

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19750019
 研究課題名 (和文) 複雑系の遅いダイナミクスの解明を目指した単一分子振動分光法の開発
 研究課題名 (英文) Development of novel single-molecule vibrational spectroscopy toward uncovering slow dynamics of complex systems
 研究代表者
 石井 邦彦 (ISHII KUNIHICO)
 独立行政法人理化学研究所・田原分子分光研究室・研究員
 研究者番号：80391853

研究成果の概要:生体高分子など複雑な分子の遅いダイナミクスを解明するための手段として、複雑分子の構造変化の鋭敏なプローブとなる蛍光寿命に着目し、その揺らぎを単一分子レベルで測定する蛍光寿命相関分光法を開発した。これを応用して、複数の分子種を含む試料の不均一性を、蛍光寿命を鍵として検知することができた。この方法は今後、複雑分子の構造の多様性や揺らぎの時間スケールの観測の新しい手段になると期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2100,000	0	2100,000
2008年度	1300,000	390,000	1690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3400,000	390,000	3790,000

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：単一分子分光、蛍光相関分光、蛍光寿命

1. 研究開始当初の背景

顕微分光関連技術の発展に伴って、単一分子レベルの極微量のサンプルの分光計測を応用した研究が近年著しい広がりを見せている。一般に単一分子分光法では、濃度の希薄な試料に対して顕微鏡下で1つ1つの分子から発せられる蛍光信号を分離して観測する。このようにして得られる単一光子レベルの微弱な信号を集積して統計的な処理を加え、信号の時間変化の特徴や個々の分子ごとの違い、あるいは蛍光の波長・偏光などの分光学的パラメータの間の相関を議論する。この単一分子分光法の最大の魅力は、通常の巨視的な測定ではアボガドロ数のオーダー

の分子数の平均にかき消されてしまうような1つ1つの分子の揺らぎを反映した信号の分布を直接観測できるという点にある。最近では単一の分子を捉えて観測すること自体は目新しい話題ではなく、揺らぎが問題になるような複雑系に対する単一分子分光法の応用と統計学的手法に基づいた解析手段の確立という点に興味が移ってきている。特に、タンパク質や核酸、共役高分子のような巨大分子の複雑で多様な構造・ダイナミクスの特徴を捉えるためのユニークな研究手段として、FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) を利用した単一分子分光法が広く活用されている。

単一分子分光法は原理的に生体分子に代表される複雑系の揺らぎを研究するためのユニークで強力な手段となり得るが、真にその系固有の物理的性質を抽出するためには、多数の分子について同じ測定を繰返し、データの統計分布を正しく評価する必要がある。この分子毎のデータの揺らぎを実験的に評価する方法として、希薄なサンプル溶液から発生する蛍光信号の時間的な揺らぎを相関関数として求める方法がある。これは蛍光相関分光法と呼ばれ、「準単一分子レベル」の分光法として、近年単一分子分光法とともに複雑系の揺らぎを研究する手段としてめざましい発展を見せている。

複雑系に特有の物理化学的に興味深いダイナミクスはナノ秒からマイクロ秒の時間領域に現れると期待される。また一般に、本質的な意味をもつダイナミクスは光励起等の外部からの摂動を用いてトリガーできるとは限らないので、自発的な揺らぎを直接観測することが重要な意味をもつ。蛍光相関分光法はこのようなナノ秒からマイクロ秒の時間領域に現れる分子の自発的な揺らぎの計測に最適の方法である。しかし蛍光相関分光法の複雑系ダイナミクスへの応用は未だに発展途上であり、その利点を十分に生かし切れているとは言えない。そこで本研究では、複雑系の揺らぎの直接観測に向けた新しい蛍光相関分光法の開発を課題とし、新たに蛍光寿命の情報を蛍光相関分光法に取り入れ、蛍光寿命の揺らぎを単一分子レベルで検出する蛍光寿命相関分光法を提案した。

2. 研究の目的

蛍光性の励起状態に励起された分子は、FRETなどの周囲の環境との相互作用により無輻射的に緩和し、その蛍光は消光される。この消光過程の速度はFRETの場合蛍光分子（ドナー）と消光剤分子（アクセプター）の間の距離に敏感で、このことを利用すれば、ドナー・アクセプター間距離をスケールとして複雑分子の構造変化に鋭敏なプローブを構成することができる。この消光過程による蛍光強度の揺らぎを観測して複雑分子のダイナミクスを知る方法は蛍光相関分光法の一つの有力な応用であるが、分子の構造ダイナミクスを並進運動などの他の強度揺らぎの要因と区別して議論するためには、さらに消光過程そのものを時間分解して蛍光寿命の揺らぎを直接観測することがきわめて重要である。しかしこれまでの蛍光寿命揺らぎの測定法は、一定個数の光子を収集した後に平均蛍光寿命を算出する方法によっていたため、単一分子レベルの希薄な試料条件の下では一般にミリ秒以下の短い時間領域の光子数が足りず、十分な時間分解能が得られていなかった。そこで本研究では新たなアプロ

