

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21510123  
 研究課題名（和文） 単一量子ドットのブリンキング機構の解明・制御に向けた新しい解析理論の開発  
 研究課題名（英文） Construction of New Theoretical Modeling to Understand and Control Single Quantum Dot Intermittent Blinking  
 研究代表者  
 李 振風 (LI CHUN-BIU)  
 北海道大学・電子科学研究所・准教授  
 研究者番号：90397795

**研究成果の概要（和文）**：間欠的なブリンキングの速度論の仕組みを明確にするために、一連の新しいデータ駆動時系列解析手法及び一分子 (SM) 量子ドット (QD) 蛍光実験により根本的な速度論的スキーム (KS) を直接抽出するためのモデル化法を開発した。その開発の中には、オン・オフ状態における強度の dwell-time 統計を正確に抽出できる変化点解析の開発と応用や、時系列による完全な統計情報を最も偏りのない KS によりとらえる為の新たな KS 構築手法のが含まれている。新たに開発されたこれらの手法は、SM QD 実験においてのみならず、幅広く他の SM 測定、例えば SM 酵素ターンオーバー実験や F1\_ATPase 回転評価においてもその高い信頼性と適用性を示している。

**研究成果の概要（英文）**：To elucidate the mechanisms of intermittent blinking kinetics, we developed a series of novel data-driven time series analysis and modeling techniques to extract the underlying kinetic scheme directly from single molecule (SM) quantum dot (QD) fluorescence experiments. These include the development and application of the change-point analysis that allows us to correctly extract the on and off intensity dwell-time statistics, and the development of a novel kinetic scheme (KS) construction methodology which unveils the most unbiased KS capturing the full statistical information from time series. The developed methods have demonstrated their high reliability and applicability not only in SM QD experiments, but also in a wide range of other SM measurements, such as in the SM enzymatic turnover experiments and the SM F1\_ATPase rotation assessments.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料ナノバイオサイエンス

キーワード：1 分子計測 (SMD), 量子ドット, ナノバイオ, 物性理論, 光物性

## 1. 研究開始当初の背景

一分子データ解析は、通常、同じ分子種であっても、分子個々に応じて異なる振舞いを呈する。これは分子のもつ内部自由度の状態が異なることに由来し、タンパク質などのように、内部自由度が多ければ多いほど顕著と

なる。量子ドット (Quantum Dot, QD) のような単純な色素分子系においても顕著に観測される。この事実はなんらかの多数の“内部自由度”に相当するものが QD においても存在することを明示している。

QD の蛍光トレース (強度時系列) として、

特筆すべき特徴のひとつにその間欠的なブリンキング現象がある (図 1)。ブリンキング現象は QD に限らず、多くの蛍光色素分子において普遍的に存在し、1 分子時系列からタンパク質の構造変化などを正しく同定するうえで大きな弊害のひとつになっている。QD のブリンキングは、定性的には、“暗”状態と“明”状態のあいだのランダムジャンプと考えられている (最近では 2 つ以上の状態が観測されている)。しかしながら、それらのジャンプは強い相関を示し、“暗”“明”状態の各滞在確率分布は 4 桁から 9 桁に渡って、べき分布をもつ (べき指数は 1.1 から 2.2 の間に殆どの場合、帰属される) ことが知られている。

現在、存在する (現象論的) モデルのほとんどはブリンキングの成因をナノ粒子内部の電荷分離と捉えている。マイナス電荷をもつ電子が光照射によってコアから飛び出し、空間的に広がった高励起状態に遷移する。その結果、量子ドットのコア部分がプラスに帯電し、電荷が分離した状態と捉えることができる。一旦、QD が電荷分離を起こすと、蛍光はオージェ過程によってクエンチされて暗状態になる。提案されているモデルは群雄割拠しており、基本的にはそれらは電荷分離状態をどのように構成するかが異なっている。我々は現象論的にモデルを構成するのではなく、1 分子時系列情報からもっとも予測性能が高く、かつ最適なモデルを自動的に抽出するアプローチをとる。

