

テーマ4 生物物理

目次

§1 はじめに——生物物理学における生体膜研究——	3
§2 実験の背景	3
(1) 生体膜	3
(2) 脂質二分子膜	5
(i) 脂質二分子膜の構造と性質	5
(ii) 生体膜モデルとしての脂質二分子膜	6
(iii) 脂質二分子膜リポソームの形態	6
(3) 蛍光分光の基礎	7
(i) 発光スペクトル	8
(ii) 励起スペクトル	8
(iii) 量子収率	8
(iv) 蛍光寿命	9
(v) 蛍光異方性	9
(vi) 溶媒緩和	9
(vii) 蛍光の消光	9
(viii) 蛍光の共鳴エネルギー移動	9
(ix) 波長とエネルギーとの関係	10
(4) 蛍光異方性のマイクロ粘性との関係	10
(i) 吸収と発光の遷移双極子モーメントが一致する場合 ($F_{ex} = F_{em}$)	12
(ii) 吸収と発光の遷移双極子モーメントが一致しない場合 ($F_{ex} \neq F_{em}$)	13
(5) 蛍光エネルギー移動	16
§3 実験の概要と目的	18
§4 実験	19
(1) 蛍光分光器の光学系	19
(2) スペクトル測定の実験条件	19
(3) 蛍光分光光度計 (FP-6300) の使い方	22
(i) 装置の立ち上げ	22
(ii) スペクトルの測定	22
(iii) 装置のシャットダウン	23
(4) 偏光子を使った測定	23
(i) 用いる偏光子	23
(ii) 波長を固定した測定	24

(5)	蛍光分光光度計 (RF-1500) の使い方	24
(i)	装置の立ち上げ	24
(ii)	スペクトルの測定	25
(iii)	スペクトルの保存と PC への転送	26
(iv)	装置のシャットダウン	26
(6)	試料の調製法	27
(i)	脂質の stock solution (保存溶液) の作り方	27
(ii)	脂質リポソームの作り方	27
(iii)	器具の洗浄と乾燥	29
(7)	実験操作	29
(i)	[実験 0] ピペットマンの較正	29
(ii)	[実験 1] 水の散乱の測定と、ローダミン B のエタノール溶液の蛍光スペクトルおよび励起スペクトルの測定	30
(iii)	[実験 2] ローダミン B のグリセリン中での蛍光異方性の励起波長依存性の測定	32
(iv)	[実験 3] ペリレンのグリセリン溶液の蛍光異方性の測定	33
(v)	[実験 4] ペリレンの DPPC および DOPC 脂質二分子膜リポソーム中での蛍光異方性の測定	33
(vi)	[実験 5] DOPC 脂質二分子膜リポソーム中でのローダミンラベル脂質と NBD ラベル脂質間の蛍光エネルギー移動の測定	36
(vii)	[実験 6] DOPC の SUV リポソームのポリエチレングリコールによる膜融合の観察	36
§5 計算機によるデータ解析		38
(1)	データの STEX への FTP による転送	38
(2)	gnuplot によるスペクトルデータの表示と解析	39
(i)	ファイルの準備	39
(ii)	gnuplot の起動	40
(iii)	とにかくプロットしてみる (データをそのままプロットする場合)	41
(iv)	規格化してからプロットする	42
(v)	グラフの体裁を整える	42
(vi)	グラフをプリンタで印刷する	44
(vii)	G 因子と蛍光異方性のスペクトル演算	45
§6 レポートの書き方		45
(1)	レポートの形式	45
(2)	考察の視点	46
§7 問題		48
(1)	問題 1	48
(2)	問題 2	49

§1 はじめに——生物物理学における生体膜研究——

生物物理学とは、物理学的手法（実験方法、思考方法）を用いて生物を研究する物理学の一分野である。その対象は、生物の多様性と階層性を反映して、多岐にわたっている。すなわち、生体分子の個々の構造から、生体高分子・生体分子集合体、生体小器官や細胞、生体組織、個体、生物集合体に到るそれぞれのレベルでの構造と物性・機能、それぞれの階層間の相互関連や進化等である。また、これら全体に関わる非平衡熱力学や理論生物学も生物物理学の重要な一分野である。これらの多岐にわたる研究分野のうち、本実験では、生体膜を主に取り扱う。細胞は細胞膜によって区切られ、すべての生物の構造および機能の単位であるが、細胞はさらにその中に核、ミトコンドリア、小胞体などの膜状構造物を内包している。これら、生物に見られる膜状構造物を総称して生体膜と呼ぶ。生体膜は、細胞内外や細胞小器官内外を隔てる障壁としての役割だけでなく、光合成やエネルギー産生など生体にとって本質的に重要な機能の多くが生体膜上で営まれている。生体膜研究は、上記の階層性のなかで、生体分子集合体から細胞のレベルを主な研究対象としている。この階層は、溶液物性についての現在の我々の知識ではかなり複雑ではあるが、実際の生体膜を単純化したモデル系では単分子から分子集合体の構造と物性を詳細に調べることが可能である。

生体膜を研究するために、多くの実験的手法が現在使われている。光学顕微鏡や電子顕微鏡・あるいは現在急速に広まりつつある STM や AFM などのプローブ型顕微鏡による観察、X線・中性子・電子線を用いた回折実験、NMR や ESR による磁気共鳴スペクトル、赤外吸収やラマン散乱・蛍光などの分光学的測定、DSC などの熱力学的測定などである。これらのうち、本実験では、蛍光分光を主に用いる。実際の研究の最前線においては、種々の手法から得られる情報を総合的に判断して、対象の構造や機能を解明することが重要であるが、一方では、個々の実験手法について深い知識がないと実際の実験結果を見誤る危険性がある。また、ひとつの実験手法を深く理解することは、新たに他の実験手法を用いた場合でも、その勘所などを理解することの大きな助けとなる。

本実験の目的は、

1. 蛍光分光法の原理（分子による光の吸収と発光の過程）を理解し、その手法を会得すること
2. 蛍光分光法を用いて、溶液内の分子運動のダイナミクスについて理解すること
3. 蛍光分光法を用いて、生体モデル膜（脂質二分子膜）の物性（膜の流動性や膜融合）について理解すること

である。

§2 実験の背景

(1) 生体膜

生体膜は、脂質 (lipid) とタンパク質 (protein) をその主な構成成分としている。例として、ヒトの赤血球膜の構成成分を表 1 に示す。主なリン脂質とコレステロールの分子構

造を図 1 に示す。リン脂質は、親水性（水に溶けやすい性質、hydrophilic）の極性頭部と、2本の疎水性（水になじみにくい性質、hydrophobic）の炭化水素鎖を持ち、両親媒性（amphiphilic）の分子である。このうち、炭化水素鎖は炭素数 10 個程度から 20 数個程度のものであり、ひとつまたは複数の二重結合を含む不飽和炭化水素も多く見られる。極性部と炭化水素鎖部の種類とその割合は生物の種や組織・細胞・細胞内小器官の種類によって異なっている。脂質分子を水中に分散させると、疎水性相互作用などによって自発的に会合して二分子膜構造をとり、水溶液環境中で生体膜を熱力学的に安定に存在させる基質となる。一方、タンパク質は、アミノ酸がペプチド結合によってつながった生体高分子である。タンパク質のうち、膜と相互作用することで膜中または膜近傍に存在するものを膜タンパク質と総称する。膜タンパク質は、生体膜上の化学反応の触媒として、また、タンパク自身の構造（コンフォメーション）変化を通じて、生体膜の多くの機能の主役を演じている（詳しくは参考書を参照）。

表 1: 赤血球膜の構成成分（重量パーセント）

タンパク質	49.2%		
脂質	43.6%		
	リン脂質	32.5%	
		ホスファチジルコリン (PC)	34.7%
		ホスファチジルエタノールアミン (PE)	28.0%
		スフィンゴミエリン (SM)	20.1%
		ホスファチジルセリン (PS)	14.3%
		ホスファチジン酸 (PA)	2.2%
	コレステロール	11.1%	
炭水化物	7.2%		
	糖タンパク質		6.7%
	糖脂質		0.5%

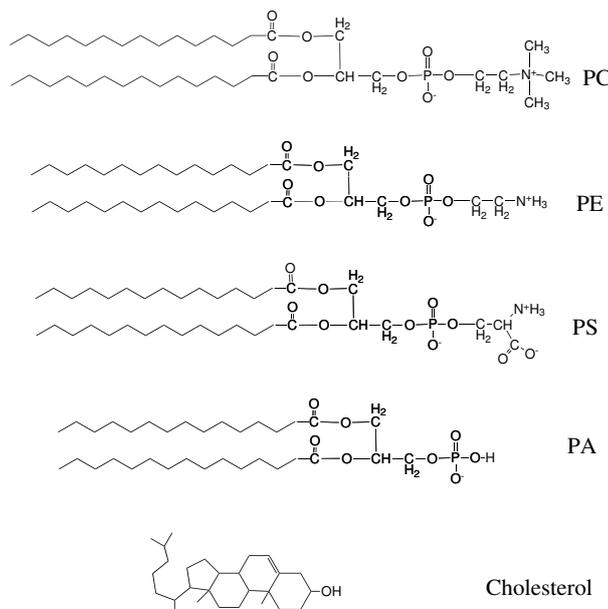


図 1: 主な脂質の分子構造

生体膜研究の歴史は古いが、1972年に Singer と Nicolson はそれまでに蓄積されたデータを総合して、生体膜の流動モザイクモデルを提出した(図2)。このモデルは、脂質で形成された二分子膜中にタンパク質が埋まっているとするもので、水中の脂質-脂質、脂質-タンパク質、タンパク質-タンパク質間の相互作用によって脂質とタンパク質が入り混じり(モザイク性)、個々の分子や分子集団は膜中を自由に動き回ることが出来る(流動性)という描像である。このモデルは、それまでの硬い固定的な生体膜のイメージを柔らかく流動性に富むものに変え、その後の多くの研究でも、この描像は基本的に支持されている。

