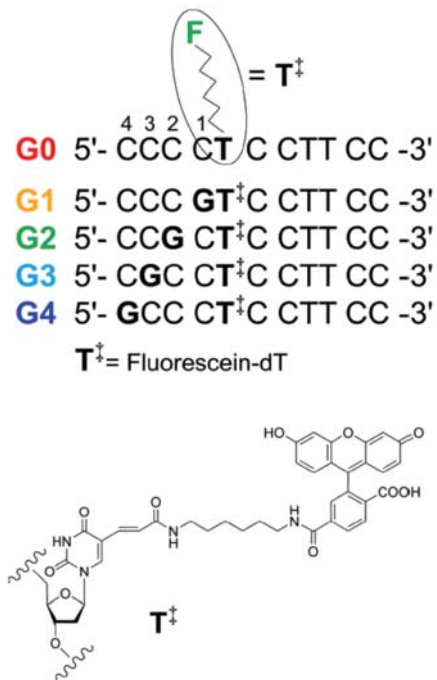


図2 合成した1本鎖 DNA 化合物の塩基配列(上)とリンカーの構造(下)。

表1 集団系を対象とした TCSPC 法により得られた

フルオレセイン及び G0-G4 の蛍光寿命

	$\tau_1$ [ns]	$A_1$ [%]	$\tau_2$ [ns]	$A_2$ [%]
Fluorescein	4.03	100	---	---
G0	4.36	100	---	---
G1	4.22	87.6	0.32	12.4
G2	4.19	88.8	0.30	11.2
G3	4.18	86.1	0.29	13.9
G4	4.09	82.2	0.26	17.8

G0~G4 において、蛍光ピーク波長における蛍光強度を定常蛍光スペクトル測定から求め、G0 のスペクトル強度で規格化した場合の相対強度変化と、TCSPC で得られた蛍光減衰曲線の時間積分値に対して、G0 の積強度で規格化して求めた相対蛍光強度をプロットしたものが図 3a であり、非発光性コンホメーション (図 3c における Form C) の割合をプロットしたものが図 3b である。これより、定常蛍光測定における相対強度が蛍光寿命の積分から求めた相対強度と一致しないことが分かり、この結果は、グアニンとフルオレセインが基底状態で相互作用した非発光性コンホメーションの存在を示唆した。これらの結果から、G1~G4 は図 3b で示す 3 つのコンホメーション間を揺らぎにより行き来するとのモデルを考案した。

上記 TCSPC の実験結果からは、蛍光寿命の間に起こる時間スケールのコンホメーション変化に関する情報が得られるが、非発光性の 3 重項状態やもっと遅い消光ダイナミクスに関する知見は得られない。そこで DNA (G0~G4) に結合したフルオレセインの蛍光

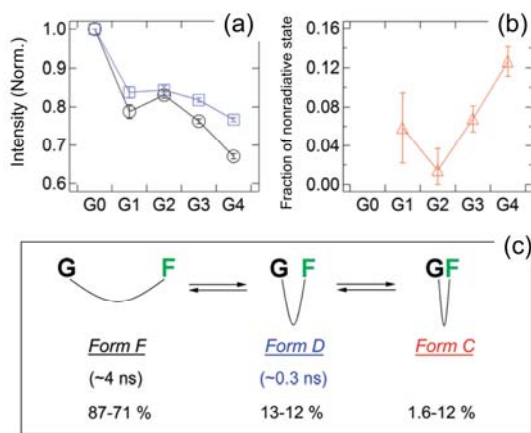


図3 (a): G0-G4 の定常光励起下における蛍光強度(○)と蛍光減衰曲線を積分して得られた蛍光強度(□)。(b): 非発光性コンホメーションの成分比。(c): 集団系の蛍光測定結果より類推したコンホメーション変化スキーム。

を単一分子レベルで測定し、ナノ秒からミリ秒に渡る時間領域での光子相関を得た。図 4 にその一例として、G0 の光子相関波形を示す。

単一の蛍光分子が放出する光子間の時間相関には、様々な時間スケールの分子ダイナミクスに関する情報が含まれる。相関波形の時間原点から蛍光寿命程度の間では、光子相関値が低くなり、時間原点では理想的には相関を示さない(相関値が零となる)。この理由は、励起状態の単一分子が発射することのできる光子数は、一回の励起あたりせいぜい 1 個であり、蛍光寿命の間に同時に 2 個以上の光子を放出する確率は励起直後が最も小さくなるからである。図 4 において、相関時間 10 ns までの相関値が、時間原点に向かって減少していることがこの事象に対応する。

単一分子の蛍光光子相関において、励起状態寿命より長時間領域で相関値が上昇し、種々の消光の起こるタイムスケールで相関値が減少する。これは、ある時間において発光可能な状態にいる蛍光分子は、僅かな時間が経過した後も発光可能な状態にいる確率が比較的高い(発光可能な状態からの変化が小さい)ことを示している。しかし 3 重項への項間交差、消光剤との衝突、ブラウン運動による励起領域外への移動等で蛍光分子からの発光光子数は時間と共に減少する。光子相関では、一つの蛍光光子が検出されてから次に蛍光光子が検出されるまでの時間スケールに応じて相関波形の減衰が現れる。3 重項への項間交差が起こる場合では、S1 励起状態(発光状態)→励起 3 重項状態(非発光状態)→基底状態→S1 励起状態(発光状態)のサイクルに対応した時間スケールで相関波形の減衰が見られる。このとき 3 重項寿命の時間スケールが項間交差や電子遷移よりも十分長い場合、相関波形には 3 重項寿命に対応した時定数で減衰が現れる。