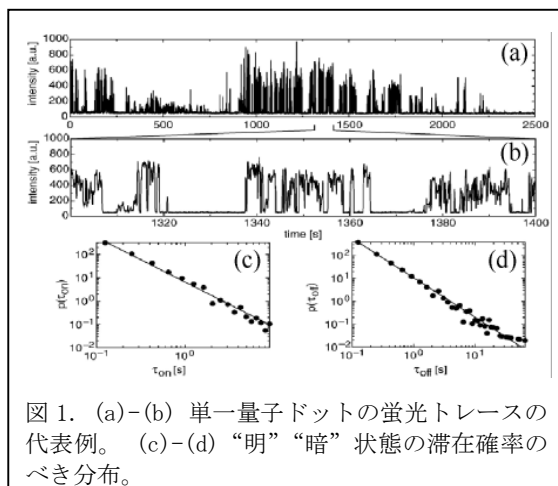


図 1. (a)-(b) 単一量子ドットの蛍光トレースの代表例。(c)-(d) “明” “暗” 状態の滞在確率のべき分布。

## 2. 研究の目的

(1) モデルフリーの多重スケール時系列手法を通して、べき乗則挙動 (i. e. 幅広い時間スケールの存在) の本質を理解すること。これにより、異なる時間スケールにおけるルミネセンスゆらぎのダイナミクスを記述できる多重状態遷移ネットワーク (SSN) が分析の結果として得られると考えられる。

(2) 異なる特性の多重スケール SSN から QD ブリンキングの基本的な仕組みを明らかに

すること。状態および多重スケールのブリンキングダイナミクスにおける、ネットワーク構造と遷移ダイナミクス間の関係を確立すること。

(3) 上記の時系列分析法を QD 蛍光の強度時系列、遅延時間時系列、光子偏光およびスペクトル特性を含む多チャネルデータへ一般化すること。

(4) 新たに開発した多重スケール時系列分析により、既存の QD ブリンキングモデルの妥当性を示すこと。

## 3. 研究の方法

(1) QD ブリンキングの“明” “暗” 状態を分析するための変化点解析の開発：

QD 測定による時系列は確率的には不連続な蛍光レベルの間でのデータ交換により表されることが多い。この様な不連続レベルの識別として、これまではほぼビンニング法としきい値法に頼っていた。つまり、ビンサイズおよびしきい値の主観的評価によりそれぞれ異なるレベルが選択されていた事になる。しかしながら、しきい値は signal-to-noise (SN) 比がそれ程高くない場合に問題が生じかねないため、変化点検出法が望ましいと考えられる (図 2a, 2b 参照)。

