

Readout

HORIBA Technical Reports

特集 粒子をはかる

January 1992 ■ No.4

時間分解蛍光分光光度計を用いた
蛍光偏光解消による分子の大きさの測定

Determination of Molecular Size by
Fluorescence Depolarization Using A Time-
Resolved fluorescence Spectrometer

南 孝明
Takaaki MINAMI

(Pages48-52)

株式会社 堀場製作所

時間分解蛍光分光光度計を用いた 蛍光偏光解消による分子の大きさの測定

Determination of Molecular Size by Fluorescence Depolarization Using A Time-Resolved Fluorescence Spectrometer

南 孝明

Takaaki Minami

要 旨

発光現象を測定する際、発光スペクトルだけではなくその時間変化もとらえることにより、スペクトルのみからは得られない情報を得ることができる。当社の発売する時間分解フォトルミネッセンス・蛍光分光光度計 NAES-700は、発光現象の時間変化を測定する装置である。本稿では、この NAES を用いた測定の応用例として時間分解蛍光偏光解消法を用い溶液中での生体内蛋白質分子の大きさーアポミオグロビン分子の実効体積ーの測定について紹介する。

Abstract

During observation of emission phenomena, by making a time-resolved measurement in addition to looking at the emission spectrum, we can obtain information not otherwise accessible if we observe only the spectrum. The Model NAES-700 time-resolved photoluminescence and fluorescence spectrometer, distributed by Horiba, is an instrument for measuring the time-resolved emission phenomena. This paper discusses an example of measurement using the NAES. In this example we use the time-resolved fluorescence depolarization method to determine the size of protein molecules in an aqueous solution, i.e., the determination of the effective volume of apomyoglobin molecules.

1. はじめに

分子を構成している電子が一番エネルギーの低い状態の時、分子は安定に存在している。分子が光などのエネルギーを吸収すると、電子はエネルギーの高い状態になり、不安定になる。すると分子は安定になるために、しだいに電子のエネルギーを放出してもとの状態に戻ろうとする。このとき、分子はエネルギーを光や熱として外部に放出する。

一般にこの光は、半導体の場合にはフォトルミネッセンスと呼ばれ、有機物の場合には蛍光と呼ばれる。当社の販売している NAES-700は、半導体のフォトルミネッセンスから有機、無機物質の蛍光過渡現象を測定できる装置として時間分解フォトルミネッセンス・蛍光分光光度計と命名された¹⁾。

本稿では、有機物質を用いた場合に限定し、以下この発光を蛍光と呼ぶ。蛍光を出す過程で、エネルギーを失う速さの目安となるものが蛍光寿命で、蛍光

減衰の速度の逆数で表される。

蛍光寿命は、分子の電子緩和の程度を表し、分子の電子構造、エネルギーのやりとりの速度、分子の回りの局所的な流動性、などの物性定数と関係づけられる。その実例を以下に示していく。

蛍光偏光解消には、定常法によるものもあるが、本稿では時間変化(時間分解蛍光偏光解消法)のみを対象とする。

2. 蛍光寿命^{2,3)}

蛍光の減衰は、単純な場合、以下のような指数関数で表される。

$$I(t) = I_0 \cdot \exp(-t/\tau) \quad \dots\dots\dots (1)$$

$I(t)$ は蛍光強度の時間変化、 I_0 は発光の開始時点での蛍光強度、 t は経過時間、 τ は蛍光寿命を表している。この蛍光強度の時間変化は、横軸に時間、縦軸に蛍光強度の対数をとると図1に示したような直線関係のグラフになる。この直線の傾きが $(-1/\tau)$ である。

試料にパルス光をあて、蛍光寿命を測定する場合を考える。図2に示すように、試料の蛍光減衰の程度が速いつまり蛍光寿命が短いと、パルス光の持続時間が問題となる。持続時間が長いパルスAで、試料の真の蛍光減衰曲線Bを測定するとAとBが畳み込まれ(コンボリュート)て、観測可能な蛍光減衰曲線Cを測定することになる。測定できるのはAとCで、知りたいのはBである。AとCから、Bを求める演算をデコンボリューションという。

