

蛍光共鳴エネルギー移動の溶媒依存性

邨次敦、渡辺純二、木下修一

大阪大学・大学院生命機能研究科、565-0871 吹田市山田丘

Solvent dependence of fluorescence resonance energy transfer

A. Muratsugu, J. Watanabe and S. Kinoshita

Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, Suita, 565-0871

Fluorescence resonance energy transfer between rhodamine 6G (donor) and malachite green (acceptor) in various alkyl alcohols has been investigated by a streak camera on a nanosecond time scale at room temperature. Donor fluorescence decays show that the mechanism of energy transfer is attributed to the dipole-dipole interaction between the donor and acceptor molecules in every solvent examined. The effect of translational diffusion is observed and diffusion coefficients have been estimated from parameters that obtained by fitting. We have found that the diffusion coefficients thus obtained are reasonable as compared with the size of dye molecules.

1. はじめに

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)は、電子励起エネルギーが、ドナー分子からアクセプター分子へ、無輻射で移動する現象である。分子間の距離に敏感であるため、いわばマイクロな「ものさし」としてタンパク質の構造決定をはじめとする蛍光分析、生体分子のイメージングなどに応用されている[1]。しかし、多くの生体系では物質の拡散やエネルギーの緩和が起きており、これらの現象がFRETに影響を与えると考えられ、「ものさし」の精度が悪くなってしまうことが考えられる。このようなダイナミックな振る舞いを正

確に調べるためには、系からの発光の時間分解測定が必要となる。FRETによるドナー分子の発光時間特性は、並進拡散がない場合は Förster [2]によって、ある場合は Gösele ら[3]によって理論的に求められている。しかしながら、系統だった実験的研究は無く、十分な理解が得られていない。前回の光物性研究会(2010年度)においてFRETの温度依存性を調べ、温度が高い場合は並進拡散の効果が顕著に現れることを報告した。今回、さらにFRETと並進拡散との関係を調べるために、様々な溶媒を用い、アクセプター濃度依存性を測定し解析を行った。

2. 実験

ドナー分子としてローダミン 6G、アクセプター分子としてマラカイトグリーンを用いた。溶媒はメタノールからオクタノールまでの直鎖アルキルアルコールを用いた。ローダミン 6G の濃度は 1.0×10^{-4} mol/l とし、マラカイトグリーンは 4.0×10^{-3} mol/l から 0.25×10^{-3} mol/l まで変化させた。測定には試料の厚さが 0.1 mm の石英セルを使用した。

吸収スペクトルの測定には分光光度計を用いた。発光スペクトル及び時間分解測定には、励起光として再生増幅モード同期 Ti:Sapphire レーザーの光を非同軸パラメトリック増幅器によって波長変換 (1590 nm) し、さらにその 3 倍波 (530 nm、HWHM=5 nm) を用いた。発光の測定には、ストリークカメラを用いた (波長分解能は 2.5 nm、時間分解能は 0.6 ns)。なお、レーザーの偏光方向に対し 54.7 度になるように、ストリークカメラとサンプルの間に偏光板を挿入した。発光スペクトルはストリークカメラで得られたデータを全時間領域で積分して求め、発光の時間特性は、ドナー分子の発光波長領域である 540 nm から 620 nm のデータを積分して求めた。すべての実験は室温 (297K) で行なった。

3. 結果と考察

アクセプター分子の濃度が 4.0×10^{-3} mol/l である場合の、いくつかの溶媒におけるドナー分子の発光の時間特性を図 1 に示す。アルキル基の側鎖が長くなるにつれて発光の減衰が緩やかになることがわかった。このデータを次のモデル式 (1) でフィットし、A および B をそれぞれの溶媒に対して求めた。

$$I(t) = I_0 \exp(-A\sqrt{t} - Bt) \quad (1)$$

なお、フィッティングにおいて、式 (1) と装置関数をコンボリューションしたものを、最小二乗法によってフィットさせ

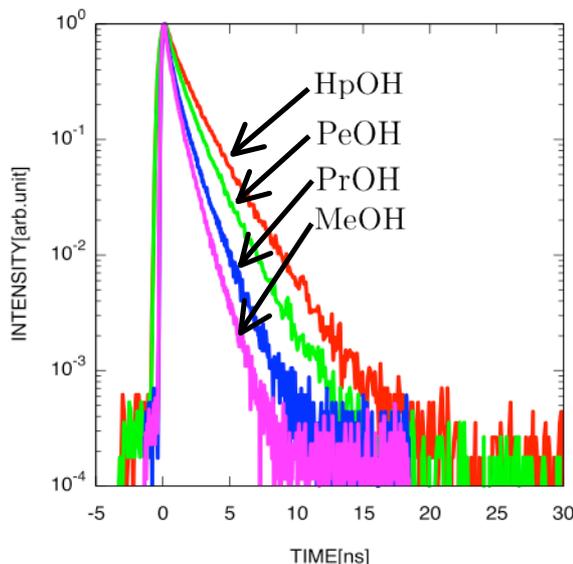


図 1, ドナー分子の発光の時間変化の溶媒依存性

た。並進拡散がない場合、Förster によると t の係数 B は式 (2) で与えられ [2]、並進拡散の効果を考慮に入れた場合は式 (3) で与えられることが Gösele らによって示されている [3]。また \sqrt{t} の係数 A はいずれの場合も式 (4) で与えられる [2, 3]。