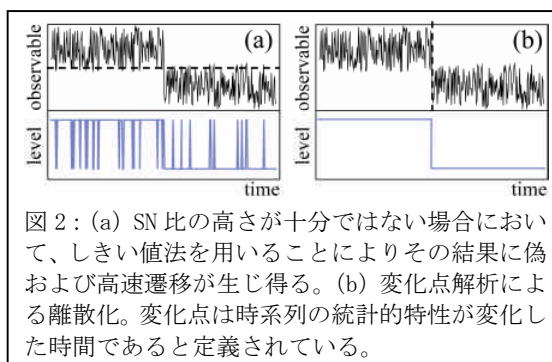


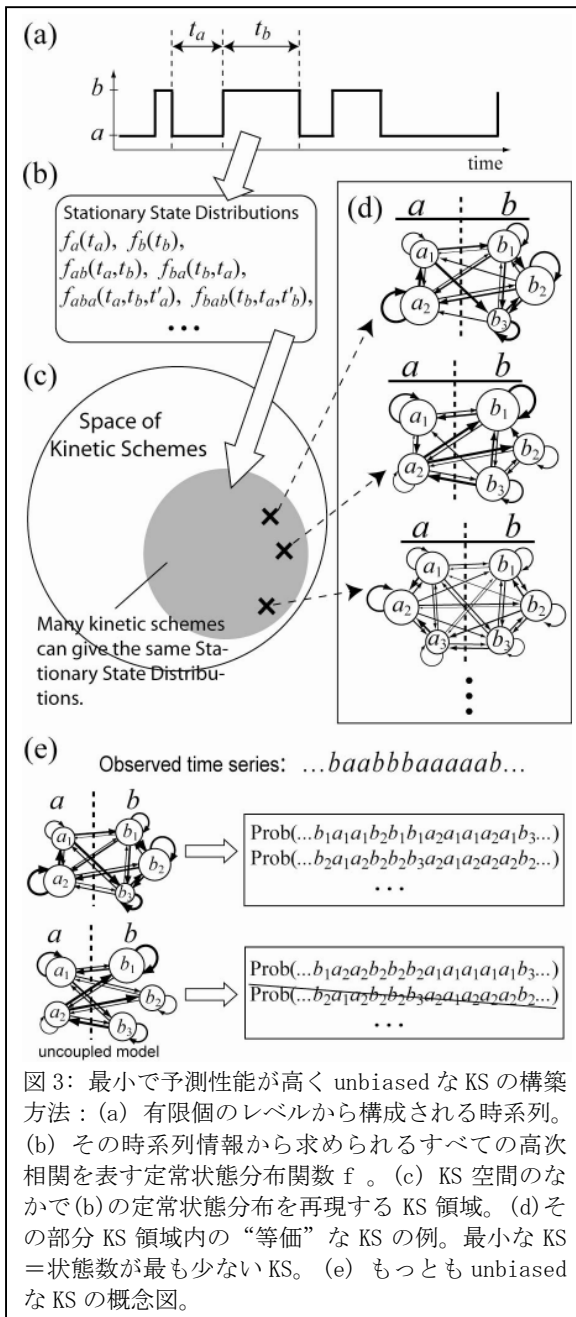
図 2: (a) SN 比の高さが十分ではない場合において、しきい値法を用いることによりその結果に偽および高速遷移が生じ得る。(b) 変化点解析による離散化。変化点は時系列の統計的特性が変化した時間であると定義されている。

変化点検出の際の問題点を取り扱うために、統計的仮説を立て問題を検証した：変化点が全く無いという帰無仮説に対して、ある特定の時間において変化点が生じるという対立仮説を立て、これらの統計的な手法に基づき時系列の再帰的な変化点を見つけ出した。QD ブリンキングデータの他にも、この手法は様々な生物物理学のデータに適用可能であることが報告されている。例えば、ヒストグラム、相関などのシステム上の重要な統計的情報を提供する離散準位データを生み出す SM 酵素ターンオーバー実験、ATP 加水分解した F1\_ATPase 回転などで適用できた。

(2) 一分子時系列情報から構築する状態遷移ネットワークの新しい構成手法の開発：

変化点/トレンド解析により抽出された明-暗 dwell-time 時系列は背後に存在する QD ブリンキングの状態遷移ネットワーク (=キ

ネットワークスキーム (KS) を構成するうえで大変有用である。しかしながら、イオンチャネルにおいて議論されているように (e.g. Kienker, Proc. R. Soc. Lond. B, 236, 269 (1989)), dwell-time 時系列データの自己相関関数などの統計量を与える KS は原理的に無数に存在する。換言すると、dwell-time 時系列データの統計的な相関情報から KS を一義的に同定することができない (図 3a-d)。我々は「すべての可能な KS のなかで、同様の予測性能をもち、最小かつ客観的 (unbiased) な KS が何であるか」を問うことを通して、背後に存在する KS をデータから抽出する方法論を新規に開発した。