当社の販売しているNAESシリーズでは、蛍光減衰曲線が3つの指数関数の和で表されるような減衰曲線までデコンボリューション演算が可能である。

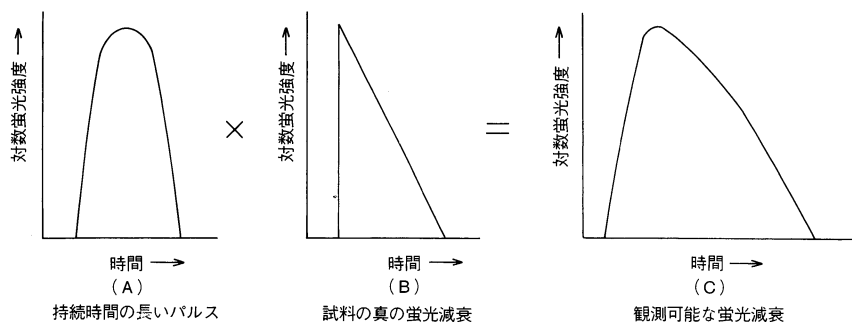


図2 蛍光減衰曲線とコンボリューション
Fluorescence decay curves and convolution operation

3. 蛍光偏光解消法の理論^{3,4)}

偏光した光で分子を励起すると、偏光に応じた遷移モーメントを持つ分子しか励起できない(図3)。また、励起された分子からの発光も偏光する。この偏光の変化を測定することで、分子の挙動を知ることができる。この発光の偏光の度合いは注目している分子によって異なる現象に基づいて減少するので、一般に偏光解消と呼ばれている。

偏光解消を引き起こす原因となるものに分子の回転拡散がある。拡散は溶媒の粘度と、拡散する分子の大きさや形に依存している。そこで、偏光解消を測定することで、分子の大きさを見積ることができる。その手順を以下に示す。まず異方性 $r(t)$ を求め、次に回転相関時間 ϕ 、そして実効体積 V を求める。

