

ナノ精度の蛍光分子配置により合成された蛍光信号の スペクトル・寿命同時計測

[1] 組織

代表者：小倉 裕介
(大阪大学大学院情報科学研究科)
対応者：香川 景一郎
(静岡大学電子工学研究所)
分担者：西村 隆宏
(大阪大学大学院情報科学研究科)

[2] 研究経過

分子計測技術はライフサイエンスの進展に極めて重要である。細胞中では多様かつ大量の分子が機能しており、分子計測には膨大な分子情報の扱いが鍵となる。我々は、ウェット環境中で動作するナノスケール情報処理装置として、フォトニクスと DNA 技術を融合したフォトニック DNA プロセッサの開発を進めてきた。本ナノプロセッサは、分子系に対する計測、処理、制御をその場で (分子系に入り込んで) 行なうことを特徴とする。プロジェクトでは、この概念に基づき効率的に分子情報を取得するため、蛍光スペクトルと寿命として対象分子情報の符号化光信号を生成する手法の開発を目的とする。

これまでに、フォトニック DNA プロセッサの一形態として、DNA スキャットホルド論理 [T. Nishimura et al., Appl. Phys. Lett., 101, 233703 (2012).] を実証している。これは、入力分子情報に応じた DNA 足場上への蛍光分子の配置と、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いた分子情報に対する論理演算法である。初年度である本年度は、DNA を用いてナノ精度で蛍光分子を配置することで、出力蛍光のスペクトルと蛍光寿命を制御できることに着目し、符号化光信号を生成する技術について検討した。このように作製した構造体をここでは光 DNA ナノ構造体とよぶ。蛍光寿命は、静岡大学が開発した多点蛍光寿命計測システム [Z. Li et al., IEEE Trans. Electron Devices, 59, 2715 (2012).] を用いて計測した。さまざまな蛍光分子配置に対する蛍光信号を計測することで、相互の関係性を調査し、所望のスペクトル・寿命をもつ蛍光分子配置の設計に有用な知見を得た。

本年度中に研究打ち合わせは 3 回行った。第 1 回 (2014 年 8 月 26 日) では、手法の特徴について議

論し、超解像顕微鏡による分子計測を指向した方式で進めることを確認した。また、光 DNA ナノ構造体の蛍光寿命計測におけるパラメータを実験的に決定した。第 2 回 (2014 年 10 月 28 日) では、超解像を実現するための符号化、復号化法について議論し、FRET ネットワークを推定する観点から手法を整理した。また、異種および同種の蛍光を配置したナノ構造体の蛍光寿命を計測した。第 3 回 (2014 年 12 月 22 日) では、手法の特性を活かした計測対象について議論し、生体分子の形状や物理特性を継続的に検討することを確認した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本プロジェクトでは、まず、スペクトルと蛍光寿命を用いた符号化に基づく超解像顕微鏡法の概念を構築した (図 1)。対象の分子構造 (分布) を蛍光配置 (光 DNA ナノ構造体) に変換し、蛍光スペクトル・寿命の光属性として符号化する。次に、蛍光スペクトル・寿命を計測して符号化光分布を取得する。数理工的手法により、符号化光分布から FRET ネットワークを推定し、蛍光ナノ構造体と蛍光スペクトル・寿命の対応関係から、対象の分子構造を nm レベルの分解能で再構成する。代表的な超解像顕微鏡である Photoactivated localization microscopy では、時間軸を利用して各時刻の発光密度を疎にすることで点像分布関数を縮小するのに対し、本手法では光属性を用いて空間の一点がもつ情報量を増やすことで超解像を達成する。これらは相反するものではなく、融合によってより強力な超解像顕微鏡法となりうる。

発光スペクトルが符号化光信号として利用できることを確認するため、蛍光分子配置に対する発光スペクトルを計測した。蛍光分子として Cy3 (励起ピ

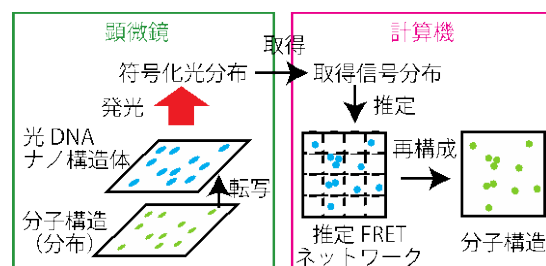


図 1 光符号化による超解像顕微鏡法

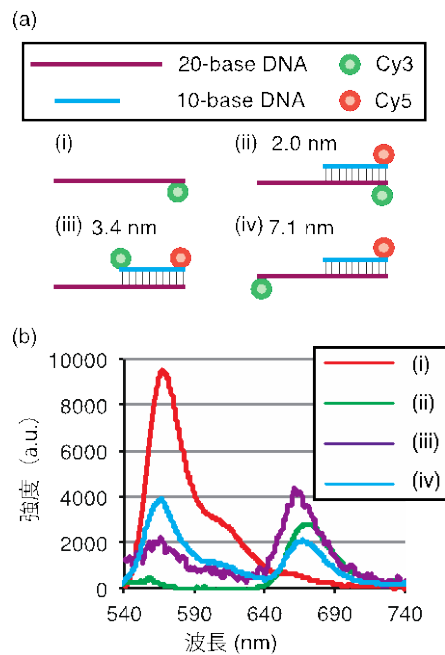


図2 (a) 光 DNA ナノ構造と (b) 蛍光スペクトル

ーク : 550 nm、蛍光ピーク : 570 nm) と Cy5 (励起ピーク : 649 nm、蛍光ピーク : 670 nm) を用いた。これらは FRET のドナーとアクセプタとして機能する。作製した 4 つの光 DNA ナノ構造体を図 2(a) に示す。それぞれ、Cy3 と Cy5 の間の距離が異なっている。図に付記した距離の値は DNA 二本鎖の径が 2nm、らせん構造 1 回転が 3.4nm として見積もった。励起波長 450 nm に対する発光スペクトルの計測結果を図 2(b) に示す。グラフでは、データ処理により所望の構造体以外からの発光の影響を除去している。蛍光分子の配置に依存して発光スペクトルが変化していることが確認できる。なお、スペクトルから計算される FRET 効率は(ii) 99%、(iii) 52%、(iv) 27%であった。

