

蛍光相関分光測定装置の紹介

右近寿一郎（株式会社 右近工舎）

近年著しい発展を遂げている分野に蛍光イメージングの分野があります¹⁻³。特にバイオサイエンスでは、細胞内の測定対象成分を蛍光色素でラベリングして、イメージングだけでなく化学情報を読み出します⁴。この分野の発展では、蛍光ラベル分子の開発以外に、レーザーや共焦点走査顕微鏡の役割が大きく、高感度・低ノイズの光検出器の寄与にも著しいものがあります。その結果、一分子の挙動を測定できるようになり、蛍光強度が弱いので光子計数法をもちいます。

ここでは右近工舎で最近開発した蛍光相関分光（Fluorescence Correlation Spectroscopy; FCS）装置を紹介します。FCSは光子計数法により、細胞内部の蛍光ラベルされた分子の動きを測定します。レーザー共焦点顕微鏡では、蛍光分子を励起して観測する領域は極めて小さく、蛍光強度は分子の運動に起因する変動を受けます。FCSはその変動を相関関数として測定し、分子の運動挙動を解析します。

1. 測定原理

汎用の蛍光分光光度計では10 mm角のキュベットに約 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{15}$ 個の色素分子が存在し、蛍光強度は安定しています。

レーザー共焦点顕微鏡の光学系では、例えば焦点で直径 $0.4 \mu\text{m}$ 、高さ $2 \mu\text{m}$ にすると、観測体積は $2.5 \times 10^{-16} \text{L}$ (0.25 fL)です。色素濃度が $0.1 \mu\text{M}$ の溶液では、この体積中にある蛍光分子数は平均15個です。分子のランダムな動きにより、観測体積にある分子の数は常に変動し、蛍光強度も変動します。

溶液中でランダムに運動する分子はEinstein-Stokesの式で表されます(式1)。

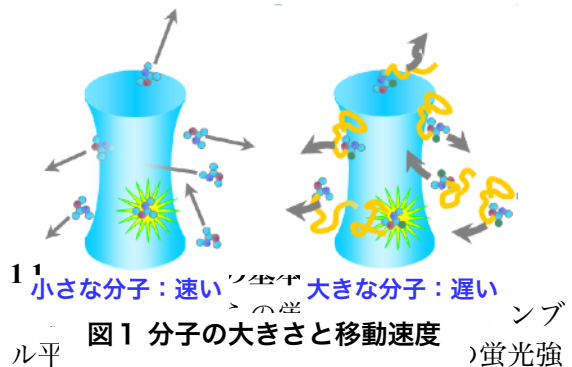
$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (1)$$

D ：拡散係数、 r ：分子を球としたときの半径

k_B ：ボルツマン定数、 T ：絶対温度

η ：媒質の粘性係数

この極小の観測体積で見られる蛍光強度はランダムに変動しており、蛍光相関分光法(FCS)では変動の自己相関から拡散係数を求めます。大きい分子は溶液中でゆっくりと動き、小さい分子は速く移動するので、蛍光の変動は分子の大きさに依存して遅くなったり速くなったりします(図1)。その蛍光強度の変動を相関関数で表します^{2,3}。



度から相関関数はつぎの式で表されます。

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

測定体積がx-y-z軸でGaussian Volumeのとき、相関関数は以下の式で表れます⁴。

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{\omega}{z} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1/2} \quad (3)$$

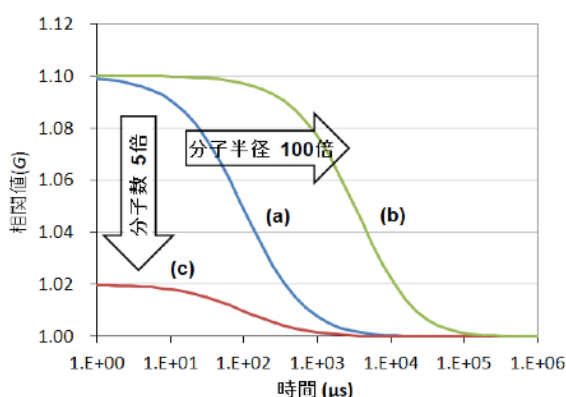
ここで N は測定体積中にある蛍光分子の数。 z は焦点から軸上にレーザー強度が $1/e^2$ になるところ。また、 ω は半径方向に強度が $1/e^2$ になるところです。また τ_D は拡散係数 D と以下の関係にあります。