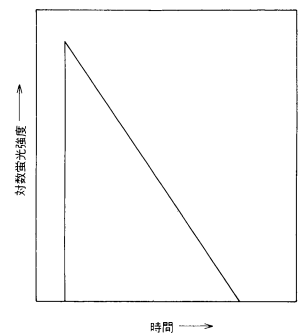


図1 蛍光減衰曲線の時間変化(単一指数関数の場合)
Time dependence of a fluorescence decay curve

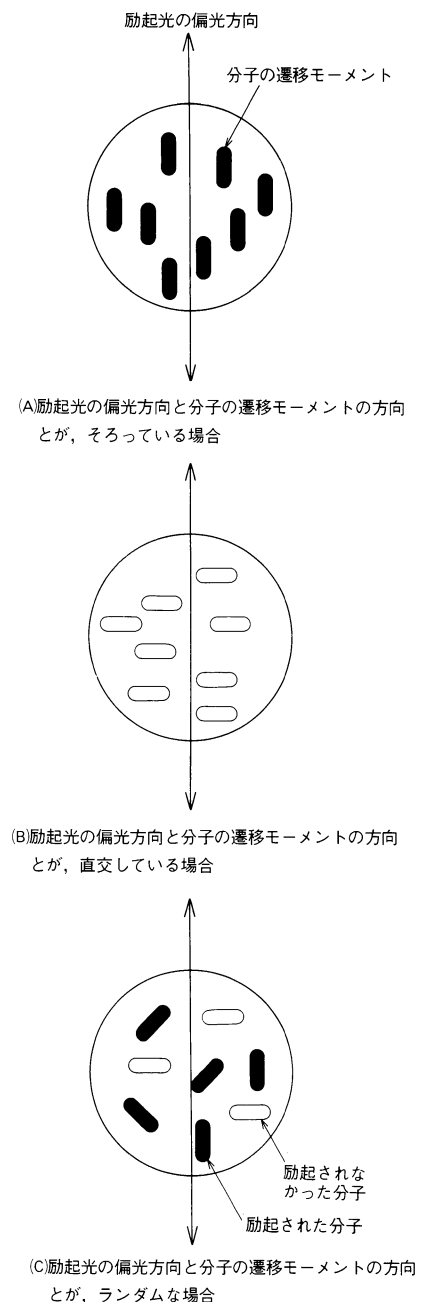
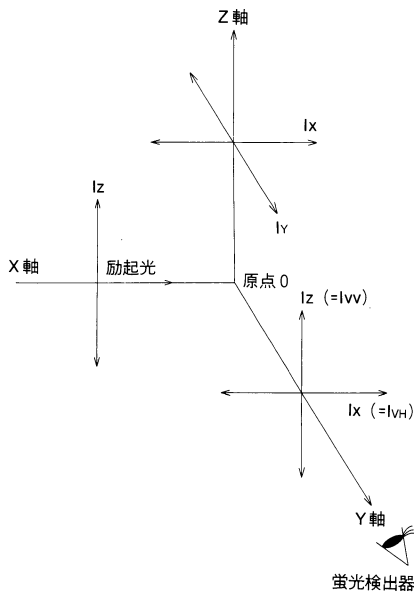


図3 偏光による励起と分子の遷移モーメント模式図
Polarized excitation and transition moment



lx, ly, lz は、それぞれ XYZ 軸に沿った座標を表す。
X 軸から、鉛直偏光の励起光を用い、観測側での鉛直偏光 (I_{VV})、水平偏光 (I_{VH}) を表す。

図 4 蛍光偏光測定—原理図
Fluorescence depolarization measurement—principle—

3.1 異方性

異方性 $r(t)$ は、全強度と偏光成分の比で定義される。

$$r(t) = \text{偏光成分} / \text{全強度} \quad \dots\dots\dots (2)$$

図 4 のように記号を決める。原点にある試料を X 軸方向に沿って励起し、Y 軸方向に沿って観測することとする。

鉛直偏光の光 (X 軸方向に沿った Z 軸方向の光 I_z) で励起するときの観測側の鉛直偏光 (Y 軸に沿った Z 軸方向の光 I_z)、観測側の水平偏光 (Y 軸に沿った X 軸方向の光 I_x) の蛍光強度をそれぞれ $I_{VV}(t)$ 、 $I_{VH}(t)$ とする。

式 (2) 右辺の分子は、

$$\begin{aligned} \text{偏光成分} &= \text{Z 軸方向の光} - \text{X 軸方向の光} \\ &= I_{VV}(t) - I_{VH}(t) \end{aligned} \quad \dots\dots\dots (3)$$

式 (2) 右辺の分母は、

$$\text{全強度} = \text{Z 軸方向の光} + \text{X 軸方向の光} + \text{Y 軸方向の光} \quad \dots\dots\dots (4)$$

このとき、全方向に同じように発光していると仮定すると、X 軸方向の光と Y 軸方向の光の強度は同じなので、Y 軸からの観測だけで全強度が求まる。

$$\text{全強度} = \text{Z 軸方向の光} + 2 \cdot \text{X 軸方向の光} \quad \dots\dots\dots (5)$$

