

## 蛍光ゆらぎ解析による細胞およびソフトマター内分子動態解析

### Fluorescence fluctuation analysis in cells and soft matters

山本 条太郎

産業技術総合研究所 生命工学領域 健康医工学研究部門

蛍光標識した標的分子、または蛍光分子そのものの拡散動態を計測する手法として、蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) があり、溶液や生細胞内における濃度や分子間相互作用の解析を可能とする。これまでに著者らは FCS の発展手法の一つである偏光 FCS (Polarization-dependent FCS, Pol-FCS) 測定によって細胞内の高分子混雑状態やゲルのようなソフトマター内の微環境の広がり解析が可能になると着想し、研究を進めてきた。このような微環境の解析方法には未だ決定的な手法が確立されておらず、有効な手法が望まれている。

図に Pol-FCS の原理を示す。評価する試料 (溶液、細胞、ゲルなど) に対してプローブとなる蛍光分子を導入する。このプローブは試料中でランダムな並進移動 (並進拡散) (a) とランダムな回転 (回転拡散) (b) を行う。Pol-FCS 装置は共焦点蛍光検出系に偏光子と検光子を追加した構成となっている。これによって、プローブが並進拡散によって共焦点領域をランダムに出入りすることによる蛍光強度変動(c)と、それよりも非常に短い時間スケールで起きる分子のランダムな回転による蛍光強度変動(d)が同時に計測される。このような 2 種類の異なる時間スケールのゆらぎ成分を持つ信号の場合、その自己・相互相関関数は図(e)に示すような 2 段階で減衰する関数となる。

図(e)は PEG6,000 (polyethylene glycol 6,000, Wako, Japan) をリン酸緩衝液に溶解した溶液中 (濃度 0, 200 mg/mL) に GFP を濃度 100 nM で分散させた場合に得られる相互相関関数 (Cross-Correlation Function, CCF) である。 $t=10^{-6}$  s よりも短い時間領域での減衰成分が回転拡散による緩和成分、それよりも長い時間領域の緩和成分が並進拡散による成分を表す。PEG6,000 の添加により、回転拡散と並進拡散どちらの減衰も遅くなったことが分かるが、PEG6,000 の影響は回転拡散よりも並進拡散の方が大きい。このことは、並進拡散は高分子鎖によって阻害されやすいが、高分子鎖の隙間での回転拡散は阻害されにくいことを示す。このように、並進拡散と回転拡散の速さの比較により、プローブ分子周辺の微環境の広がりについて評価可能であることが示唆された。この方法を用いた高分子クラウディング溶液やゲル、および細胞内での微環境測定を行い、特に細胞内測定の結果からは細胞の種類や細胞周期によって細胞内高分子クラウディング状態に差がある可能性を見出した。詳細は *Scientific Reports* 11, 10594 (2021) にて報告したため、ご参照いただきたい。