

Selected Article

一般論文

蛍光分光光度計FluoroMax™-4の生物学および生化学分野のアプリケーションについて

Lin Chandler, Stephen M. Cohen

HORIBA Jobin Yvon(ホリバジヨバンイボン)社の新しい蛍光分光光度計FluoroMax™-4は、自動偏光子ユニット、リン光測定ユニット、時間分解寿命測定ユニット等の多彩なオプションを搭載することができる。遺伝子発現の生化学的研究や、生体分子間の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)、生体環境における蛍光異方性測定に最適な装置である。

はじめに

蛍光分光光度計FluoroMax™-4は、学術研究分野に最適な装置で、生体分子内部または分子近傍の局所環境を研究するため、自動偏光子ユニット、リン光測定ユニット、時間分解寿命測定ユニットが用意されている。本稿ではいくつかの実例を挙げてアプリケーションを紹介する。

モレキュラービーコンを用いたアプリケーション

遺伝子発現の研究において、生体内反応を追跡するため“モレキュラービーコン(一本鎖DNA(ssDNA))”と呼ばれる蛍光基(ドナー)と消光基(アクセプター)を有するヘアピン状のオリゴヌクレオチドが利用される。このヘアピン状部分の両末端は互いに対となる相補的DNA(cDNA)となっており、ハイブリダイゼーションが起こると蛍光基と消光基が近接して蛍光はほとんど発生しない。モレキュラービーコンは酵素の相互作用、cDNAの配列決定、バイオセンシング等の研究に利用されている^[1,2]。

モレキュラービーコンの消光には、直接的なエネルギー移動と蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)による2つプロセスがある。蛍光基と消光基が接近すれば直接エネルギー移動が起きて熱エネルギーが放散される。一方、より離れた距離(2~10 nm, 20~100 Å)では、蛍光基の発

光スペクトルと消光基の吸収スペクトルに重なりが生じFRETが起こる^[3]。

ssDNAのループがcDNAに遭遇するとヘアピンが自発的に開き、ssDNAとcDNAがハイブリダイズされて、蛍光基と消光基が離れるため、蛍光基からの蛍光発光が増大する(図1)。ハイブリダイゼーションの程度は蛍光強度に比例する。ssDNAは熱の影響によっても開く。ssDNAを加熱すると両腕が分離して蛍光基と消光基が離れるため蛍光を発する。

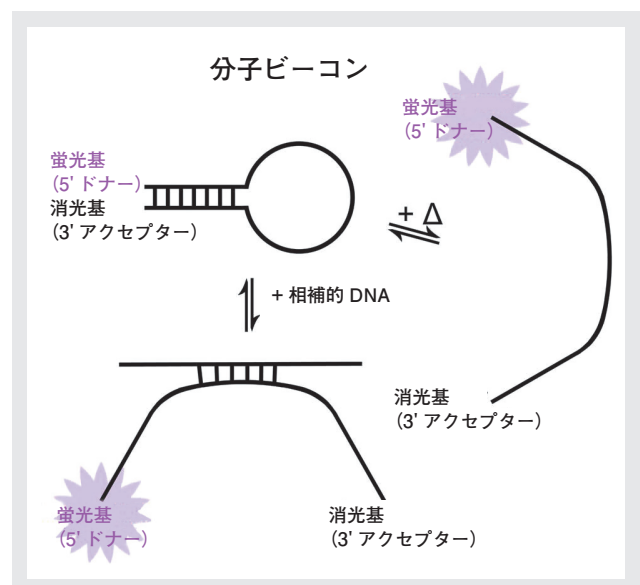


図1 モレキュラービーコンのループが開くと蛍光が発生する二つの過程 (左)cDNAとのハイブリダイゼーション, (右)加熱処理

生化学分野におけるモレキュラービーコンを使った実験の一例を示すものとして、蛍光色素(テトラクロロ-6-カルボキシフルオレセイン(TET), $\lambda_{em} = 447 \text{ nm}$)をssDNAの5'末端に、消光基(QSY)を3'末端に結合させた。蛍光分光光度計FluoroMax™-4を用いてssDNAを521 nmで励起し、サンプルを20~95 °Cの温度範囲において変化させながら525~675 nmの範囲で発光スペクトルを測定した。温度上昇に従ってヘアピンループの腕が離れ、蛍光色素(TET)と消光基(QSY)が遠ざかることにより蛍光発光が増大する(図2)。