$$B = \frac{1}{\tau_D} \quad (2)$$

$$B = \frac{1}{\tau_D} + 4\pi D r_F N_A C_A \left(r_F \approx 0.676 (R_0^6 / D \tau_D)^{1/4} \right) \quad (3)$$

$$A = \frac{2\gamma}{\sqrt{\tau_D}} \quad (4)$$

ここで τ_D はアクセプター分子が存在しない場合のドナーの寿命、D は拡散係数、 N_A はアボガドロ定数である。また、 γ は

$$\gamma = \frac{2\pi^{3/2} N_A C_A R_0^3}{3000} \quad (5)$$

で表される。 R_0 は臨界移動距離と呼ばれエネルギー移動の起こりやすさを表す指標である。ドナー - アクセプター間の双極子-双極子相互作用によって励起エネルギーが移動する場合、 R_0 はドナー分子の発光スペクトルとアクセプター分子の吸収スペクトルを用いて次の式 (6) で表

される[2]。

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln 10 \Phi_D \kappa^2}{128 \pi^5 N_A n^4} \times \int_0^\infty F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (6)$$

ここで $F(\lambda)$ は面積で規格化したドナー分子の発光スペクトル、 $\varepsilon(\lambda)$ はアクセプター分子のモル吸光係数、 κ は分子の向きに関係した配向因子、 n は溶媒の屈折率、 Φ_D はドナーの量子収率、 N_A はアボガドロ数である。

パラメータ A は式(4)及び式(5)より

$$A = \frac{2}{\sqrt{\tau_D}} \frac{2\pi^{3/2} N_A R_0^3}{3000} \times C_A \quad (7)$$

と書ける。アクセプター濃度 C_A に対して、発光の時間減衰のデータをフィッティングして求めた A の値をプロットすると、各溶媒とも濃度に対して線形に変化していることがわかった。図2にメタノールの場合を示す。そこで、その傾きから式(7)を用いて R_0 を求めた。さらに各溶媒について吸収及び発光スペクトル、量子収率などを測定し、式(6)によって R_0 を求めた。なお配向因子 κ^2 の値は分子の向

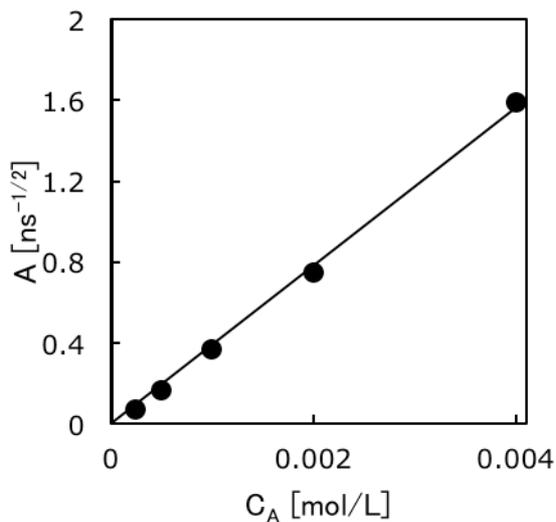


図2, メタノールにおける A の濃度依存性

表 1, 各溶媒に対する屈折率、量子収率、粘性率及び臨界移動距離

	n	Φ_D	η [mPas]	R_0 [Å] (式6)	R_0 [Å] (式7)
MeOH	1.33	0.93	0.52	57.6	58.8
EtOH	1.36	0.93	1.20	57.2	57.4
1-PrOH	1.39	0.94	2.00	55.4	55.9
1-BuOH	1.40	0.94	2.50	51.2	55.6
1-PeOH	1.41	0.94	3.50	50.4	55.0
1-HxOH	1.42	0.94	4.00	48.4	54.3
1-HpOH	1.42	0.94	5.80	45.4	53.1
1-0cOH	1.43	0.94	7.28	44.7	52.5

きがランダムであると仮定し $2/3$ とした。

2つの方法で求めた R_0 の値を量子収率、屈折率、粘性とともに表1に示す。アルキル基の長さが伸びるにつれて2つの R_0 の値は少しずつくるが、ほぼ一致していることがわかった。このことから、分子間のエネルギー移動の機構は、双極子-双極子相互作用によるものであると結論づけることができる。