となり、Z 軸方向の光は $I_{VV}(t)$ 、X 軸方向の光は $I_{VH}(t)$ なので

$$\text{全強度} = I_{VV}(t) + 2 \cdot I_{VH}(t) \quad \dots\dots\dots (6)$$

したがって異方性 $r(t)$ は式 (2) に上記の関係を代入し次式で定義される。

$$r(t) = \frac{I_{VV}(t) - I_{VH}(t) \cdot g}{I_{VV}(t) + 2I_{VH}(t) \cdot g} \quad \dots\dots\dots (7)$$

$$g = \int_0^t I_{HV}(t) dt / \int_0^t I_{HH}(t) dt \quad \dots\dots\dots (8)$$

$I_{HV}(t)$ 、 $I_{HH}(t)$ は、それぞれ水平偏光で励起するときの鉛直偏光、水平偏光の蛍光強度である。 g は、鉛直偏光と水平偏光に対する測定系の感度の差に基づく補正因子である。

3.2 回転相関時間

回転ブラウン運動において堅い球が運動するという剛体球近似をとると異方性比 $r(t)$ は次式のように回転相関時間 ϕ を時定数とする指数関数で減衰する。 t は時間、 r_0 は発光の開始時点での異方性を表す。

$$r(t) = r_0 \cdot \exp(-t/\phi) \quad \dots\dots\dots (9)$$

実際の実験で得られる $I_{VV}(t)$ 、 $I_{VH}(t)$ は、光源の波形 $P(t)$ の時間的な広がりの影響を受けるため、得られる $r(t)$ や ϕ も光源の波形の影響を含んでいる。

光源の影響を取り除くためには式 (7) の分子と分母のコンボリュートされた波形を求めなければならない、それぞれ $I_D(t)$ 、 $I_T(t)$ とすると、下の式で表される。

$$I_{VV}(t) - I_{VH}(t) \cdot g = \int_0^t P(t') I_D(t-t') dt' \quad \dots\dots\dots (10)$$

$$I_{VV}(t) + 2I_{VH}(t) \cdot g = \int_0^t P(t') I_T(t-t') dt' \quad \dots\dots\dots (11)$$

$I_D(t)$ 、 $I_T(t)$ とともに単一指数関数で表わせると仮定すれば、次のようになる。

$$I_D(t) = A_D \cdot \exp(-t/\tau_D) \quad \dots\dots\dots (12)$$

$$I_T(t) = A_T \cdot \exp(-t/\tau_T) \quad \dots\dots\dots (13)$$

従って、 $I_{HV}(t)$ 、 $I_{HH}(t)$ を測定し、式 (8) で g を求め、 $I_{VV}(t)$ 、 $I_{VH}(t)$ の測定をおこない、式 (10)、(11) の左辺の演算を行い、その合成された減衰曲線をデコンボリューションすることで、 A_D 、 τ_D 、 A_T 、 τ_T を求めることができる。

光源の波形の時間的な広がり（ τ ）の影響を取り除いた異方性と回転相関関数をそれぞれ $r(t)$, ϕ とする。式(7)に式(10), (11)を代入すると

$$r(t) = I_D(t)/I_T(t) \quad \dots\dots\dots(14)$$

となる。式(14)に式(12), (13)を代入し, $t=0$ とすると r_0 が求まる。

$$r_0 = A_D/A_T \quad \dots\dots\dots(15)$$

式(9)に式(12), (13), (15)を代入すると, ϕ が求まる。

$$\phi = (\tau_T \cdot \tau_D) / (\tau_T - \tau_D) \quad \dots\dots\dots(16)$$

3.3 実効体積

回転相関時間 ϕ (s) は, 絶対温度 T (K), 溶媒の粘性係数 η (Pa·s), 分子の実効体積 V (m^3) およびボルツマン定数 k_B ($1.38 \times 10^{-23} J \cdot K^{-1}$) を使うと次のように表せる。

$$\phi = V \eta / k_B T \quad \dots\dots\dots(17)$$

式(16)によって回転相関時間 ϕ を求めることができるので, 溶媒の粘性係数 η がわかれば, 分子の実効体積 V が求まり, 逆に分子の実効体積 V がわかっている場合は, 溶媒の粘性係数 η が求まる。

4. 偏光解消法の実験例 “アポミオグロビンの実効体積⁵⁾”