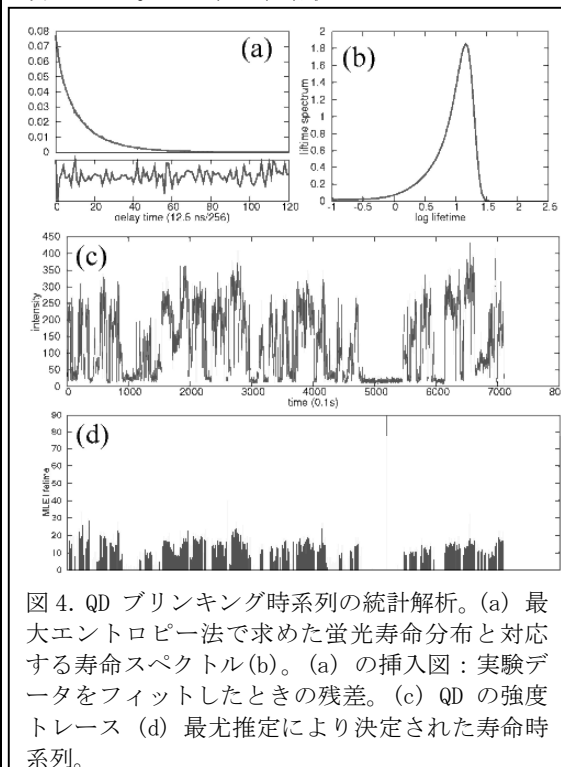
最小の KS を時系列情報から求められる (定

常状態分布関数で評価される) すべての高次相関を再現する KS 集合 (図 3d に例示している) で一番状態数が少ないものとして定義する (図 3d の上二つの KS に対応)。更に、最小の KS 集合のなかから、観測された時系列データから読み取れる情報を越えて系に対する性質を導入しないという基準に立って、最も unbiased な KS を以下のように定義する。すなわち、図 3e は二つの最小な KS を例示しているが、下段の KS では、状態  $\{a_i\}$  の間、および状態  $\{b_i\}$  の間に遷移が存在していないのに対して上段の KS ではそれらの間になんらかの遷移が存在する。a, b の 2 値的な観測データからは、背後に存在する状態  $\{a_i\}$  および状態  $\{b_i\}$  の内部の遷移に関しては、一切読み取ることが不可能である。それゆえ、下段の KS のほうがより biased が掛っていると判断される。実際は、状態  $\{a_i\}$  および状態  $\{b_i\}$  の内部遷移の付与の仕方において、恣意性の強弱を情報理論におけるシャノンのエントロピーに基づいて、最も unbiased な KS を同定する。

#### 4. 研究成果

(1) 時系列を用いた QD ブリンキングの統計的調査:

その結果、異なる同種 QD の強度揺らぎが広く分布している (30~1200counts/100ms) こと; ほとんどの QD の強度は 100~400counts/100ms であること; 図 4b, 4c に示すように、寿命分布の形と強度揺らぎの大きさのあいだには明確な関係がないことが分かった。一方、明、暗状態のパターンは QD



毎に変化する。ある QD は明状態に長く滞在し、暗状態に早く遷移するのにに対し、ほかの QD は、逆に、ほとんどの時間、暗状態に滞在し、短い明状態へ速やかに遷移する。ほとんどの強度トレースはこれらの中間のパターンに属するものと考えることができるが、そのうちの幾つかは全く異なる揺らぎパターン間の遷移を包含することも分かった。

最尤推定法により決定された寿命時系列は 10-40 (unit=342ns/256) の間を大きく揺らいでいる (図 4d)。特筆すべき点は、この寿命時系列は強度揺らぎの時系列と強い相関を示唆している点である (図 4c, d)。最尤推定された寿命時系列では、強度時系列に含まれている幾つかの実験誤差、たとえば、測定に由来する (であろう) 線形減衰していく成分、正弦波成分など、を除去することができるため、実験誤差に対してある程度の安定な解析を行えることが期待できる。