次に、各濃度における $B\tau_D^{-1}$ の値をアクセプター濃度 C_A に対してプロットすると、濃度に対して線形に変化することがわかった。例としてメタノールの場合を図3に示す。各溶媒について、 $B\tau_D^{-1}$ の

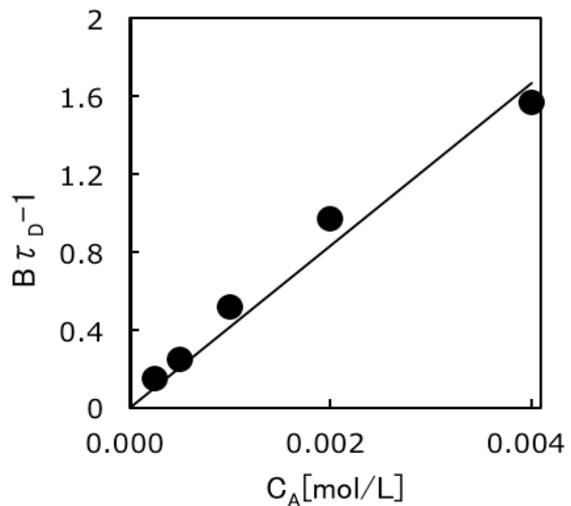


図3, メタノールにおける $B\tau_D^{-1}$ の濃度依存性

値を C_A に対してプロットし、その傾きを求めた。この傾きを β とすると式 (3) より

$$B \tau_D - 1 = 4 \pi \tau_D D r_F N_A C_A \quad (8)$$

であるから

$$\beta = 4 \pi \tau_D D r_F N_A \quad (9)$$

となる。拡散係数 D は式 (9) 及び r_F の式 (3) 下段) を用いた次の式から見積もることができる。

$$D = \left[\frac{\beta}{C (R_0^2 \tau_D)^{3/4}} \right]^{4/3} \quad (10)$$

ここで $C = 4 \pi \times 0.676 N_A$ であり、 R_0 の値は式 (6) より求めた値を用いた。各溶媒の粘性率の逆数に対して、式 (10) で求めた D の値をプロットしたものが図 4 である。これより D は粘性率の逆数に比例していることがわかった。そこでこの傾きから剛体球に対するストークス - アインシュタインの式

$$D = \left(\frac{k_B T}{6 \pi \eta r} \right) \frac{1}{\eta} \quad (11)$$

を用いて、粒子の半径 r を計算すると $r = 0.35 \text{ nm}$ となった。この値は今回用いたローダミン 6G やマラカイトグリーン

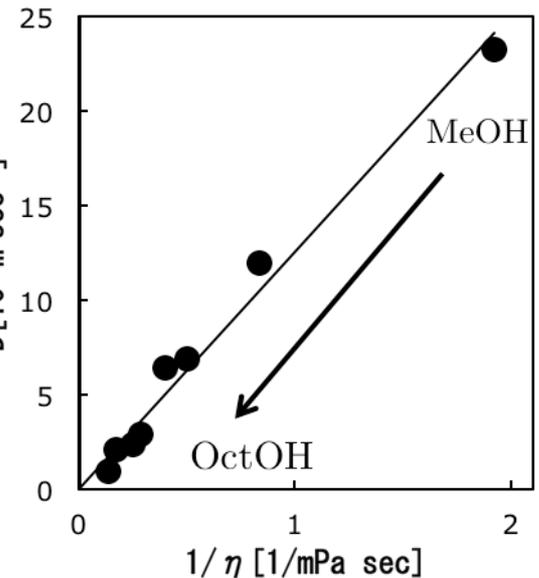


図 4, 拡散係数の粘性率依存性

さが 5 \AA 程度) に対して矛盾のない大きさであるといえる。このことより、アルキル基が長くなると、ドナー分子の発光の時間減衰が緩やかになるのは、溶媒の粘性率が増加し、色素分子の拡散が抑制されたと考えることで説明できる。

4. まとめ

マラカイトグリーンが存在する場合のローダミン 6G の発光時間特性を測定した。解析の結果、エネルギー移動のメカニズムは双極子-双極子相互作用によるものであることが分かった。また溶媒によるドナー分子の発光の減衰時間の違いは、粘性率の変化に伴う色素分子の拡散係数の違いに起因することが明らかになった。今後の課題として、2つの方法で求めた R_0 の値が、アルキル基の側鎖が長くなるにつれて少しずつ系統的にずれている点について検討する必要がある。

参考文献

- [1] J. L. Schwartz, Ann. Rev. Biochemistry 80 (2011) 327.
- [2] T. Förster, Z. Naturforsch. 4a (1949) 1321.
- [3] U. Gësele et al., Chem. Phys. Lett. 34 (1975) 519.