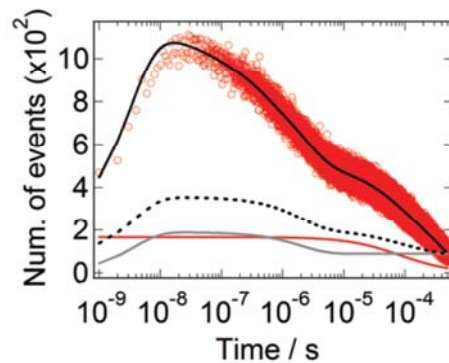


図4 フルオレセイン修飾1本鎖 DNA (G0、バッファー溶液) の蛍光光子相関波形(室温)。

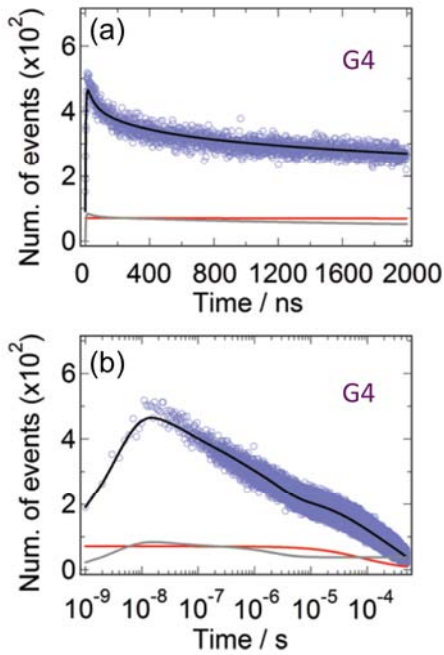


図5 バッファー溶液中 G4 の光子相関波形。(a):時間 2000 ns まで、(b):全時間領域。

他の消光過程も同様であり、本研究で用いた DNA の場合は、そのコンホメーション変化より DNA 中のグアニン塩基とフルオレセインとの衝突(消光)が起こるためその時間スケールに対応した減衰が相関波形に現れ、また並進拡散運動によって DNA が共焦点顕微鏡の検出領域を出入りすることに起因した蛍光強度の時間変化に対応した相関値の減衰も共に現れる。結果の一例として、G4 の光子相関波形を図5に示す。

上記の如く、蛍光光子相関波形には、種々の消光過程に関する情報が含まれる。これらを解析し、DNA のコンホメーション変化ダイナミクスに関する情報を取得するため、図6に示す7準位モデルを考え G1~G4 の光子相関波形を解析した。解析では、formF と formD の励起状態から基底状態への失活の速度定数は集団系の蛍光寿命測定より得られた値を用い、また3重項寿命は古典的な蛍光相関分光法の解析手法により求めた値を用いた。解析結果を表2に示す。

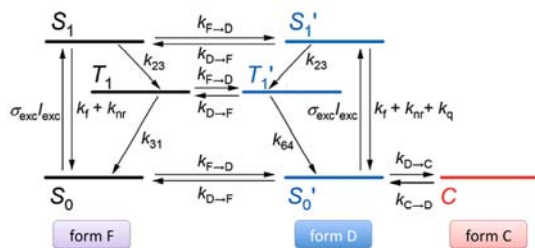


図6 DNA のコンホメーション変化ダイナミクス解析に用いた7準位モデル。

表2 光子相関関数の解析より得られた速度定数

	$k_{F \rightarrow D} / s^{-1}$ ( $1/k_{F \rightarrow D} / ns$ )	$k_{D \rightarrow F} / s^{-1}$ ( $1/k_{D \rightarrow F} / ns$ )	$k_{D \rightarrow C} / s^{-1}$ ( $1/k_{D \rightarrow C} / \mu s$ )	$k_{C \rightarrow D} / s^{-1}$ ( $1/k_{C \rightarrow D} / \mu s$ )
G1	$4.0 \times 10^5$ (2500)	$2.6 \times 10^6$ (380)	$1.0 \times 10^5$ (10)	$1.4 \times 10^5$ (7.1)
G2	$4.0 \times 10^5$ (2500)	$2.9 \times 10^6$ (340)	$2.0 \times 10^4$ (50)	$7.7 \times 10^4$ (13)
G3	$1.2 \times 10^5$ (830)	$6.7 \times 10^6$ (150)	$1.0 \times 10^5$ (10)	$1.1 \times 10^5$ (8.7)
G4	$3.2 \times 10^6$ (310)	$1.4 \times 10^7$ (73)	$2.0 \times 10^5$ (5)	$1.6 \times 10^5$ (6.4)