ーチとして、通常の蛍光相関分光と蛍光寿命測定を同時に行って蛍光寿命の情報を付加した相関関数を求め、これを蛍光強度のみの相関関数と比較することで蛍光寿命の揺らぎを計測する方法を考案した。このような発想に基づく実験は今までに行われていないが、この方法により、試料の不均一性や分子の構造変化のダイナミクスなど複雑系特有の現象を、蛍光寿命の揺らぎを通じてナノ秒に及ぶ時間分解能で調べることが可能になる。

3. 研究の方法

蛍光寿命相関分光法では顕微鏡下でパルス励起した蛍光ラベル分子からの光子の放出タイミングを精密に測定し、励起パルスからの遅延時間（＝蛍光寿命）のマクロな時間スケールでの揺らぎを次の相関関数の形で評価する。

$$G_L(\Delta t) = \frac{\langle I(t)I(t)I(t+\Delta t)I(t+\Delta t) \rangle}{\langle I(t)I(t) \rangle^2} \quad (1)$$

ここで $I(t)$, $T(t)$ はそれぞれ時刻 t での蛍光強度と蛍光寿命である。これを通常の蛍光相関分光法で観測される蛍光強度そのものの揺らぎ

$$G_I(\Delta t) = \frac{\langle I(t)I(t+\Delta t) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (2)$$

と比較することで、分子の並進運動の寄与を分離することができる。

この原理を実現するため、顕微分光光学系をベースとした蛍光相関分光システムを製作した。フェムト秒チタンサファイアレーザー (Coherent 社 Mira 900-F) と時間分解能 60 ピコ秒のアバランシェフォトダイオード検出器 (id Quantique 社 id100-20-ULN)、倒立型共焦点顕微鏡 (Nikon 社 TE2000-U)、時間相関光子計数ボード (Becker & Hickl 社 SPC-140) を組み合わせ、希薄溶液から発せられる蛍光の強度揺らぎを蛍光寿命と相関させて測定するシステムを製作した。さらにルーター (Becker & Hickl 社 HRT-82) の導入により測定が多チャンネル化にも対応した。本システムは、顕微鏡の対物レンズの焦点領域に存在する分子から放出される光子の絶対到着時刻と、励起パルスからの各光子の相対遅延時間を、光子毎に同時に記録することができる。ここから複雑系分子固有のダイナミクスの情報を引き出すため、これらの離散的な光子列データから上記 (1), (2) の相関関数を効率的に計算するプログラムの整備も行った。

4. 研究成果

本研究で開発した方法を 2 種類の異なる蛍光寿命をもつ蛍光色素（ローダミン 6 G, ロ

ーダミンB)の混合溶液に適用し、蛍光強度相関関数及び蛍光寿命相関関数を同時に測定した(図1)。これら2種類の蛍光色素のうち片方だけを含む溶液では2つの相関関数は誤差の範囲で一致したのに対し、混合溶液ではそれらの間に有意な差が見られた。これは2種類の蛍光色素の蛍光寿命の違い(4.3ns, 2.6ns)に由来するものであり、蛍光寿命相関関数を通常の蛍光強度の相関関数と比較することで、系に内在する不均一性を予備知識なしに検出できることが明確に示された。

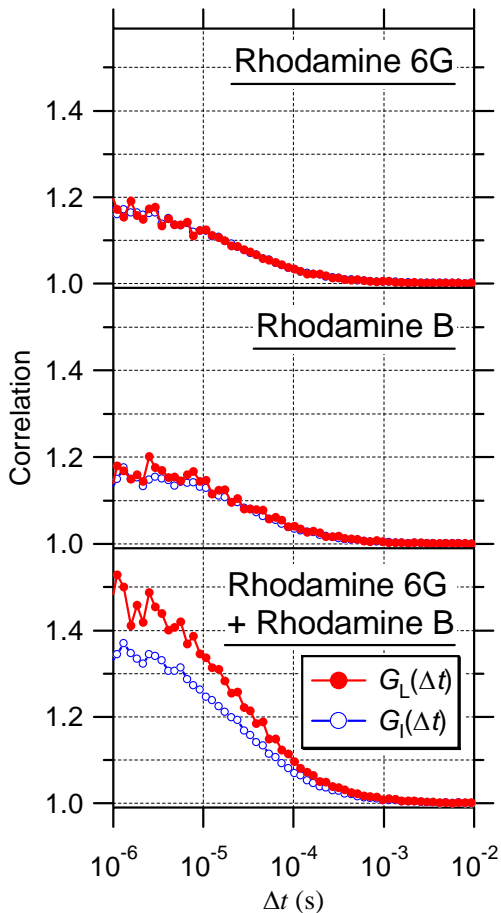


図1 蛍光色素混合溶液の蛍光寿命相関関数測定結果

次に構造揺らぎをもつ分子に対する応用として、蛍光色素でラベルしたポリペプチドの蛍光寿命相関関数を調べた。界面活性剤を加えてポリペプチドのコンフォメーションを変化させたところ、蛍光寿命相関関数と通常の蛍光強度相関関数の比が変化した(図2)。これは、蛍光プローブの周囲の環境の違いによる蛍光寿命の不均一性の変化によるものではないかと考えている。ここで2つの相関関数の比を取ること(図2)、相関信号に含まれる分子の並進拡散運動の寄与を除くことができる。このため、この比の時