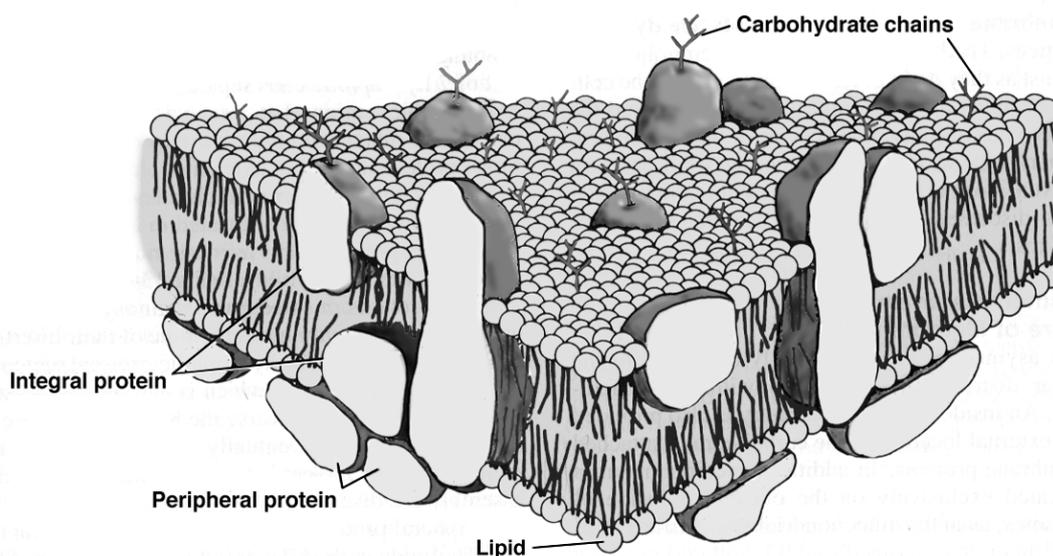


図2: 生体膜の流動モザイクモデル

(2) 脂質二分子膜

(i) 脂質二分子膜の構造と性質

上で述べたように、生体膜そのものについての研究も盛んに行われているが、生体膜は我々の現在の物理的な知識から理解するにはまだまだ複雑である。そこで、より単純化した生体膜モデルとして、脂質二分子膜がよく用いられ、現在でもその構造や基礎的物性について多くの研究が行われている。図1のリン脂質を水中におくと、脂質二分子膜を形成する。飽和炭化水素(二重結合を含まない)を足にもつ単一組成の脂質二分子膜は、温度に依存して種々の相を示す。図3に DMPC (dimyristoyl phosphatidylcholine, 図1のPCの足に炭素数14の直鎖炭化水素をつなげた分子) - 水系の相図を示す。高温側の L_{α} 相は、二分子膜相互の配置は規則正しく並んで結晶状態に近いが二分子膜内の炭化水素部分は液体に近い状態になっており、液晶相と呼ぶ。低温側の $L_{\beta'}$ 相は、炭化水素の部分も完全に結晶状態となっておりゲル相と呼ぶ。中間温度に現れる $P_{\beta'}$ 相は炭化水素鎖の部分は結晶状態に近いが膜は湾曲しておりリップル相と呼ぶ。 $L_{\beta'} - P_{\beta'}$ 、 $P_{\beta'} - L_{\alpha}$ 間の相転移はともに吸熱型の転移で、それぞれ、前転移 (pretransition)、主転移 (main transition)¹ と呼び、示差走査熱量計により直接的に観測することが出来る。転移エンタルピーは前転移に比べ主転移の方がはるかに大きく、DMPCの場合、それぞれ、5.0kJ/mol、26kJ/molであ

¹ゲル-液晶相転移とも呼ばれる

る。転移温度は極性部の種類と炭化水素鎖の長さに依存して変わる。DMPCの転移温度は、それぞれ、14、23であるが、例えば、DMPCより2本の炭化水素鎖をともに2個だけ長くしたDPPC (dipalmitoyl phosphatidylcholine) では、それぞれ、35、41.5である。また、DMPCの極性部だけを変えたDMPS、DMPE、DMPAでは、主転移温度は、それぞれ、36、49.5、50になる。これらの脂質/水系の相転移挙動について説明できる統一的な理論はまだなく、実験・理論および計算機実験などで現在も多くの研究が行われている。

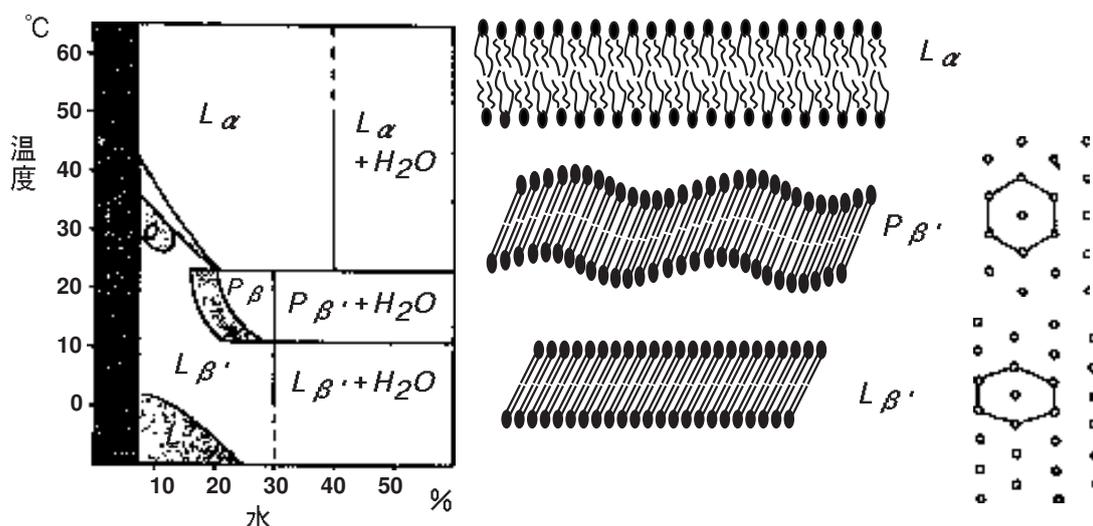


図 3: DMPC-水系の相図と各相の構造

(ii) 生体膜モデルとしての脂質二分子膜

脂質二分子膜は興味深い物理的対象であるだけでなく、先に述べたように、生体膜のモデルとして、生体中でおこる様々な現象をモデル系で再現し、その機構を理解するために使われている。例えば、生体から単離したり人工的に合成した膜タンパク質を、脂質二分子膜に繰り込んでそのタンパク質の機能が発現しているかを調べたり²、生体膜に作用する毒素や薬物の作用機構を調べる目的で使われている。また、精子と卵の融合のような細胞融合やその後の細胞分裂に見られるように、生体中では生体膜の融合と小胞化が頻繁に起こっているが、この過程は脂質二分子膜と融合誘起物質や小胞化誘起物質との系で研究が行われている。細胞融合を誘起する物質としては、センダイウィルス、ポリエチレングリコール (PEG) などが実用上よく用いられ、細胞内の膜融合には Ca^{2+} イオンが深く関与していると考えられている。このうち、 Ca^{2+} イオンや PEG は脂質二分子膜系でも融合を引き起こし、膜融合の分子機構について研究されている。

(iii) 脂質二分子膜リポソームの形態

図 3 の相図からわかるように、リン脂質に 40% 以上の水を加えても脂質二分子膜の相は、変化しない。水が過剰の状態では、試料を激しく攪拌すると脂質二分子膜の小胞 (ベシクル) 化が起こる。この小胞を、リポソームと呼ぶ。リポソームは、その形態から次の 3 種類に分類される。上記のように脂質懸濁水溶液を主相転移温度以上の温度で激しく攪

²このように、生体や細胞から構成成分を取り出したのち、モデル系に戻して、元の機能が発揮されるかどうかを調べる実験を、一般に、再構成実験と呼ぶ

拌して得られるリポソームは、二分子膜が層状に幾重にも重なった大きなベシクルとなり、MLV (multi-lamellar vesicle、多重層膜リポソーム) と呼ばれる。MLV は熱力学的に安定な形態で、化学的な分解がない限り、数カ月以上にわたってその形態を保持する。MLV は、肉眼では白く濁って見え、静置すると白い浮遊物は沈殿する。MLV の懸濁液を高出力の超音波で処理すると、直径数 10nm の一枚膜のリポソームが生成する。これを、SUV (small uni-lamellar vesicle、小さな一枚膜リポソーム) と呼ぶ。SUV は、MLV よりも熱力学的には不安定な準安定状態であるが、比較的容易に生成できる一枚膜リポソームで、可視光に対してほぼ透明 (粒子径が小さいため散乱がない) であるため各種分光学的測定に適しているなどの理由でよく用いられる。径が 100nm 以上の一枚膜リポソームは、SUV と区別して、LUV (large uni-lamellar vesicle、大きな一枚膜リポソーム) と呼ばれる。LUV は、SUV に膜融合誘起物質を添加して融合させた後に融合誘起物質を取り除いたり、凍結-融解によって融合させたりして作製される。大きな LUV は光学顕微鏡で観察が可能であり、また、リポソーム内液相に多量の薬物を内包できる。LUV に薬物を内包させたリポソームは、DDS (drug delivery system)³ として臨床で応用されつつある。