次に、蛍光スペクトルと蛍光寿命の構造依存性を調査した。このとき、蛍光スペクトルが同一で蛍光寿命が異なる系になることを期待し、同一の蛍光分子 (FAM ; 励起ピーク : 494 nm、蛍光ピーク : 518 nm) のみを配置した光 DNA ナノ構造体も作製した (図 3(a))。それぞれの光 DNA ナノ構造体に対する蛍光スペクトルを図 3(b) に、蛍光寿命の測定結果を図 3(c) に示す。蛍光寿命のグラフの縦軸は、多点での寿命測定における寿命の頻度であり、付記した値は寿命の平均と標準偏差である。構造(i)-(iii)では異なるスペクトルが得られている。また、(iii)-(v)は FAM のみの配置のため、蛍光スペクトルに差が見られない。一方、蛍光寿命については、(iii)は(iv)や(v)とも差が見られた。これは、同一のスペクトルで異なる寿命をもつ構造体の設計可能性を示している。以上の結果から、蛍光スペクトルと蛍光寿命が符号化を

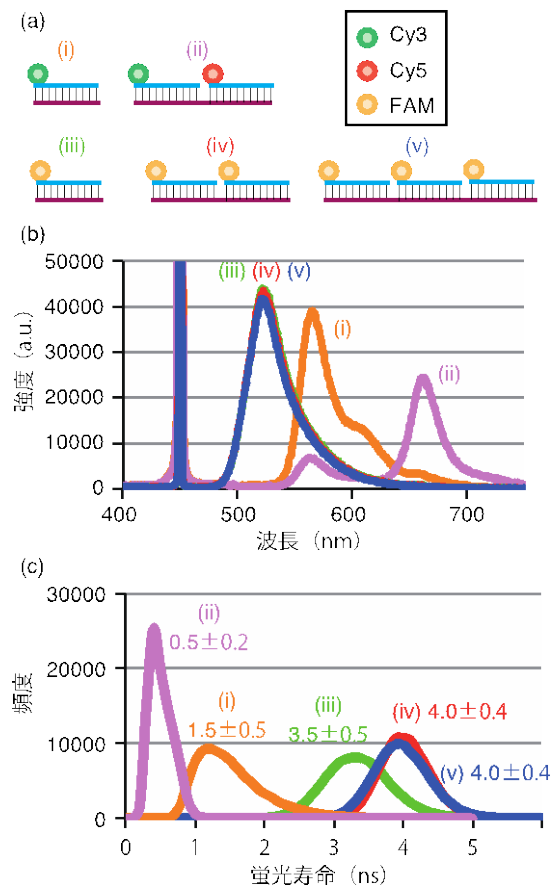


図3 (a) 光 DNA ナノ構造、(b) スペクトル、(c) 蛍光寿命

実現する光属性として利用できることが確認できた。

(3-2) 波及効果と発展性など

超解像顕微鏡法をはじめとする分子イメージングは、ナノ世界からマクロ世界への信号通信と捉えることができる。通信分野では、符号化は確立された技術として実用化されており、その方法論は強力である。本プロジェクトの手法は、このような情報通信技術をイメージングに適用するものであり、分子イメージングにおける新しい研究領域の開拓が期待できる。今後は、符号化によりイメージングにおける点群 (蛍光分子群) の応答関数を波長軸と時間軸がなす平面にマッピングする手法を構築し、ナノ分解能での点群再構成に基づく超解像顕微鏡法へと発展させる。

[4] 成果資料

(1) 小倉裕介, 西村隆宏, 藤井亮, 香川景一郎, 川人祥二, 谷田 純, "光 DNA ナノ構造体を用いた超解像顕微鏡法の提案", Optics & Photonics Japan 2014, 7aE4 (November 2014).

出張報告（特別教育研究経費を使用した場合について、全員分記載して下さい。）

氏名：小倉裕介
所属：大阪大学大学院情報科学研究科
期間：2014年8月26日
用務先：静岡大学電子工学研究所
用務内容：研究打ち合わせおよび実験
主たる対応者：香川景一郎

氏名：西村隆宏
所属：大阪大学大学院情報科学研究科
期間：2014年8月26日
用務先：静岡大学電子工学研究所
用務内容：研究打ち合わせおよび実験
主たる対応者：香川景一郎

氏名：小倉裕介
所属：大阪大学大学院情報科学研究科
期間：2014年10月28日
用務先：静岡大学電子工学研究所
用務内容：研究打ち合わせおよび実験
主たる対応者：香川景一郎

氏名：西村隆宏
所属：大阪大学大学院情報科学研究科
期間：2014年10月28日-29日
用務先：静岡大学電子工学研究所
用務内容：研究打ち合わせおよび実験
主たる対応者：香川景一郎

氏名：小倉裕介
所属：大阪大学大学院情報科学研究科
期間：2014年12月22日
用務先：静岡大学電子工学研究所
用務内容：研究打ち合わせ
主たる対応者：香川景一郎

氏名：西村隆宏
所属：大阪大学大学院情報科学研究科
期間：2014年12月22日
用務先：静岡大学電子工学研究所
用務内容：研究打ち合わせ
主たる対応者：香川景一郎