### (2) 一分子時系列への変化点解析の応用:

量子ドットのプリンキング速度論的スキームを明らかにするための 1 分子解析技術を整備するために、閾値法による状態同定の欠点を解消するため、強固な統計的基盤に基づいた新しい変化点検出手法を開発した。この変化点解析によって、高時間分解能で 1 分子時系列の強度変化点を客観的に特定することが可能となる (図 5)。この変化点検出手法は、不十分な SN 比での蛍光観察においても実際の滞留時間統計を従来より正確に再現できることが判明した。一方で、ビンニングおよびしきい値法による artifact は他の 1 分子測定においても普遍的に存在し、例えば、1 分子酵素ターンオーバー実験において見出されている Dynamic disorder の呼ばれている現象 (連続して生起するターンオーバー時間の間に相関が存在する) もデータ解析による artifact が存在することを示唆する結果が得られた (ACS Nano 2012, 1 月号のハイライトに選出された)。

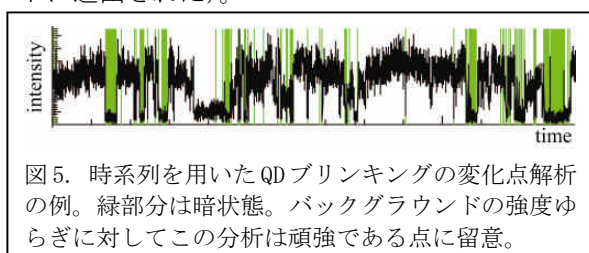


図 5. 時系列を用いた QD プリンキングの変化点解析の例。緑部分は暗状態。バックグラウンドの強度ゆらぎに対してこの分析は頑強である点に留意。

### (3) 一分子酵素ターンオーバー実験による完全動的相関のモデル化:

現在進行中のプロジェクトとしては、偏りが無い速度論的スキーム構造を、上記に示した時系列の QD のオン-オフ状態に直接応用することで、ここに SM 酵素ターンオーバー実験の観点から KS 構造の結果を簡単に説明す

る。近年の SM 実験の発展により、触媒反応の経過時間中に各酵素の実時間観測が可能となった。これまでは、動的無秩序と呼ばれる現象、つまり多重触媒立体配座とその中でのゆっくりとした遷移により生じ得る多重時間スケールのゆらぎは単一酵素回転率により実証できる言われてきた (例、Nat. Chem. Bio., 2, 87 (2006))。しかし我々は、酵素の触媒特性を定義する多重スケール立体配座の本質的特徴を決定するために、観測済みの滞留時間時系列の正確な情報内容の定量化、すでに示された観測データに含まれる全ての動的相関をとらえる最も偏りが無い KS の抽出、これらをモデル化の枠組みへ応用した (投稿中 (2012 年))。