(3) 蛍光分光の基礎

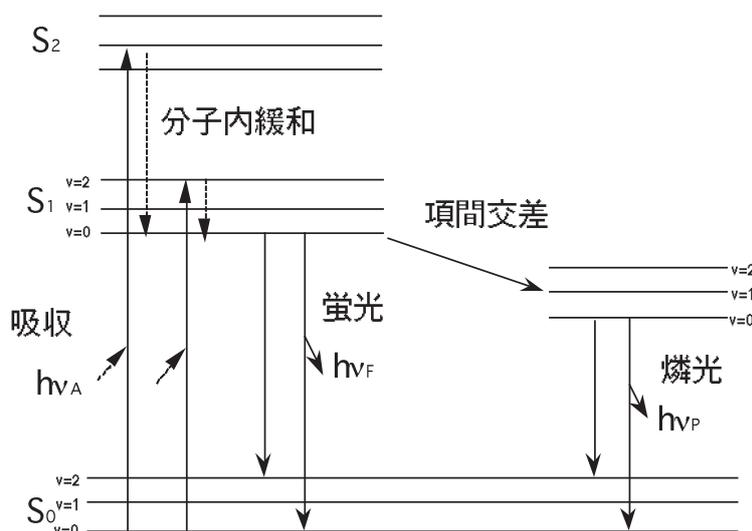


図 4: Jablonski のダイアグラム

蛍光 (fluorescence) とは、電子励起状態 (S₁) から自然放出 (spontaneous emission) によって電子基底状態に戻る発光過程をいう。この過程は、Jablonski ダイアグラム (図 4) によって説明される。まず、分子は通常、室温では、電子基底状態の振動サブレベルの基底状態にほとんど存在する。これに電子状態間のエネルギーに共鳴する光を照射することで、電子励起状態へ遷移させる。これは、通常の吸収スペクトルの測定に他ならない。この遷移は、 10^{-15} 秒 (フェムト秒) 程度の時間スケールで起こり、この間、振動などによる原子核の位置の変化は無視できる (Frank-Condon の原理)。また、一般に電子励起状態の平衡核間距離は、電子基底状態のそれよりも長い。このため、遷移の結果、電子基底状態の振動基底状態と重なり大きい電子励起状態の振動励起状態に到達する確率が高い。

³ 薬物を患部までカプセル化したまま運び、そこで放出させる方法

電子励起状態の振動励起状態や電子状態の第2励起状態に到達した分子は、分子内緩和や無輻射遷移などの多くの緩和過程によって、 10^{-12} 秒（ピコ秒）の時間スケールで、第1電子励起状態の振動基底状態に戻る。この第1電子励起状態の振動基底状態からの自然放出による発光が蛍光スペクトルである。この発光確率は、アインシュタインのA係数で記述され、個々の分子種によって異なるが、通常、 10^{-8} 秒の時間スケールでおこる。Jablonskiダイアグラムを見ればわかるように、発光のエネルギーは吸収のエネルギーより低エネルギーになっている。これは、吸収された光よりも蛍光によって発光された光の方が長波長になることと同義で、この波長のシフトをストークスシフト (stokes' shift) と呼ぶ。また、第1電子励起状態（1重項）から励起3重項状態へ移行（項間交差）し、その後基底状態に戻る発光を燐光（phosphorescence）と呼ぶが、ここでは詳説しない。

さて、蛍光寿命は一般に 10^{-8} 秒程度であると述べたが、この時間スケールでおこる励起分子の運動や周囲との相互作用によって、蛍光スペクトルは影響を受ける。このことが、種々の分光法の中で、蛍光分光をユニークな手法にしている。蛍光分光法で測定する物理量や得られる情報について、以下、簡単にまとめる。この実験テーマに特に関係の深いことについては、後で詳しく述べる。それ以外については、参考文献 [1] [6] を参照すること。

(i) 発光スペクトル

励起光の波長を固定して、発光した光のスペクトルである（スペクトルとは光の強度の波長依存性をいう）。単に蛍光スペクトルという場合には、この発光スペクトルを指す。上で述べたように、発光スペクトルは励起波長よりも長波長側に現れる。溶媒の影響を受け、スペクトルが顕著に変化する場合がある（溶媒緩和の項参照）。

(ii) 励起スペクトル

測定する発光の波長を固定して励起光の波長を変えていった時の、発光強度の励起波長依存性をいう。実験上の歪みを補正した真の励起スペクトルは、試料の吸収スペクトルに一致する。蛍光を発する分子と光との相互作用のみを理論的に扱えば、励起スペクトルと発光スペクトルは鏡像関係をもつが、溶液中の実際の測定では、溶媒との相互作用のために、鏡像関係からくずれていることが多い。

(iii) 量子収率

吸収（励起）によって蛍光分子に吸収された光子数と、蛍光によって放出された光子数の比。励起された分子のすべてが蛍光によって基底状態に戻れば1となるが、実際には、無輻射遷移によって1とはならない。無輻射遷移とは、蛍光を発しないで基底状態に戻る遷移で、上記の項間交差による3重項状態への緩和の他、電子状態のエネルギーが振動エネルギーなどに転化して最終的に熱エネルギーになる内部転換や、他の分子にエネルギーを移すエネルギー移動などがある。第1励起状態にある分子の蛍光遷移と無輻射遷移の速度定数（単位時間あたりに遷移を起こす確率）をそれぞれ、 k_f と k_{nr} とおくと⁴、量子収率 Φ は

$$\Phi = k_f / (k_f + k_{nr}) \quad (1)$$

と定義される。

⁴前者は、励起状態にある分子が自然放出で基底状態に戻る確率で、アインシュタインのA係数とも呼ばれる。

(iv) 蛍光寿命

上記の定義にしたがえば、蛍光寿命 τ は、

$$\tau = (k_f + k_{nr})^{-1} \quad (2)$$

と定義され、蛍光分子が励起状態にとどまる平均時間である。温度や溶媒に依存して変化する。パルス光で励起し時間に依存した蛍光スペクトルを測定することで直接測定することが可能であるが、本実験の定常光を用いた分光法⁵では直接測定できない。但し、式 1 と 2 からわかるように、

$$\tau = \Phi/k_f \quad (3)$$

であるので、あるパラメーター（例えば温度）によって、自然発光確率 (k_f) が変化しないとすれば、蛍光寿命は量子収率に比例する。さらに、励起光による吸収確率もそのパラメーターに依存しないとすれば、量子収率は蛍光強度に比例するので、蛍光強度の相対的な変化からそのパラメーターに依存する蛍光寿命の相対的な変化の度合いを見積もることが可能である（式 42 参照）。

(v) 蛍光異方性

励起状態にいる間に、分子は回転する。それによって、光を吸収して遷移した双極子モーメント（遷移双極子モーメント）の方向とは異なった方向の偏光の蛍光スペクトルを示す。したがって、直線偏光した励起光で励起し、蛍光の偏光状態（偏光解消）を調べることで、励起状態の間に蛍光分子がどの程度回転したのかの情報を得ることが出来る。詳しくは後述する。

(vi) 溶媒緩和

一般に、電子励起状態にある分子は、電子基底状態とは異なる電気的雙極子モーメントをもつので、極性溶媒中では、励起状態にいる間に、励起分子の雙極子モーメントを安定化させるように、溶媒分子の再配向が起こり得る。その結果、励起状態は相対的に安定化し、蛍光スペクトルの長波長へのシフト、蛍光寿命が長くなることなどが観測される。このことを利用して、巨大蛋白分子や膜に結合した蛋白質の蛍光を発する部位が、溶媒（水）にさらされているか、あるいは折り畳まれて内部に存在するかというような情報を得ることが可能となる。

(vii) 蛍光の消光

励起状態にある蛍光分子は、エネルギー的に不安定な状態にあるため、他の分子との相互作用が強くなる。励起状態の蛍光分子と複合体を形成し、蛍光分子を脱励起させる分子を一般に消光分子（quencher）という。消光分子を利用して、たとえば、細胞の内部に蛍光分子を、外部に消光分子をおいて、蛍光スペクトル強度の時間による減衰を測定することで、蛍光分子や消光分子の細胞膜の透過性の情報を得るなど、多様な応用が行われている。

(viii) 蛍光の共鳴エネルギー移動

励起状態にある分子の近傍に、その分子の発光エネルギーと同じ吸収遷移をもつ他の分子が存在すると、励起分子のエネルギーが近傍の分子に移動し、近傍の分子が励起され

⁵励起光を連続的に照射して、発光を常に観測して平均化する測定法

る現象がおこる。これを共鳴エネルギー移動という。このとき、エネルギーを放出して基底状態に戻る分子をドナー、エネルギーを受け取って励起される分子をアクセプターと呼ぶ。共鳴エネルギー移動の起こる確率は、ドナーとアクセプターの相対的な配向に依存し、両者の距離の6乗に反比例する。したがって、實際上、ドナーの近傍の10nm以下の距離にあるアクセプターのみが寄与する。共鳴エネルギー移動は、光子 (photon) を介した発光と再吸収の過程ではない。発光と再吸収は試料セル内のすべてのアクセプターについて基本的には距離に依存しない確率で起こる。共鳴エネルギー移動が起こると、ドナーの発光スペクトルは小さくなり、逆にアクセプターの発光スペクトルが現れて成長する。

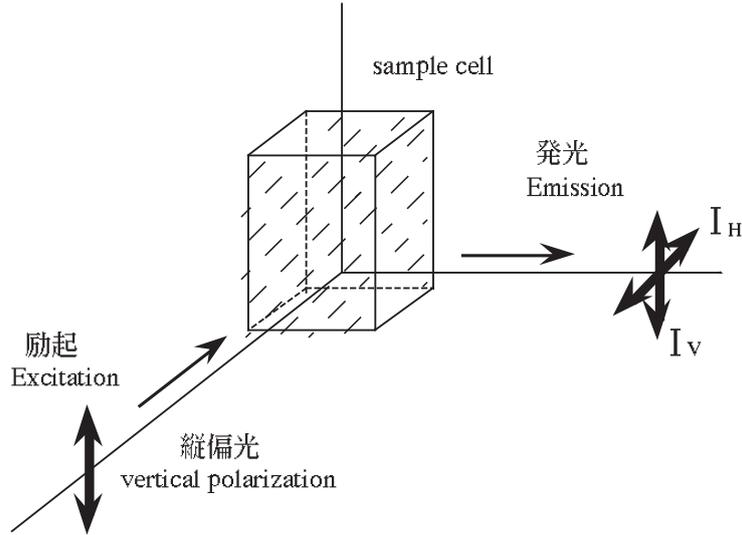
(ix) 波長とエネルギーとの関係

蛍光分光のスペクトルは、慣例的に、横軸を(真空中での)光の波長 (nm) で表記する場合が多い。物理分野でスペクトルを表記する場合は、横軸をエネルギーで表記する方が一般的である。光をエネルギーに変換する際の最も基本的な式は、 $E = h\nu$ で、 h はプランク定数、 ν は光の振動数である。エネルギーの単位としては、J や eV、 cm^{-1} などが用いられる。このうち、 cm^{-1} は波数 (wavenumber) で、分光学の分野で慣例的に良く用いられるエネルギーの単位であり、カイザーと呼ばれることもある。波数は、真空中の単位長さあたりに入る波の数であり、光の波長を波数に変換するためには、波長をその長さに変換してから、逆数を取れば良い。横軸を波長で表したスペクトルでは、波長が長くなる程、エネルギーは低く (小さく) なること、また、波長はエネルギーの逆数に比例しているの、ふたつの波長の差をとってもそれはエネルギーに変換できないことに注意する必要がある。