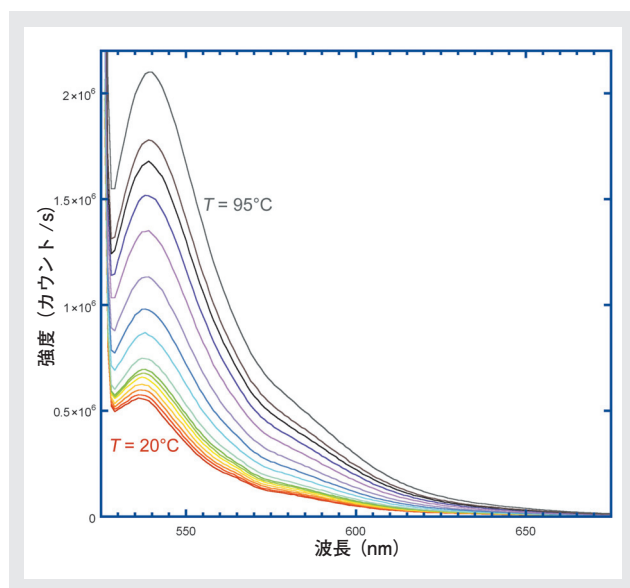


図2 サンプル温度を20~95 °Cの範囲で変化させた場合のTET(蛍光基)およびQSY(消光基)を備えたssDNAの発光スペクトル($\lambda_{exc} = 521 \text{ nm}$)。サンプル温度が上昇するにつれて蛍光基と消光基との距離の増大し蛍光強度が増加する。

FluoroMax™-4Pによる蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の測定

蛍光分光光度計FluoroMax™-4Pにリン光測定ユニットを装備したシステムをFluoroMax™-4Pと呼んでおり、強い短寿命の蛍光による妨害を受けることなく長寿命のリン光のみを効率よく測定することができる。このリン光測定によって化学や生化学における種々の興味深い系について重要な情報を得ることができる。その一例としてドナーであるペプチド・テルビウム複合体からアクセプターであるフルオレセインへの蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)がある。複合体中のペプチドは280 nmの励起光を吸収して365 nmで発光する。テルビウムは365 nm付近でこの光を吸収して、485 nmでリン光を発生する。このリン光をフルオレセインが吸収して発光が起こる。リン光測定ユニットを用いて、280 nmの光で複合体を励起し

たとき520 nmでフルオレセインからの蛍光発光を観測する。

ペプチド・テルビウム複合体を水溶液とし、いくつかの試料にはフルオレセインを加えた。光源にはリン光測定用にキセノンフラッシュランプを用い、検出器には光電子増倍管(R928)を用いた。リン光測定ユニットを備えたFluoroMax™-4Pでは、光パルスにより試料を励起し、検出ウィンドウを開くタイミングと長さを可変的に制御できる。この測定では試料を280 nmの光で励起して100回のフラッシュで測定した。リン光スペクトル検出において積算時間は0.2 sに設定した。スペクトルのスキャンは常温常圧で行った。

リン光種はテルビウム(Tb)であることが実験から確認された。ペプチド・テルビウム複合体にフルオレセイン0.67 μM を加えた場合と加えない場合、キセノンフラッシュランプによるパルス励起の間に50 μs の遅延時間のある場合とない場合について、3つの発光種(ペプチド、テルビウム(Tb)、フルオレセイン)に対するプロットを図3に示した。363 nm付近の偽発光は、検出ウィンドウに50 μs の遅延時間を与えることで除去する。図3において、赤色の曲線で示すように遅延時間をかけない状態では蛍光とリン光が混じった状態で発光スペクトルが測定される。青色と緑色の曲線からフルオレセインの有無に関する違いが容易に比較され、511 nmにおけるフルオレセインのリン光発光は複合体からフルオレセインへのエネルギー移動によって起こることが示される。

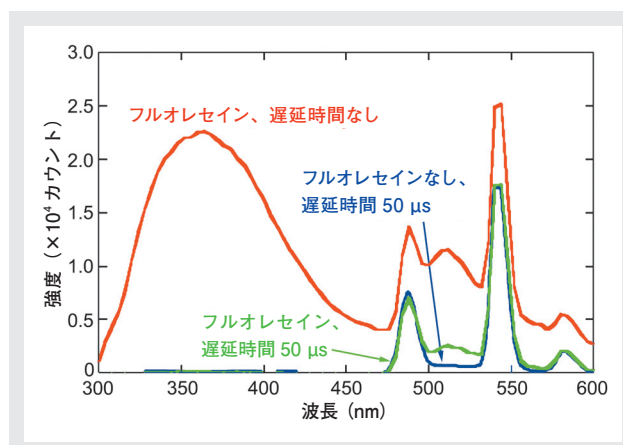


図3 ペプチド・テルビウム・フルオレセイン複合体の蛍光スペクトル(赤線)フルオレセイン0.67 μM 添加、励起後の遅延時間なし(緑線)フルオレセイン0.67 μM 添加、励起後の遅延時間50 μs (青線)フルオレセイン添加なし、励起後の遅延時間50 μs 。励起側および発光バンドパス5 nm、50 μs の遅延時間によりフルオレセインへのエネルギー移動による蛍光が除かれている。

時間相関単一光子計数(TCSPC)方式の時間分解寿命測定ユニットを用いて寿命測定を行ったところ(図4)、ド

ナーのみの蛍光寿命 τ_D (図示なし)が1.77 msに対して、テルビウム-フルオレセイン(ドナーとアクセプター)複合体の蛍光寿命 τ_{DA} は1.41 msであった。複合体の蛍光寿命の方が短いことはエネルギー移動を示唆している。