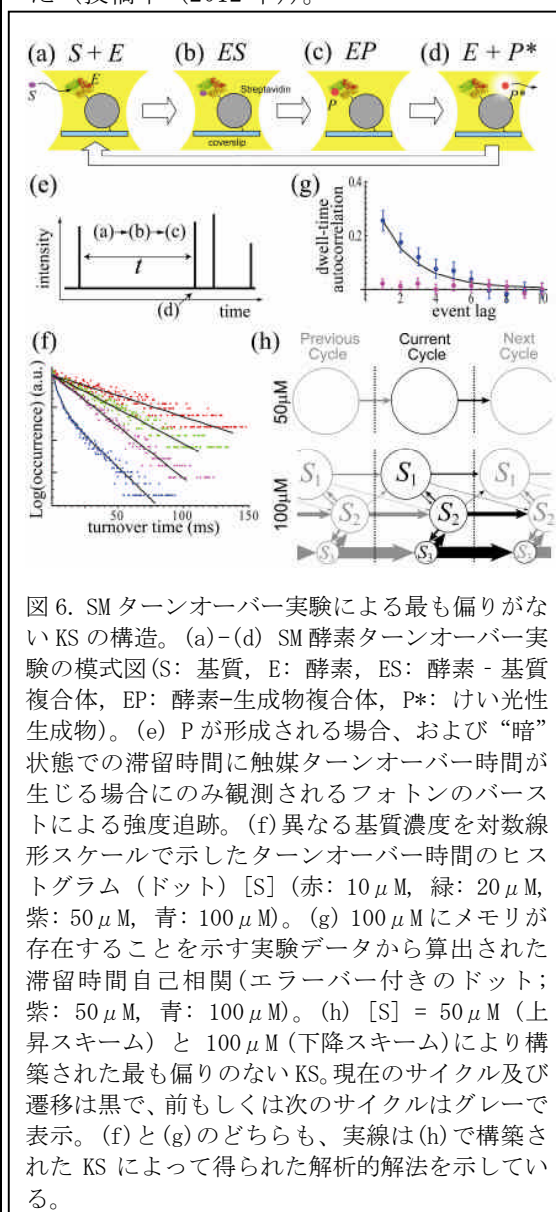


図 6. SM ターンオーバー実験による最も偏りが無い KS の構造。(a)-(d) SM 酵素ターンオーバー実験の模式図 (S: 基質, E: 酵素, ES: 酵素-基質複合体, EP: 酵素-生成物複合体, P\*: けい光性生成物)。(e) P が形成される場合、および“暗”状態での滞留時間に触媒ターンオーバー時間が生じる場合にのみ観測されるフォトンバーストによる強度追跡。(f) 異なる基質濃度を対数線形スケールで示したターンオーバー時間のヒストグラム (ドット) [S] (赤: 10 μM, 緑: 20 μM, 紫: 50 μM, 青: 100 μM)。(g) 100 μM にメモリが存在することを示す実験データから算出された滞留時間自己相関 (エラーバー付きのドット; 紫: 50 μM, 青: 100 μM)。(h) [S] = 50 μM (上昇スキーム) と 100 μM (下降スキーム) により構築された最も偏りが無い KS。現在のサイクル及び遷移は黒で、前もしくは次のサイクルはグレーで表示。(f) と (g) のどちらも、実線は (h) で構築された KS によって得られた解析的解法を示している。

図 6. 多重スケールの動的特性の要約、および Escherichia coli β-galactosidase の SM 酵素ターンオーバー実験を滞留時間時系列

へ応用した結果。この分析の結果により、データから抽出されたより客観的な KS のネットワーク特性という視点から、異なる基質濃度の単一触媒反応でのメモリ効果や多指数関数の特性 (i. e. 動的無秩序) が生じるとの考察を可能にした。

## 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 7 件)

- ① Tatyana Terentyeva, Hans Engelkamp, Alan Rowan, Tamiki Komatsuzaki, Johan Hofkens, Chun Biu Li, Kerstin Blank, "Dynamic Disorder in Single Enzyme Experiments: Facts and Artifacts" ACS Nano 6 (1), 346-354(2012)、査読有
- ② Naoki Miyagawa, Hiroshi Teramoto, Chun-Biu Li and Tamiki Komatsuzaki, 'Decomposability of Multivariate Interactions' Complex Systems 20,165--179(2011)、査読有
- ③ Naoki Miyagawa, Hiroshi Teramoto, Chun-Biu Li and Tamiki Komatsuzaki, 'Spatial Heterogeneity of Multivariate Dependence' AIP Conference Proceedings "International Conference of Numerical Analysis and Applied Mathematics 2011" 1389, 991-994 (2011)、査読有
- ④ Tamiki Komatsuzaki, Chun Biu Li, and Shinnosuke Kawai 'Robustness and Diversity of Transitions in a Sea of Chaos and Stochastic Fluctuation' AIP Conference Proceedings "International Conference of Numerical Analysis and Applied Mathematics 2010" 1281(1), 1582-1584 (2010)、査読無
- ⑤ Y.Matsunaga, C.B.Li, T.Komatsuzaki, "Collectivity at Different Space and Time Scales in Multiscale Protein Dynamics", Physical Review E, 82, 016213-016225, 2010、査読有
- ⑥ Chun Biu Li, Haw Yang, and Tamiki Komatsuzaki: "New Quantification of Local Transition Heterogeneity of Multiscale Complex Networks Constructed from Single-Molecule Time Series", Journal of Physical Chemistry B, 113 (44), 14732-14741 (2009)、査読有
- ⑦ Chun Biu Li, Mikito Toda, and Tamiki Komatsuzaki 'Bifurcation of no-return transition states in many-body chemical reactions' Journal of Chemical Physics 130, 124116 (2009)、