(4) 蛍光異方性のマイクロ粘性との関係

Maxwell の方程式で記述されるように、光は交流電磁波であり、進行方向に対して垂直な方向に電場を持つ。通常の太陽光やランプからの光は、あらゆる方向の電場の重ね合わせであり無偏光であるが、偏光子などを通すことにより、特定の電場の方向の光のみを選択的に取り出すことができる。電場が1方向に完全にそろった光の状態を直線偏光 (linear polarization) と呼ぶ。蛍光異方性の測定では、励起側と発光側のそれぞれに偏光子を入れ、直線偏光の励起の後に、どのような偏光の状態が発光が起こるのかを測定する。これによって、励起された蛍光色素が、その蛍光寿命の時間内に、どのような過程を経て発光に至ったのかを知ることができる。光と相互作用するのは、遷移双極子モーメントと呼ばれる分子内のベクトルである。このベクトルは、遷移の種類によって分子内である固有の方向を持っている。このベクトルと光の偏光の方向が一致したときに、その分子は最大の確率で遷移し、光の吸収または発光を起こす。蛍光異方性の測定とは、吸収の遷移双極子モーメントと発光の遷移双極子モーメントの空間内での分布を測定していることに他ならない。本項では、まず、蛍光異方性の定義を述べ、回転拡散モデルと Stokes の式によって、蛍光異方性の値を蛍光色素周囲の微視的な粘性と結び付ける式を得る。これらは単純なモデルであるが、水溶性たんぱく質の蛍光異方性の挙動などは正しく説明できることが知られている。次に、遷移と発光の遷移双極子モーメントの分布と蛍光異方性の値との関係を詳しく解説する。

図のように直線偏光したパルスの入射光で励起した場合を考える。入射光の偏光方向に平行と垂直な蛍光の偏光成分を、それぞれ、 $I_V(t)$ と $I_H(t)$ と表す。時間に依存した全蛍光



強度 $I_T(t)$ および蛍光異方性 $r(t)$ は、

$$I_T(t) = I_V(t) + 2I_H(t) \quad (4)$$

$$r(t) = \frac{I_V(t) - I_H(t)}{I_T(t)} \quad (5)$$

と定義される⁶。ここで、 $I_T(t)$ と $r(t)$ がどちらも単純な指数型減衰を示すと仮定し⁷、

$$I_T(t) = I_0 \exp(-t/\tau) \quad (6)$$

$$r(t) = r_0 \exp(-t/\phi) \quad (7)$$

と表す。ここで r_0 は、蛍光分子の吸収と発光の遷移双極子モーメントのなす角によって決まる定数で、それらが完全に一致していれば、0.4になる。 τ は蛍光寿命、 ϕ は蛍光の回転相関時間と呼ばれる。時間分解の蛍光異方性の測定⁸を行えば、 τ と ϕ を独立に決定することが可能であるが、定常光での蛍光異方性 r は、

$$r = \frac{\int_0^\infty I_T(t)r(t)dt}{\int_0^\infty I_T(t)dt} \quad (8)$$

を測定していることになり、上式を代入すると、

$$r = \frac{r_0}{1 + (\tau/\phi)} \quad (9)$$

となる。これから、蛍光寿命に対して回転相関時間が長い(蛍光寿命の時間内に分子が回転しない)場合には $r \rightarrow r_0$ 、逆に回転相関時間が非常に短い場合には $r \rightarrow 0$ となるのがわかる。体積 V の球形分子を、粘性 η で表わされる溶媒に置いた場合の回転拡散方程式⁹から、回転拡散定数 D は、

$$D = k_B T / (6V\eta) \quad (10)$$

⁶ 散乱の影響や分光器の特性に関する実験的な諸問題については、別に考察する

⁷ この仮定はかなり限定された条件でないと成立しないが

⁸ 偏光したパルス光源で励起して、時間に依存した蛍光発光の偏光依存性を測定する実験

⁹ 中心分子が、周囲の溶媒分子との熱的な衝突による微小な角度変化を通して、ランダムにその配向を変えていくモデル

と表される。ここで k_B は Boltzman 定数である。また、 $\phi = 1/6D$ であるから、これらを代入し整理すると、

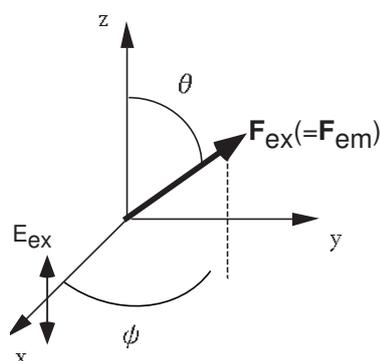
$$\frac{r_0}{r} = 1 + k_B \frac{T\tau}{V\eta} \quad (11)$$

となり、 τ が不変であれば、 $1/r$ を T/η に対してプロットすると直線にのるはずである。これをペラン・ウェーバーのプロットという。切片から r_0 を、傾きから τ/V を見積もることが出来る。また、 τ が既知であれば、蛍光分子の回転体積 V を決められる。また、 τ が変化する場合は、 $1/r$ を $T\tau/\eta$ に対してプロットする。これを変形ペラン・ウェーバーのプロットという。ペラン・ウェーバーの式は、回転拡散方程式の条件が近似的に成り立つ場合、すなわち、溶媒分子に比較して蛍光分子が十分に大きく形も球形に近い場合には、良く成り立つことが知られている。逆に、回転拡散方程式では表わせない様な場合にペラン・ウェーバーの式で解析すると、回転体積が実際の分子体積と矛盾した結果となる。例えば、回転拡散方程式で表わされるよりも分子の回転拡散が速い場合には、回転体積は分子体積よりも小さくなる。

さて、次に、分子の遷移双極子モーメントと蛍光異方性 r との関係を詳しく見てみよう。

分子の永久双極子モーメントとは、分子の正電荷（原子核）の重心と負電荷（電子雲）の重心を結んでできるベクトルであり、例えば、水分子は 1.85 デバイという永久双極子モーメントをもっている。一般に、永久双極子モーメントという場合は、その分子の電子基底状態での双極子モーメントの値を指し、電子励起状態では平衡核間距離も電子雲の拡がりも基底状態とは異なるので、異なった値をとる。遷移双極子モーメントとは、その遷移に関係するふたつの状態間の双極子モーメントベクトルの差である。したがって、その方向は遷移の種類によって異なる。蛍光分光では、吸収の遷移と発光の遷移は同じ状態間の遷移とは限らないので、一般には、それらのベクトルを独立に扱う必要がある。吸収または発光に関与する光の偏光方向が遷移双極子モーメントの向きと一致するとき、遷移確率は最大になり、それらが直交するとき、遷移確率はゼロになる。

(i) 吸収と発光の遷移双極子モーメントが一致する場合 ($F_{ex} = F_{em}$)



まず、簡単のために、励起と発光の遷移双極子モーメント（それぞれ、 F_{ex} と F_{em} ）が一致し、分子の回転拡散もない場合を考える。図に示すように、 x 軸方向から、 z 方向に偏光した入射光で励起し、 y 軸方向から発光のふたつの偏光成分を観測する。このような座標系において、励起および発光の確率は、

励起の確率 $\cos^2\theta$ に比例

z 軸方向の偏光発光の確率 $\cos^2\theta$ に比例

x 軸方向の偏光発光の確率 $\sin^2\theta \cos^2\psi$ に比例

と与えられる。ここで、 $0 \leq \theta \leq \pi$ 、 $0 \leq \psi \leq 2\pi$ である。蛍光分子が空間的に θ 、 ψ の配向をとる確率分布関数を $D(\theta, \psi)d\theta d\psi$ とおくと、入射光に平行と垂直な偏光発光強度は、それぞれ、

$$I_V(t) = k \int \int \cos^4 \theta D(\theta, \psi) d\theta d\psi \quad (12)$$

$$I_H(t) = k \int \int \cos^2 \theta \sin^2 \theta \cos^2 \psi D(\theta, \psi) d\theta d\psi \quad (13)$$

と書くことが出来る (k は比例定数)。溶液やガラス状態のように、蛍光分子が空間的に全くランダムな方向を向いている場合 (等方的な試料)、

$$D(\theta, \psi)d\theta d\psi = \frac{1}{4\pi} \sin \theta d\theta d\psi \quad (14)$$

であるから (4π は規格化因子)、12,13 式の積分は、

$$I_V(t) = \frac{k}{4\pi} \int \cos^4 \theta \sin \theta d\theta \int d\psi = \frac{k}{5} \quad (15)$$

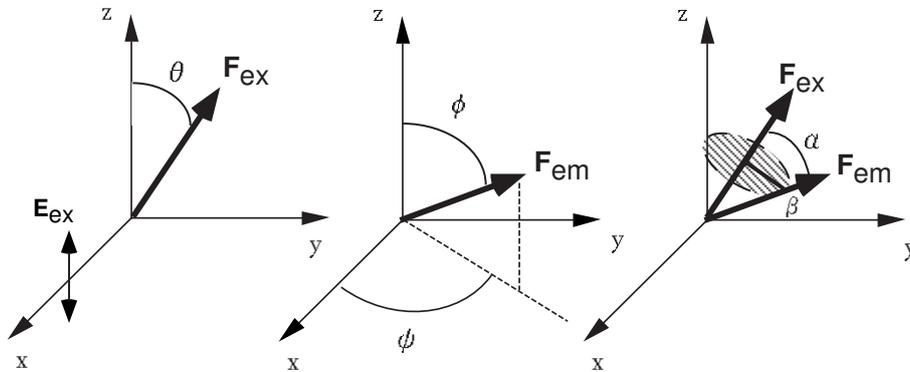
$$I_H(t) = \frac{k}{4\pi} \int \cos^2 \theta \sin^3 \theta d\theta \int \cos^2 \psi d\psi = \frac{k}{15} \quad (16)$$