間変化は、蛍光寿命の揺らぎを与えるような構造揺らぎの時間スケールを直接反映するものと期待される。この分子では2つの相関関数の比は約1マイクロ秒から数ミリ秒の範囲でほぼ一定であり、不均一な構造分布はこの時間範囲では安定に存在するものと考えられる。

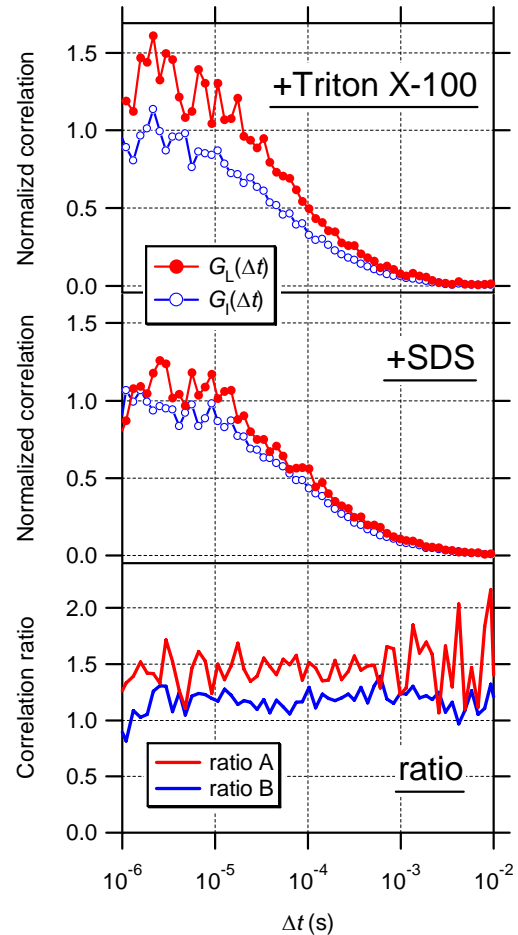


図2 蛍光ラベルポリペプチドの蛍光寿命相関関数測定結果

上記の結果は、蛍光寿命相関分光法を利用して複雑な生体分子の構造の多様性や揺らぎの時間スケールを研究できることを示唆している。今後、本方法を用いた核酸・タンパク質等の生体高分子の揺らぎの問題への展開が期待される。

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1件)

① Kunihiko Ishii, Satoshi Takeuchi, and Tahei Tahara, “Pronounced Non-Condon Effect as the Origin of the Quantum Beat Observed in the Time-Resolved Absorption Signal from Excited-State *cis*-Stilbene”,

The Journal of Physical Chemistry A, 112, 2219-2227, 2008. 査読有り。

〔学会発表〕(計7件)

- ①Sobhan Sen、「単一脂質ベシクル中の位置特異的な超高速ダイナミクス：ピコ秒時間分解顕微鏡による研究」、分子科学討論会2007、2007年9月20日、仙台
- ②Sobhan Sen, “Site-specific Picosecond Dynamics in Single Lipid Vesicles Studied by Fluorescence Microscopy”, 平成19年度日本分光学会顕微分光部会シンポジウム「分子イメージングに向けた分光技術の展開」、2007年10月26日、東京
- ③石井 邦彦、「中赤外極短パルスを用いた分子内非調和振動結合の研究」、第6回エクストリーム・フォトニクス研究会、2007年11月14日、蒲郡
- ④石井 邦彦, “Anharmonic Coupling in a Hydrogen Bonding System Revealed by Impulsive Mid-IR Excitation”, 5th Asian Conference on Ultrafast Phenomena, 2008年1月6日、シンガポール
- ⑤石井 邦彦, “Mid-IR-induced nuclear wavepacket motion of a hydrogen bonding system: effects of mechanical and electrical anharmonic couplings”, 16th International Conference on Ultrafast Phenomena, 2008年6月9日、イタリア
- ⑥石井 邦彦、「カルシウムセンサー蛍光タンパク質cameleonの共鳴エネルギー移動効率の不均一性」、第2回分子科学討論会2008、2008年9月26日、福岡
- ⑦石井 邦彦、「蛍光寿命相関分光法による溶液中分子の揺らぎ検出の試み」、日本化学会第89春季年会、2009年3月28日、船橋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 邦彦 (ISHII KUNIHICO)

独立行政法人理化学研究所・田原分子分光研究室・研究員

研究者番号：80391853