査読有

[学会発表] (計 28 件)

- ① 宮川尚紀, 寺本央, 李振風, 小松崎民樹 : 「大域的パターンの連結情報量とその分解可能性」、日本物理学会第 67 回年次大会、関西学院大学西宮上ヶ原キャンパス (2012 年 3 月 27 日)
- ② 千葉勇太, 河合信之輔, 馬場昭典, 寺本央, Chun Biu Li, 小松崎民樹 : 「一分子時系列から“掘り起こす”多次元自由エネルギー地形の情報理論的構成法の開発」、日本物理学会第 67 回年次大会、関西学院大学西宮上ヶ原キャンパス (2012 年 3 月 27 日)
- ③ 菊地正浩, 河合信之輔, 寺本央, Chun Biu Li, 小松崎民樹 : 「非リボソームペプチド合成酵素の多次元挙動解析理論の開発」、日本物理学会第 67 回年次大会、関西学院大学西宮上ヶ原キャンパス (2012 年 3 月 27 日)
- ④ Chun-Biu Li : “Data-Driven Modeling of the Complex Kinetics and Dynamics from Single Protein Motor Rotation Experiments ” , Quantitative Developmental Biology, RIKEN Center for Developmental Biology (CDB) (2012 年 3 月 26 日)
- ⑤ 永幡裕, 河合信之輔, 寺本央, 李振風, 小松崎民樹 : 「2 つの反応方向をもつ鞍点での、反応の「過去・未来」を一義的に分ける相空間構造」、日本物理学会第 67 回年次大会、関西学院大学西宮上ヶ原キャンパス (2012 年 3 月 24 日)
- ⑥ Chun-Biu Li : “ An information theoretic approach to dynamical irreversibility from time series ” , DYNAMICS OF COMPLEX SYSTEMS 2012, 北海道大学 (札幌市) (2012 年 3 月 7 日)
- ⑦ Tahmina Sultana, Hiroshi Teramoto, Chun Biu Li, Tamiki Komatsuzaki : “ Extracting the Reaction Network Buried in Single Molecule Time Series of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Growth Factor Receptor-Bound Protein 2 (Grb2) in Cytoplasm ” , IGP International Symposium 2012, Hokkaido University (2012 年 3 月 2 日)
- ⑧ Naoki Miyagawa, Hiroshi Teramoto, Chun Biu Li, Tamiki Komatsuzaki, “Spatial Heterogeneity of Multivariate Dependence”, International Conference of Numerical Analysis and Applied Mathematics, Greece, September 19 - September 25, 2011