と計算でき、これらを蛍光異方性の定義に代入して、

$$r = \frac{I_V - I_H}{I_V + 2I_H} = \frac{2}{5} = 0.4 \quad (17)$$

が得られる。これは、励起と発光の遷移双極子モーメントが一致し、かつ、それらが空間的にランダムに分布している場合の蛍光異方性の値であり、均一な溶液中で取り得る蛍光異方性の最大値である。

(ii) 吸収と発光の遷移双極子モーメントが一致しない場合 ($F_{ex} \neq F_{em}$)



図のように、励起と発光の遷移双極子モーメントが一致しない場合を考える。一致しない原因としては、分子内で遷移に関わる電子状態が励起と発光で異なっている場合と、

励起から発光に至る蛍光寿命の間に分子が回転する効果のどちらか、または、両方がある。右の図において、 α は F_{ex} と F_{em} のなす角、 β は F_{ex} の周りの F_{em} の回転角である ($0 \leq \alpha \leq \pi, 0 \leq \beta \leq 2\pi$)。このようにとった座標系においては、球面三角法の定理を用いて、

$$\cos \phi = \cos \alpha \cos \theta + \sin \alpha \sin \theta \cos \beta \quad (18)$$

の関係が成り立つ。つまり、図に示されている5つの角度パラメーターのうち、独立なもののは4つである。前節の場合と同様に、励起および発光の確率は、

励起の確率 $\cos^2 \theta$ に比例

z 軸方向の偏光発光の確率 $\cos^2 \phi$ に比例

x 軸方向の偏光発光の確率 $\sin^2 \phi \cos^2 \psi$ に比例

与えられる。ここで、 $0 \leq \theta \leq \pi$ 、 $0 \leq \phi \leq \pi$ 、 $0 \leq \psi \leq 2\pi$ である。 θ と ψ に関する分布関数を $D(\theta, \psi)d\theta d\psi$ 、 α と β に関する分布関数を $f(\alpha, \beta)d\alpha d\beta$ とおくと、ふたつの偏光発光強度は、

$$I_V(t) = k \int \int \int \int \cos^2 \theta \cos^2 \phi D(\theta, \psi) f(\alpha, \beta) d\theta d\psi d\alpha d\beta \quad (19)$$

$$I_H(t) = k \int \int \int \int \cos^2 \theta \sin^2 \phi \cos^2 \psi D(\theta, \psi) f(\alpha, \beta) d\theta d\psi d\alpha d\beta \quad (20)$$

となる。前節の場合と同様に、等方的な試料においては、

$$D(\theta, \psi)d\theta d\psi = \frac{1}{4\pi} \sin \theta d\theta d\psi \quad (21)$$

と置くことができ (4π は規格化因子)、また、 β は $0 \leq \beta \leq 2\pi$ の範囲でランダムであると考えて良い。

$$f(\alpha, \beta)d\alpha d\beta = \frac{1}{2\pi} f(\alpha)d\alpha d\beta \quad (22)$$

18,21,22 式を、19,20 式に代入して計算すると、

$$I_V(t) = k \left(\frac{1}{5} \overline{\cos^2 \alpha} + \frac{1}{15} \overline{\sin^2 \alpha} \right) \quad (23)$$

$$I_H(t) = k \left(\frac{1}{6} - \frac{1}{10} \overline{\cos^2 \alpha} - \frac{1}{30} \overline{\sin^2 \alpha} \right) \quad (24)$$

が得られる。ここで、

$$\overline{\cos^2 \alpha} = \int_0^\pi \cos^2 \alpha f(\alpha) d\alpha, \quad \overline{\sin^2 \alpha} = \int_0^\pi \sin^2 \alpha f(\alpha) d\alpha \quad (25)$$

は、試料内の蛍光分子についての集団平均である。23,24 式を蛍光異方性の定義式に代入し、

$$r = \frac{I_V - I_H}{I_V + 2I_H} = \frac{2}{5} \left(\frac{3\overline{\cos^2 \alpha} - 1}{2} \right) \quad (26)$$

を得る。26式は、等方的な系において、蛍光異方性 r を、吸収及び発光の遷移双極子モーメントの成す角 (α) の分布に結び付ける一般的な式である。26式をいくつかの場合について考えてみる。

励起と発光の遷移双極子モーメントが一致する場合

前節のように、励起と発光の遷移双極子モーメントが一致する場合 ($\alpha = 0$) には、 $\overline{\cos^2 \alpha} = 1$ となつて、17式に帰着する。

分子の回転拡散が全くない場合

ガラス状態のように、分子の回転拡散が全くない場合、分子は空間的に固定されているので、 α の値は、分子内の励起と発光の遷移双極子モーメントの相対的な角度のみによって定まる。 $0 \leq \overline{\cos^2 \alpha} \leq 1$ であるから、蛍光異方性 r は、

$$-0.2 \leq r \leq 0.4 \quad (27)$$

の範囲の値を取り得て、この時の r は7式で r_0 と表記されている。励起と発光に關与するふたつの電子状態が同じ場合 (第1電子励起状態に励起し、そこから元の基底状態に戻る場合) には、一般に α がゼロから大きくはずれることはなく、 r_0 は0.4の近傍の値をとる。励起 (吸収) が高次の電子状態に起こり、発光が第1励起状態からの場合には、ふたつの遷移双極子モーメントは独立であるので、 α は任意の角度を取り得る。例えば、 $\alpha = 54.7^\circ$ では、 $r_0 = 0$ で、分子の回転拡散の有無に関わらず蛍光異方性はゼロになる。この角度は、magic angle と呼ばれる。 α がこの角度より大きい時には、 r_0 はマイナスとなる。

観測する発光波長は固定し、励起波長を変えて蛍光異方性を測定すると、励起波長に依存して励起される電子状態が変わるので、励起の遷移双極子モーメントのみが変わり、蛍光異方性に励起波長依存性があらわれる (実験2)。

回転拡散が存在する場合

回転拡散が存在する場合には、蛍光寿命と回転拡散の速さ (回転相関時間) との兼ね合いで、9式のように、蛍光異方性の値は変わる。回転拡散が非常に速く、 α が完全に空間的にランダムに分布する場合¹⁰は、

$$f(\alpha)d\alpha = \frac{1}{2} \sin \alpha d\alpha, \quad \overline{\cos^2 \alpha} = \frac{1}{2} \int_0^\pi \cos^2 \alpha \sin \alpha d\alpha = \frac{1}{3} \quad (28)$$

であるから、 $r \rightarrow 0$ となる。つまり、粘性の低い液体中など、蛍光寿命に比較して回転拡散が速い場合には、蛍光異方性の値はゼロになる。一般に、蛍光寿命の間に有限の回転拡散が起こる場合には、その度合いに応じて、蛍光異方性は、

$$0 \leq r \leq r_0 \quad (r_0 > 0 \text{ の場合}), \quad 0 \geq r \geq r_0 \quad (r_0 < 0 \text{ の場合}) \quad (29)$$

の範囲の値をとることになる。

¹⁰すなわち、励起時の分子の向き記憶は、発光時には完全に失われるような場合

(5) 蛍光エネルギー移動

蛍光共鳴エネルギー移動を起こすドナーとアクセプターが距離 R だけ離れて存在するとき、エネルギー移動速度 k_T は、

$$k_T = \frac{9000 \ln 10 k^2 \phi_d}{128 \pi^2 n^4 N_A R^6 \tau_D} \int_0^\infty \frac{F_d(\nu) \epsilon_a(\nu)}{\nu^4} d\nu \quad (30)$$

で表される。ここで、

N_A : アボガドロ数、 n : 媒質の屈折率、

ϕ_d : アクセプターがないときのドナーの量子収率、

τ_D : アクセプターがないときのドナーの蛍光寿命、

k : ドナーとアクセプターの遷移双極子モーメントベクトルの相対的な配向によって決まる双極子-双極子相互作用の角度依存因子、

$F_d(\nu)$: ドナーの (補正を加えた) 真の発光スペクトル、

$\epsilon_a(\nu)$: アクセプターの吸収スペクトル¹¹、

である。積分部分 $\int_0^\infty \frac{F_d(\nu) \epsilon_a(\nu)}{\nu^4} d\nu$ はドナーの発光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトル (脚注 11 参照) がどの程度重なっているかを表す。この式で、 R と τ_D 以外を

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln 10 k^2 \phi_d}{128 \pi^2 n^4 N_A} \int_0^\infty \frac{F_d(\nu) \epsilon_a(\nu)}{\nu^4} d\nu \quad (31)$$

とまとめて書いて、

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (32)$$

という表記がよく用いられる。ここで R_0 は、 $k_T = \tau_D^{-1}$ となるドナーとアクセプターの距離、つまり、エネルギー移動の速度がドナーのみの場合の発光速度と等しくなるような距離である。ドナーに吸収された光子のうち、どの割合がアクセプターに移動したかを表すエネルギー移動効率 E は、

$$E = \frac{k_T}{\tau_D^{-1} + k_T} \quad (33)$$

と表すことができ、ドナーとアクセプターが混在するときのドナーの寿命を τ_{da} とすると、

$$\tau_{da}^{-1} = \tau_D^{-1} + k_T \quad (34)$$

であるから、

$$E = 1 - \tau_{da}/\tau_D = 1 - F_{da}/F_d \quad (35)$$

と表される。ここで、 F_{da} と F_d は、それぞれ、アクセプターがある時とない時のドナーの蛍光収率である。

¹¹ 蛍光分光での励起スペクトルとほぼ同じものと考えてよい

以上は、ドナーとアクセプターが R の距離にある場合のエネルギー移動効率であった。溶液中や膜中ではドナーとアクセプターはいろいろな距離に分布しており、それらからの総和を観測していることになる。また、ドナーの蛍光寿命がドナーやアクセプターの拡散運動の時間スケールに比較して長い場合には、励起状態にある時間での分子拡散についても考慮する必要がある。詳細な導出は省略するが、溶液内で、ドナーとアクセプターがランダムに分布していると仮定した場合の時間に依存した全蛍光強度は、

$$I_d(t) = I_d^0 \exp(-t/\tau_D) \exp[-2\gamma(t/\tau_D)^{1/2}] \quad (36)$$

$$\gamma = [A]/[A_0]$$

$$[A_0] = \frac{3000}{2\pi^{3/2}N_A R_0^3} \quad (37)$$

で与えられる。ここで、 $[A]$ は mol/l で表したアクセプターの濃度である。定常光を用いた場合の相対的な収率は、

$$\frac{I_{da}}{I_d} = \frac{\int_0^\infty I_{da}(t)dt}{\int_0^\infty I_d(t)dt} = 1 - \sqrt{\pi} \gamma \exp(\gamma^2)[1 - erf(\gamma)] \quad (38)$$

$$erf(\gamma) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^\gamma \exp(-x^2)dx \quad (39)$$