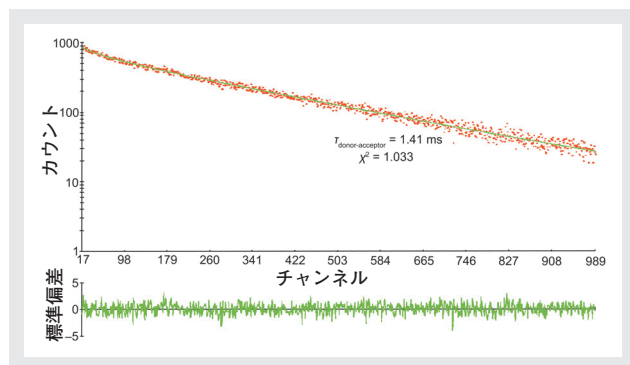


図4 テルビウム-フルオレセイン複合体の蛍光減衰曲線
解析フィッティングにより求めた蛍光寿命 $\tau = 1.41$ ms ($\chi^2 = 1.033$)

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の効率 E は式(1)で求められる。

$$E = 1 \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \dots (1)$$

$$= 0.205$$

フェルスター (Förster) 距離 R_0 は43.4 Å。ドナーとアクセプターとの距離 R_{DA} はこの R_0 の値を用いて式(2)^[4]により求められる。

$$R_{DA}^6 = \frac{R_0^6 - E(R_0^6)}{E} \dots (2)$$

$$R_{DA} = 54.4 \text{ \AA}$$

蛍光異方性を用いたアプリケーション

蛍光分子に偏光が当たると偏光蛍光が発生するが、次第に非偏光蛍光に戻り、その速度は回転拡散やその他の要因に依存する。“蛍光異方性”は偏光に直接関連しており、全光強度に対する偏光成分の比として定義される。蛍光分光光度計に偏光子ユニットを装着して、励起側の偏光子と発光側の偏光子を共に垂直方向に配置したときの発光強度を I_{VV} 、共に水平方向に配置したときの発光強度を I_{HH} 、励起側の偏光子を水平方向、発光側の偏光子を垂直方向に配置したときの発光強度を I_{HV} 、励起

側の偏光子を垂直方向に、発光側の偏光子を水平方向に配置したときの発光強度を I_{VH} とする。基本的な偏光子の設定(Lフォーマット)を図5に示す。蛍光分光光度計 FluoroMax™-4では、自動偏光子ユニットをアクセサリとして装着することで、Lフォーマットでの偏光測定を行うことができる。

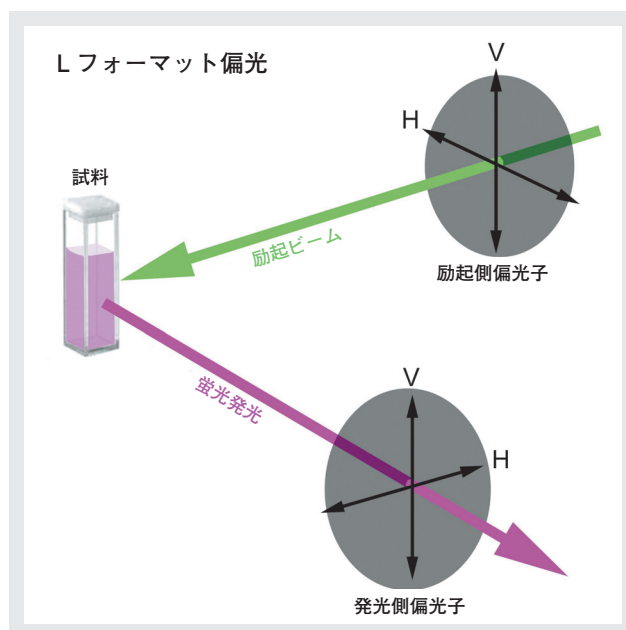


図5 Lフォーマットでの蛍光偏光の説明図
各偏光子の垂直方向(V)および水平方向(H)を示す。

蛍光異方性 $\langle r \rangle$ は式(3)で定義される^[5]。

$$\langle r \rangle = \frac{I_{VV} - G * I_{VH}}{I_{VV} + 2 * G * I_{VH}} \dots (3)$$

このG、つまりGファクターは式(4)で定義され、

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \dots (4)$$

蛍光異方性 $\langle r \rangle$ と偏光 P との関係は式(5)で示される。

$$P = \frac{3\langle r \rangle}{2 + \langle r \rangle} \dots (5)$$

蛍光異方性 $\langle r \rangle$ または偏光 P を決定するには、各偏光子の方位毎の4つの強度測定が必要である。

蛍光異方性の測定により、分子の大きさや形状、また蛍光団近傍の局所的粘度に関する情報が得られ、またポリ