$$\tau_D = \frac{\omega^2}{4D} \quad (4)$$

τ_D は、蛍光分子が測定体積中を通過する平均的な時間で、分子の大きさを表します。

1.2 相関関数と分子の挙動

式(3)の相関曲線の例を図2に示します。ここで、 $N=10$ (a) (b)と50 (c)、相関時間 $\tau_D=100$ (a) (c)と10000 (b)で、 ω/z は0.2です。分子数 N が増えると蛍光変動は小さくなり、したがって相関値も小さくなります。また分子半径が大きくなると、分子の動きはゆっくりとなり相関関数は長い方向にシフトします。



トします。

2 アプリケーション

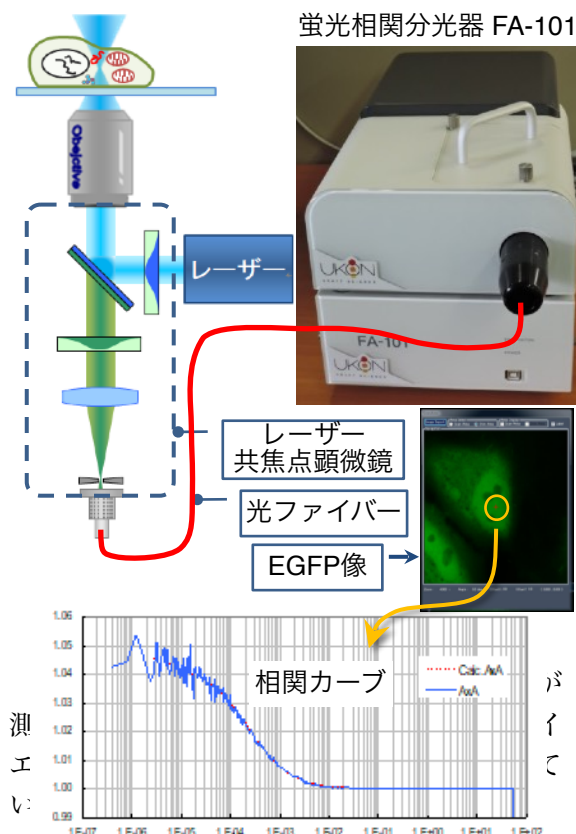
レーザー共焦点顕微鏡と高感度検出器により一分子の測定ができます。FCSは、蛍光の強度変動から、分子の挙動を*in-vivo*また*in-vitro*で測定できます。アプリケーションとして、(1)拡散性・移動速度、(2)局所濃度、(3)会合-解離速度、(4)局所の環境評価があります²⁻⁴。細胞内の構造体の違いも測定できます。

3 装置の構成

右近工舎のFCSは市販のレーザー共焦点顕微鏡⁶にオプションとして装着できることを特徴としており、異なるタイプの顕微鏡に光ファイバーで接続できます(図3)。

蛍光イメージから測定したい部位にレーザーを照射します。強度変動している蛍光は、光ファイバーに集光され蛍光相関測定装置(FA-101)に導入されます。FA-101には最小ゲート幅400 nsの自己相関器が組み込まれており、相関カーブとして出力されます。こ

の相関カーブを式(3)でフィッティングし、相関係数や分子数を求めます。



【文献】 図3 装置構成と相関測定

1. 蛍光分光とイメージングの手法、御橋・廣真 (編集) 学会出版センター (2006/06)
2. 新・生細胞蛍光イメージング、原口・木村・平岡 (編集)、共立出版、新版 (2015/11/25)
3. Principles of Fluorescence Spectroscopy (3rd ed), Joseph R Lakowicz, Springer (2017)
4. "Single Molecule Detection in Solution: Methods and Applications", C. Zander, J. Enderlein, R. Keller (Eds), Wiley-VCH (2002)
5. Rigler, R., Mets, Ü., Widengren, J. et al. Eur Biophys J (1993) 22: 169
6. <http://www.nikon-instruments.jp/jpn/bioscience-products/confocal>