で計算される。

膜融合の模式図

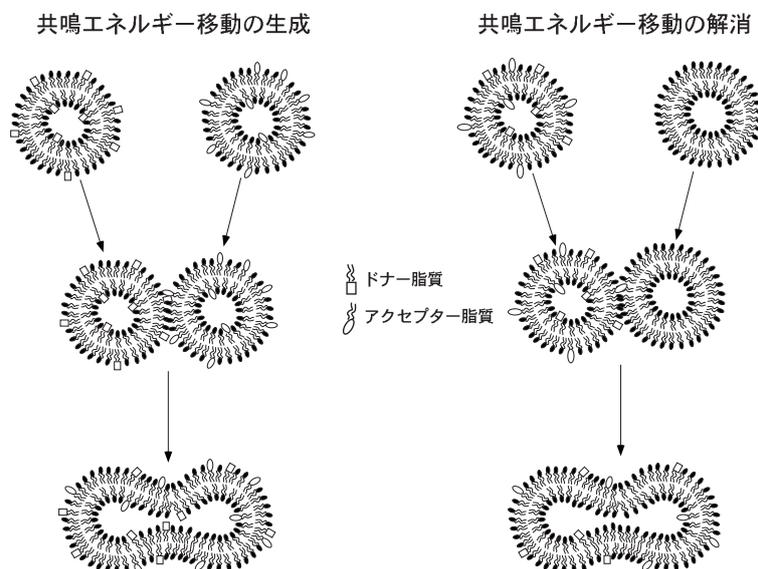


図 5: 共鳴エネルギー移動を利用した膜融合の測定法

リポソーム中にドナーとアクセプターに対応する 2 種の蛍光色素をラベルした脂質を混入させた系の場合、共鳴エネルギー移動効率を測定することで、リポソームの融合の度合いなどを見積もることが可能である。次ページの図で模式的に示すように、共鳴エネルギー移動を利用して、膜融合を観察するためには、2 種類の方法が考えられる。第一の方

法は、ドナーとアクセプター色素をそれぞれ別のリポソーム中に入れておく（図の左側）。この状態では、ドナーとアクセプターの距離は著しく離れているために、實際上、共鳴エネルギー移動はほとんど起こらない。膜融合にともなって、ドナーとアクセプター色素がひとつのリポソームに現れると、共鳴エネルギー移動が生成する。第二の方法は、ドナーとアクセプターをあらかじめひとつのリポソーム中に入れておく（図の右側）。この状態で、共鳴エネルギー移動が起こっているため、ドナーを励起してもドナー自身の発光はほとんど観測されない。これに、色素を含まないリポソームを融合させると、ドナーとアクセプターの距離が相対的に離れるため、共鳴エネルギー移動の効率が落ちて、ドナーの発光が観測されるようになる。どちらの方法にも一長一短があり、膜融合の進行を実際に確認するためには、両方を行ってみる方が望ましい。

§3 実験の概要と目的

次の6つの実験課題について実験を行い、レポートを提出する。実験は三人一組となつて行う。蛍光分光器は2台しかなく、それぞれで仕様がやや異なるので、実験に応じて使い分ける。実験1～6は、[1],[2-4],[5-6]という三つの分類ができる。実験1は、溶液の作成や分光器の使い方の練習でもあるので、最初に行う必要があるが、その後は[5-6]を最初に行ってもかまわない。実験[2-4]だけは、FP-6300を用いないと実験が行えないので、実験[2-4]を行うグループが優先的にFP-6300を用いる。計11日間の実験日があるが、大まかには次の予定で実験を進める。詳細はグループ間で相談して、進めること。なお、*が付いた日をめどに、それまでの実験の結果を、担当教員が見て、簡単な議論を行う。完全に操作を誤ったような実験結果に付いて、その後テキストにあるような解析を加えても、時間と労力の無駄になるので、実験がある程度うまくいっているかどうかを、結果を見て判断するためである。その時までには、測定したスペクトルなどの結果を出来る限り印刷し、疑問点を整理しておくこと。

	Aグループ	Bグループ
1日目	ガイダンスと実験0	
2日目	実験1(RF-1500)	実験1(FP-6300)
3日目		
4日目*		
5日目	実験[2-4](FP-6300)	実験[5,6](RF-1500)
6日目		
7日目*		
8日目	実験[5,6](RF-1500)	実験[2-4](FP-6300)
9日目		
10日目	予備	予備
11日目		

各実験の概要と目的は次の通りである。

[実験0]

液体の体積の秤量に用いるピペットマンの較正を行う。 [実験1]

水の散乱の測定と、ローダミンBのエタノール溶液の蛍光スペクトルおよび励起スペクトルを測定し、測定条件がスペクトルにどのように影響するかを理解する。

- 蛍光分光器の扱いに慣れ、基本的なスペクトルの測定法をマスターする。
- 測定条件によって、スペクトルがどのように変化するかを観察し、その原因を考える。

[実験 2]

ローダミンBのグリセリン中での偏光励起スペクトルを測定し、蛍光異方性の励起波長依存性を測定する。

- 蛍光の偏光スペクトルおよび蛍光異方性の測定法を理解する。
- 蛍光異方性の励起波長依存性の原因を考察し、蛍光異方性と遷移双極子モーメントとの関係を理解する。

[実験 3]

ペリレンのグリセリン溶液の蛍光異方性の温度依存性を測定する。

- 蛍光異方性とミクロ粘性との関係を理解する。

[実験 4]

ペリレンの DPPC および DOPC 脂質二分子膜リポソーム中での蛍光異方性の温度依存性を測定する。

- 脂質二分子膜の熱誘起相転移とそれに伴うミクロ粘性の変化を観察する。

[実験 5]

DOPC 脂質二分子膜リポソーム中でのローダミンラベル脂質と NBD ラベル脂質間の蛍光エネルギー移動の測定。

- 蛍光エネルギー移動がどのように引き起こされるかをスペクトルから理解する。

[実験 6]

DOPC の SUV リポソームのポリエチレングリコールによる膜融合の観察。

- 共鳴エネルギー移動の応用として、リポソームの膜融合を観察する。

§4 実験

(1) 蛍光分光器の光学系

分光器を操作する前に、光学系を良く理解しておくことが不可欠である。実験で用いる蛍光分光器の光学系を、図6(FP-6300)と図7(RF-1500)に示す。どちらも、基本的な構造は同じである。光源(Xeランプ)から出た光は、励起側回折格子によって波長が選択されて、試料に照射される。その際、励起側のスリットの幅の設定によって、照射される光の波長の幅(バンド幅)が制御される。試料からの光(蛍光や散乱)は、発光側の回折格子によって波長が選択されて、光検出器(光電子増倍管)で光の強度が検出される。観測される光の波長の幅は、発光側のスリット幅に依存している。

(2) スペクトル測定の実験条件

蛍光の発光スペクトルとは、励起波長は固定して、発光側の回折格子の角度を変化させ、検出する光の波長を変えた場合の光強度の変化の測定である。逆に、励起スペクトルは、励起側の回折格子の角度を変化させて、照射する光の波長を変化させた時の、検出し

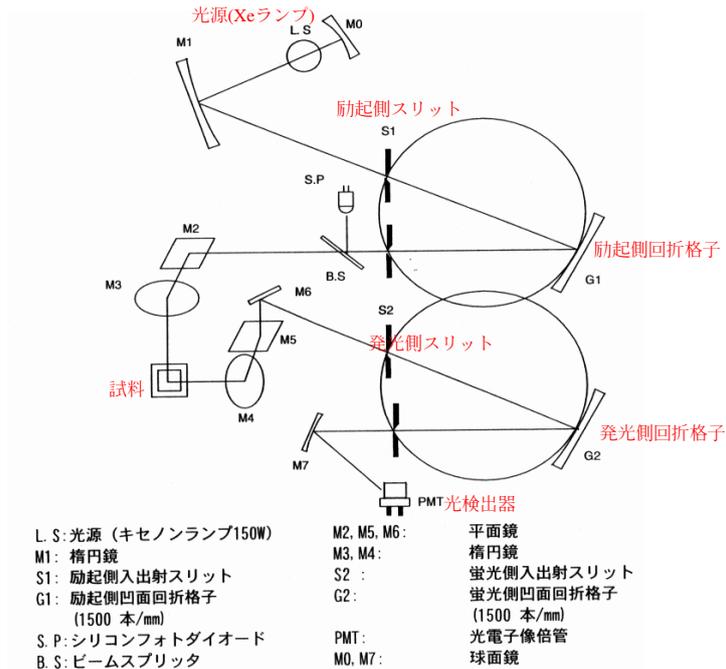


図 6: 蛍光分光器 FP-6300 の光学系

ている光強度の変化の測定であり、検出する光の波長は固定されている。励起・発光スペクトルを測定する際の留意点をまとめておく。

励起波長または発光波長 発光スペクトルの場合は励起波長、励起スペクトルの場合は発光波長を固定する。スペクトルの測定画面では、励起側 (Ex) と発光側 (Em) の波長は必ずどこかに表示されているので、指定した波長に固定されているか注意する。

波長範囲、スキャン範囲 スキャンする波長の範囲を指定する。発光スペクトルでは、固定した励起波長から長波長側の範囲を、励起スペクトルでは、固定した発光波長よりも短波長側の範囲を指定する。