ANS (1-aminonaphthalene-8-sulfonate, 図5) という蛍光色素を吸着させたアポミオグロビン (生体内で酸素を貯蔵をする役割を持つ蛋白質, 球状) をリン酸緩衝液 (pH7.2, $10^{-3}M$) に溶かし, 偏光解消を測定したデータを図6に示す。(測定条件: 液温20°C, 励起波長350nm, 観測波長>420nm)

NAES により τ_T と τ_D を求めるとそれぞれ14.5ns, 5.67nsとなる。式(16)に代入すると ϕ は9.3nsとなる。(nsは10億分の1秒)

粘性係数 η を $1.06 \times 10^{-3} Pa \cdot s$ とし, 式(17)に代入すると, 実効体積 V は $3.55 \times 10^{-26} m^3$ と求まる。球状なので d を直径とすると, $V = 4/3 \cdot \pi (d/2)^3$ より $d = 4.08nm$ となる。このようにアポミオグロビン粒子は直径4.08nmと求められた。

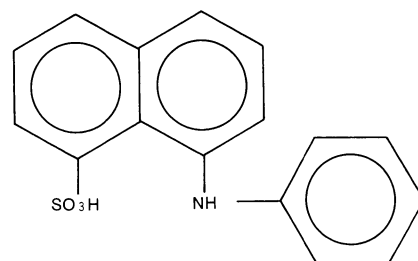


図5 ANSの化学構造
1-aminonaphthalene-8-sulfonate

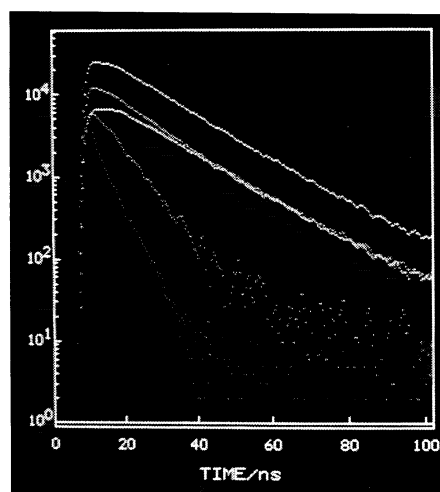


図6 アポミオグロビン-ANSの蛍光偏光測定による減衰曲線
Apomyoglobin-ANS time-resolved fluorescence depolarization measurement

5. まとめ

以上述べたように、蛍光偏光を用いることで分子の大きさを見積もることができる。蛍光法には、いろいろな応用があり、さらに時間分解法を用いることで、その応用範囲を広げることができる。本稿で述べた方法も定常法を用いて行くと、変数が増え、多数の実験が必要となる。

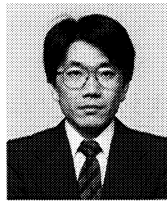
時間分解蛍光法の応用を広げる上で、NAESシリーズが活用されることを期待している。

〈謝辞〉

北海道大学応用電気研究所助教授荒磯恒久先生に試料の提供と実験を行っていただきました。ここに紙面をかり御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 横山一成 “時間分解フォトルミネッセンス法による半導体デバイスの評価” READOUT.NO.2, (1991)p.27-36.
- 2) D.V.O'Connor, D.Phillips “ナノ・ピコ秒の蛍光測定と解析法：時間相関単一光子計数法” 学会出版センター。(1988), p.40-48, p.153-205.
- 3) 木下一彦, 御橋広真編 “蛍光測定：生物科学への応用” 学会出版センター。(1983) p.2-43, p.99-160.
- 4) J.R.Lackowicz “Principles of Fluorescence Spectroscopy” Plenum, (1983) p.112-181.
- 5) 堀場カタログ “NAES-700” (1990).



南 孝明

Takaaki Minami

開発1部

1958年4月7日生

京都工芸繊維大学大学院

繊維学研究科繊維化学専攻