表2から、formF と formD 間のコンホメーション変化の速度定数 ( $k_{F \rightarrow D}$  と  $k_{D \rightarrow F}$ ) は、配列上のフルオレセインが結合したチミンとグアニン間との距離が大きくなるにつれ増加し、この数十ナノ秒から数マイクロ秒のコンホメーション変化はリンカー部位や DNA 部分の局所的な動きに対応すると考えられ、集団系の測定で得られた過去の文献値とも矛盾しない。一方、formD から formC への数~数十マイクロ秒のコンホメーション変化は DNA 全体の構造変化であると考えられる。対して、formC から formD へのコンホメーション変化の時定数が G1~G4 でほぼ一定であったことは、van der Waals 相互作用により安定化されたフルオレセイン-グアニン錯体 (formC) の解離エネルギーがどの DNA でも同程度であるとする説明できる。

以上のように、集団系の蛍光寿命測定より得られたコンホメーション成分比と励起状態寿命、蛍光相関分光法より得られた3重項に関する速度定数を用い、7準位の速度論モデルに基づいて光子相関関数を解析し、室温溶液中での生体高分子のコンホメーション変化ダイナミクスを明らかにした。これらの結果から、本研究成果はナノ秒からミリ秒にわたる比較的複雑なコンホメーション変化のダイナミクスに関して適用可能であることが示された。

その他、微小液滴系、高分子固体系、多孔性材料中の蛍光性ゲスト分子の単一分子蛍光計測にも本装置を応用し、並進や回転拡散過程に関する知見を獲得するとともに、測定法、システムの拡充を行った。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

1. Evaluation of radiation force acting on macromolecules by combination of Brownian dynamics simulation with fluorescence correlation spectroscopy. S. Ito, N. Toitani, H. Yamauchi, H. Miyasaka. *Phys. Review E.*, 81[6] (2010) 061402-8.

2. Nanosecond to submillisecond dynamics in dye-labeled single-stranded DNA, as revealed by ensemble measurements and photon statistics at single-molecule level. T. Kaji, S. Ito, S. Iwai, H. Miyasaka, *J. Phys. Chem. B.*, 113 [42] (2009) 13917-13925.
3. Microscopic structure and mobility of guest molecules in mesoporous hybrid organosilica: evaluation with single molecule tracking. S. Ito, S. Fukuya, T. Kusumi, Y. Ishibashi, H. Miyasaka, Y. Goto, M. Ikai, T. Tani, S. Inagaki, *J. Phys. Chem. C*, 113 [27] (2009) 11884-11891.
4. Diffusion processes of single fluorescent molecules in a polymer-based thin material with three-dimensional network. S. Ito, T. Kusumia, S. Takei, H. Miyasaka *Chem. Com.* [41] (2009) 6165-6167.
5. Diffusion coefficient in a photo-curable polymer material, as evaluated by means of single molecule tracking. S. Ito, K. Itoh, S. Pramanik, T. Kusumi, S. Takei, H. Miyasaka, *Appl. Phys. Exp.* 2 (2009) 075004.

[学会発表] (計 24 件)

1. 単一分子検出法による微小液滴中の溶質発光挙動の研究、飯田篤史、伊都将司、宮坂 博、日本化学会第 91 春季年会 1D1-14、2011/3/26-29、神奈川大、横浜
2. Poly(2-hydroxyethyl acrylate)薄膜におけるマイクロ不均一性とその重合度依存性：単分子追跡による評価、前田健太郎、伊都将司、竹井 敏、宮坂 博、2010 光化学討論会 1P002、2010/9/8-10、千葉大学、千葉
3. 単一分子検出法による微小液滴中の溶質発光挙動の研究、飯田篤史、伊都将司、宮坂 博、2010 光化学討論会 2P091、2010/9/8-10、千葉大学、千葉
4. 周期的な近赤外パルスレーザー光照射下における 1 本鎖 DNA・色素結合系の構造揺らぎ：単一分子光子統計の適用、梶 貴博、伊都将司、岩井成憲、宮坂 博、日本化学会第 90 春季年会、1PB123、2010/3/26-29、近畿大学、大阪
5. Microscopic heterogeneity in polymer-based thin film materials evaluated with highly sensitive fluorescence microscopy, S. Ito, K. Itoh, T. Kusumi, K. Maeda, S. Takei, H. Miyasaka, Japan-Korea Symposium on Molecular Science 2009, July 12-14, 2009, Awaji, Hyogo, Japan. (Invited lecture)

[図書] (計 1 件)

1. Construction of micro-spectroscopic systems and their application to the detection of molecular dynamics in a small domain. S. Ito, H. Matsuda, T. Sugiyama, N. Toitani, Y. Nagasawa, H. Miyasaka, “Molecular Nano

Dynamics”, Eds. H. Fukumura et al., Wiley-VCH, Weinheim, (2009) pp.133-154.

[その他]

ホームページ等

<http://www.laser.chem.es.osaka-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮坂 博 (MIYASAKA, HIROSHI)  
大阪大学・基礎工学研究科・教授  
研究者番号：40182000

### (2) 研究分担者

(なし)