バンド幅、バンドパス、スリット幅 呼び方は違ってても、これらは同じものを指す。スリット幅を狭くすると、回折格子に入射 (または出射) する光の角度が制限されて、回折条件を満たす光の波長の幅が狭くなるが、強度は減少する。

スキャン速度、走査速度 回折格子の角度を変えて、波長を変える速度。速くスキャンすると測定時間は短くなるが、他の条件を適切に設定しないと、スペクトルの形状が変わってしまう場合があるので注意する。

感度、Sensitivity 光電子増倍管 (光の検出器) に印加する電圧を変えて、光の検出感度を変える。感度を上げると、ノイズも増幅される。感度を変えた場合には、ゼロ点補正をやり直す必要がある。

レスポンス 光の検出信号の変化に対する追従性の時間。レスポンスを遅くす

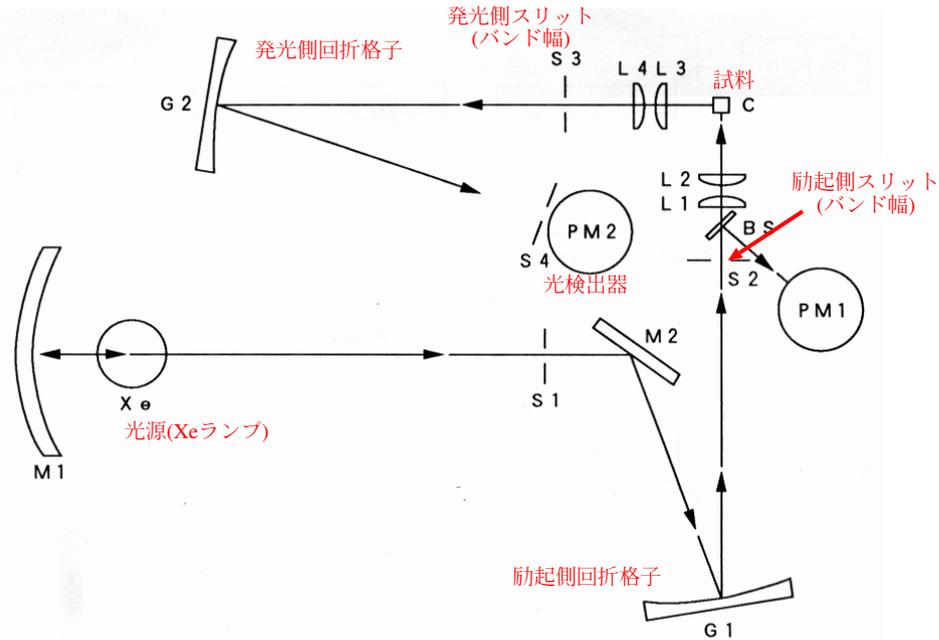


図 7: 蛍光分光器 RF1500 の光学系

ると、ランダムノイズは平均化されて消えるが、スキャン速度が速いと、スペクトルの形状が変わってしまう。

シャッター 光を照射し続けると、分解が進む¹²色素の場合には、測定以外の時は、励起側のシャッターを閉じておいた方がよい。分光器によっては、スペクトル測定開始時に、自動的に励起側と発光側のシャッターを開いて、測定を開始するモードもあるが、そうでない場合は、測定開始前に、両側のシャッターを開いておく。

ゼロ点補正、オートゼロ 光検出器である光電子増倍管の出力は、光が入射していない場合でも、ゼロにはならない。これを暗電流 (dark current) と呼ぶ。発光側のシャッターを閉じた状態での検出器の出力をゼロにセットする操作をゼロ点補正やオートゼロと呼ぶ。暗電流は、感度 (光電子増倍管に印加する電圧) に依存するため、感度を変えたら、ゼロ点補正をやり直す。また、時間の経過と共に、徐々に変わる場合もあるので、発光側シャッターを閉じた状態で、出力がゼロから有意にずれている場合にも、ゼロ点補正をやり直す。

以上の実験条件の制御パラメータや操作は、どのような分光器を使っても必ず必要になるものである。以下では、本実験で用いるふたつの分光器の使い方の概略を述べる。詳しい使用法については、それぞれの分光器の取扱説明書を参照すること。

¹²これを蛍光退色、photobleaching と呼ぶ。

(3) 蛍光分光光度計 (FP-6300) の使い方

(i) 装置の立ち上げ

FP-6300 の本体右下のメインスイッチを ON にして、制御用ノート PC の電源を入れる。FP-6300 は、すべての制御をノート PC の専用ソフトウェア (Spectra Manager) で行うようになっている。ノート PC の OS (Windows XP) が立ち上がったら、デスクトップ上の Spectra Manager をダブルクリックすると、図 8 の初期画面が現れる。

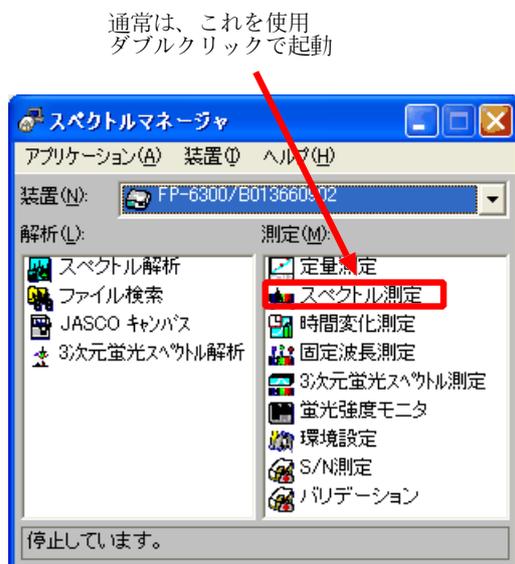


図 8: Spectra Manager の初期画面

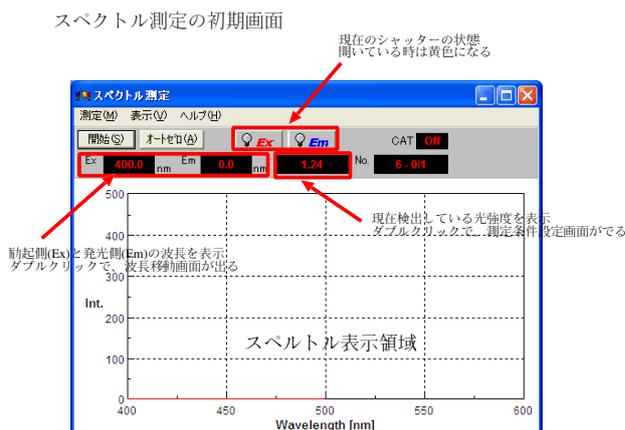


図 9: FP-6300 のスペクトル測定の画面

(ii) スペクトルの測定

通常は、励起スペクトルや発光スペクトルの測定を行うので、Spectra Manager の画面 (図 8) から、スペクトル測定を選択すると、図 9 の画面が現れる。

図 9 の画面で、上部にある Ex と Em の表示窓が、それぞれ、現在の励起側と発光側の回折格子の波長を表し、その右のある部分で、現在の光強度を表している。また、その上のランプマークの Ex と Em は、現在のシャッターの開閉状態 (白抜は閉状態、黄色が開状態) を表している。

スペクトルを測定するために、測定条件の設定を行う。「測定」メニューの「測定条件」を選択するか、または、現在の光強度を表示している領域をダブルクリックすると、条件設定画面 (図 10) が現れる。

この画面 (図 10) で、測定条件を設定して、OK ボタンを押すと、設定した条件が、分光器本体に送り出されてセットされる。

測定を開始する前に、発光側シャッターを閉じた状態で、検出器の出力が、ゼロになっているかを確認する。ゼロから有意にずれている場合は、オートゼロボタンを押して、ゼロ点を合わせる。



図 10: FP-6300 のスペクトル測定の条件設定画面

励起側と発光側のシャッターを開けて(黄色の状態にして)、開始ボタンを押して、測定を開始する。スペクトル表示画面(図9)に、回折格子の波長や光検出器の出力が、数値やグラフで表示されるので、意図した通りの測定を行っているか確認する。

測定が終了すると、データは自動的に、解析ソフトウェアに転送される。初めての測定で、解析ソフトウェアが立ち上がっていない場合には、新たに解析ソフトウェアを立ち上げてから、データを転送するので、少し時間がかかる。データの転送が完了すると、図11のような画面になる。

この解析ソフトウェアは、スペクトル解析の種々の機能を持っているが、特定の商用ソフトウェアの使い方を覚えることが、この実験の目的ではないので、解析は、gnuplot と perl のプログラムで行う。そのために、測定したスペクトルをテキスト形式で保存する。保存したいスペクトルの窓をアクティブにして、「ファイル」メニューから、「名前を付けて保存」を選び、ファイルの種類として、テキストファイルを選んで、わかりやすいファイル名を付けて保存する。

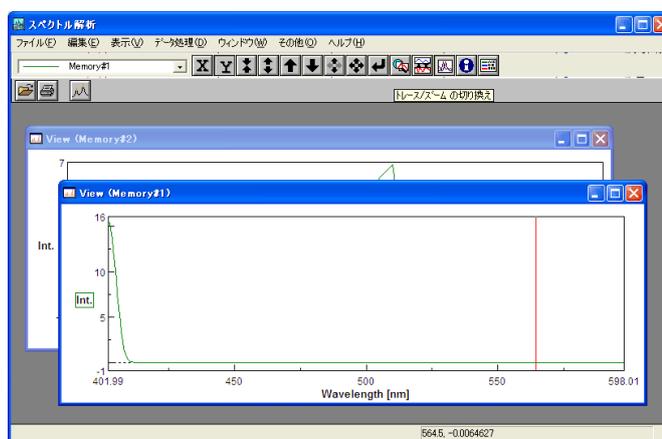


図 11: FP-6300 のスペクトル解析画面

(iii) 装置のシャットダウン

一般に、装置をシャットダウンする手順は、立ち上げの手順の逆を行えば良い。FP-6300 の場合は、制御用ノートPCで、測定プログラムやスペクトルマネージャーなどのソフトウェアをすべて終了させてから、OSをシャットダウンし、その後で、FP-6300 本体の電源ボタンをOFFにする。試料室内に試料セルや偏光子などがある場合には、取り除いておく。