- ⑨ Z. Liu, C. Li, H. Teramoto, T. Komatsuzaki: 「Extracting Protein Dynamics from Single Molecular Time Series」、分子科学討論会(札幌)2011、札幌コンベンションセンター(札幌市)(2011年9月23日)
- ⑩ Sultana Tahmina, Komatsuzaki Tamiki, Li Chun Biu, Teramoto Hiroshi: 「Extracting the reaction network buried in single Molecule Time Series of Epidermal Growth Factor Receptor and Grb2」、分子科学討論会(札幌)2011、札幌コンベンションセンター(札幌市)(2011年9月22日)
- ⑪ 永幡 裕, 河合 信之輔, 寺本 央, 李 振風, 小松崎 民樹: 「二つの反応方向をもつ鞍点における反応の決定性」、分子科学討論会(札幌)2011、札幌コンベンションセンター(札幌市)(2011年9月21日)
- ⑫ 宮川 尚紀, 寺本 央, 李 振風, 小松崎 民樹: 「階層構造をつくる多変数確率過程の数理」、分子科学討論会(札幌)2011、札幌コンベンションセンター(札幌市)(2011年9月21日)
- ⑬ Chun-Biu Li: 「Learning the Kinetic Scheme with Minimum Excessive Information from Dwell-Time Time Series」、第49回日本生物物理学会年会、兵庫県立大学大学院(神戸市)(2011年9月17日)
- ⑭ Chun-Biu Li: 「Complex Dynamics and Kinetics from Dwell-Time Time Series」、Telluride Workshop on The Complexity of Dynamics and Kinetics in Many Dimensions、Telluride Intermediate School(2011年6月20日)
- ⑮ Chun-Biu Li: 「Data-Driven Modeling of Single Molecule Experiments from Time Series Analysis」、Seminar、Rice University, Department of Chemistry (USA)(2011年6月17日)
- ⑯ C. Li: “The Hidden Markov Modeling with Exact Information Content of Dwell-Time Time Series”, “Dynamics of complex systems 2011 — 時間発展の非可逆性と予測可能性の限界に関する諸分野からの提言 —”, 北海道大学(札幌市)(2011年3月7日)
- ⑰ C. B. Li, T. Komatsuzaki: “Innovative Single Molecule Time Series Analysis of Supermolecular Motor Proteins”, 2nd International Symposium on Photonic Bioimaging, ヒルトンニセコヴィレッジ(北海道)(2011年2月6-10日)
- ⑱ 李 振風, 小松崎 民樹: 「一分子時系列情報に基づく革新的モデリング」、第36回生体エネルギー研究会/特定領域「革新的ナノバイオ」合同シンポジウム、大阪大学銀杏会館(吹田市)(2010年11月18-20日)
- ⑲ C. Li and T. Komatsuzaki: “When one plus one is more than two: Theoretical challenges in learning from the next generation single- and multiple-molecule experiments”, 生物物理学会第48回年会, 東北大学川内キャンパス(仙台市)(2010年9月20-22日)
- ⑳ C. B. Li, “Single Molecule Time Series Analysis of Supermolecular Motor Proteins”, Seminar at Institute for Molecules and Materials, Radboud University, Netherland(2010年8月3日)
- 21 C. B. Li, T. Komatsuzaki, “膜超分子モーターの革新的時系列解析”, 革新的ナノバイオ第5回班会議, Gakushuin University(東京都豊島区)(2010年6月24-25日)
- 22 C. B. Li, “Time-dependent Perturbation Analysis of Small Nonintegrable Hamiltonian System”, invited talk, Dynamics of Complex Systems Seminar, Department of Mathematics, Hokkaido Univ., Japan(2010年6月9日)
- 23 C. Li: “Transition to Chaos above the Reaction Threshold: Bifurcations, Resonances and Future Challenges”, Workshop on dynamical systems theory and reaction dynamics toward large systems, Kyoto(2010年1月5日)
- 24 C. Li: “Handy Guide to Analyze Time Series from Biological Systems: Some Simple but Powerful Tools”, 福井大学医学部医科学特論 学内セミナーA(2009年12月15日)

[図書] (計4件)

- ① C. B. Li, T. Komatsuzaki, Springer, “Extracting the Underlying Unique Reaction Scheme from a Single-Molecule Time Series”, Cell Signaling Reactions: Single-Molecular Kinetic Analysis, 330, 2010

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

李 振風 (LI CHUN-BIU)

北海道大学・電子科学研究所・准教授

研究者番号: 90397795

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

小松崎 民樹 (KOMATSUZAKI TAMIKI)

北海道大学・電子科学研究所・教授

研究者番号: 30270549