(4) 偏光子を使った測定

(i) 用いる偏光子

実験2~4は、蛍光異方性の測定で、蛍光分光器(FP-6300)に偏光子(図12)を装着して、実験を行う。偏光子とは、ある方向の電場の光だけを透過させる素子である。偏光方向を互いに垂直にして、2枚の偏光子を重ねると、透過光はゼロになる。実験室には、透過電場の方向を \leftrightarrow で示したフィルム偏光子(ビニール袋に入れてある、取り出す必要はない)があるので、それと分光器に装着する偏光子を重ねて、つまみを回転させるなどして、偏光子の偏光方向を確認する。

装着する2枚の偏光子のうち、「UV/VIS」の刻印があるものは紫外まで光を透過する偏光子で、FP-6300の試料室の励起側(向かって正面側)のフィルター受けにセットし、「VIS」の刻印があるものは可視光のみを通す偏光子で、発光側(向かって右側)のフィルター受けにセットする。

偏光子取扱いの注意

偏光子は保存用のケースと袋から取り出し、使用後は元の状態に戻しておくこと。

偏光子の表面は蒸着されているので、絶対に触れてはならない。

(ii) 波長を固定した測定

実験の3と4では、最初に通常のスペクトル測定を行って励起波長と発光波長を決めた後は、励起波長と発光波長を固定して、蛍光強度の偏光依存性を温度を変えながら、測定する。その際は、スペクトル測定を終了して、スペクトルマネージャーの画面(図8)から、「時間変化測定」を選択する。

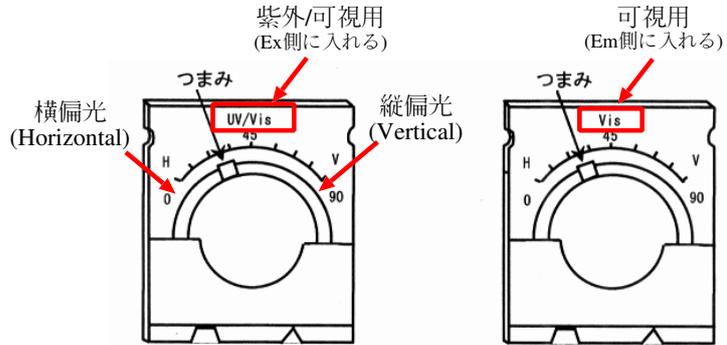


図 12: FP-6300 に装着する偏光子

(5) 蛍光分光光度計 (RF-1500) の使い方

(i) 装置の立ち上げ

RF-1500の本体右下のメインスイッチをONにして、しばらくすると、図13の初期画面が現れる。RF-1500につながっているノートPCは、測定したデータを転送する際に用いるので、この段階では、立ち上げなくても良い。

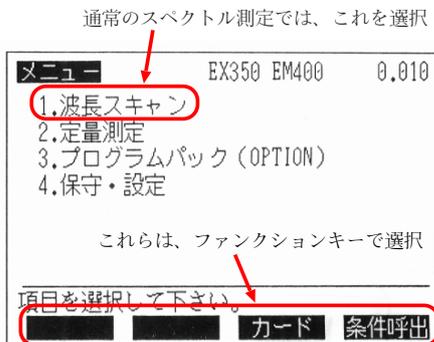


図 13: RF-1500 の初期画面

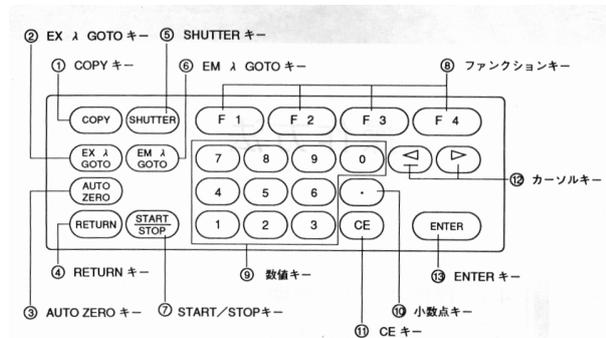


図 14: RF-1500 のキーボード

RF-1500の制御は、メニュー形式で、図13にあるようなメニューの番号をキーボード(図14)で押すと、そのメニューに入っていく。また、メイン画面の下方にある4つのメニューは、キーボード上のファンクションキー(F1~F4)に対応している。あるメニュー画面から、ひとつ前のメニュー画面に戻るには、キーボード上の「RETURN」キーを押す。シャッターの開閉や励起側・発光側の波長の移動など、頻繁に使ういくつかの操作は、キーボード上のキーに直接割り付けられている。

(ii) スペクトルの測定

通常は、励起スペクトルや発光スペクトルの測定を行うので、初期メニュー画面(図 13)から、1を押して、「波長スキャン」を選択すると、図 15の画面が現れる。



図 15: RF-1500 の波長スキャンの画面

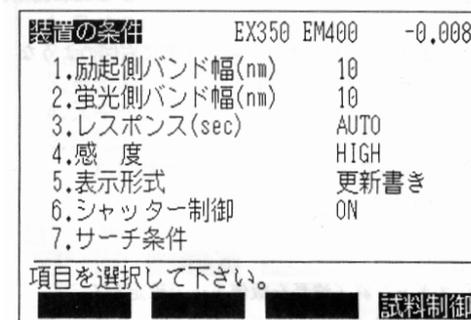


図 16: RF-1500 の装置条件設定画面

波長スキャンの画面(図 15)で、上部にある EX と EM が、それぞれ、現在の励起側と発光側の回折格子の波長 (nm) を表し、その右部分の数字は、現在の光強度を表している。この画面のメニューで、励起スペクトルか発光スペクトルかの選択や、スキャン範囲、スキャン速度等の設定は出来るが、その他の測定条件は、F4 で、装置条件設定画面(図 16)を呼び出して設定する。条件設定が終了したら、キーボード上の RETURN キーで、波長スキャンの画面に戻る。

測定を開始する前に、シャッターを閉じた状態で、検出器の出力がゼロになっているかを確認する。ゼロから有意にずれている場合は、キーボード上の AUTO ZERO ボタンを押して、ゼロ点を合わせる。

以上の準備ができれば、キーボード上の START/STOP キーを押して、測定を開始する。測定中は、図 17 の画面になるので、回折格子の波長や光検出器の出力が、数値やグラフで表示されるので、意図した通りの測定を行っているか確認する。

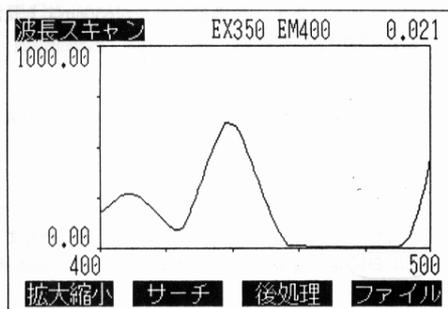


図 17: RF-1500 の測定画面

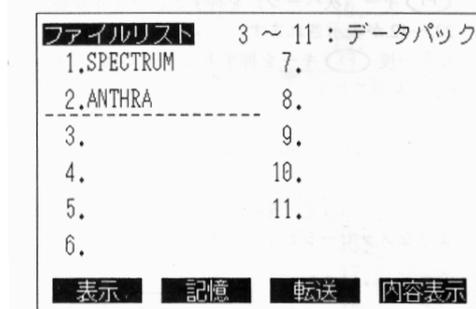


図 18: RF-1500 のファイル操作画面

試料セルを忘れずに、取り除いておく。

(6) 試料の調製法

(i) 脂質の stock solution (保存溶液) の作り方

脂質は、低濃度で用いることが多く、固体試料を微量計量することがむずかしいので、適当な濃度のクロロホルム溶液を作製しておき、それから決まった体積を測り取ることによって量を調整する。この適当な濃度に調整した脂質のクロロホルム溶液を、脂質の保存溶液 (stock solution) と呼ぶ。脂質の保存溶液は、脂質の分解を防ぐため、 -20 以下で保存する。試薬業者から購入したクロロホルム溶液は、 50mg/ml とか 1mg/ml のような濃度になっているので、そのままでは使用し難い。脂質の分子量を考慮して、 10mM や $100\mu\text{M}$ のような濃度の保存溶液に薄めてから使用する。

脂質は一般に高価であるので、グループ毎に新規に保存溶液を作成することはせずに、保存溶液は共用する。以前に作成された保存溶液が残っていれば、それを利用する。したがって、保存溶液の作成は重要で、間違った濃度で作成した場合には、それ以後のすべての実験に影響を及ぼすので、慎重に行うこと。ここでは、購入した脂質のクロロホルム溶液 (ガラスアンビル瓶) をクロロホルムで希釈して、保存溶液を作成する方法を述べる。

1. 購入した脂質のクロロホルム溶液は、生物物理研究室 (理学部総合棟 5 階) の -80 の冷凍庫に保存されているので、実験室の原液がなくなったら、担当教員または TA に申し出る。
2. 購入した脂質のクロロホルム溶液は、ガラスの密封容器 (アンビル瓶) で供給される場合が多い。アンビル瓶には、首のところに切口が付いているので、内容物がこぼれないように注意して切口より上を曲げると、切口部分で割れて、口が開く。口が開いたアンビル瓶は、そのままでは、溶媒が蒸発してしまうので、速やかに、キャップの付いたバイアル瓶に移す。移す場合には、パスツールピペットを用いる。以前の原液が入っていたバイアル瓶に残料があれば、それに追加してもよい。その場合には、前回と今回の原液の濃度が同じであることを、必ず確認する。前回の残料がほとんどない場合は、新しいバイアル瓶に移す。バイアル瓶は、 4ml の容量だが、満杯にすると、ピペットを挿入した時に溢れるので、原液の量が多い場合には、複数のバイアル瓶に移す。原液のバイアル瓶は、種類や濃度がはっきりとわかるようにしておく。
3. 原液のクロロホルム溶液の濃度から、DOPC の場合は 10mM 、Rh-DOPE と NBD-DOPE の場合は $100\mu\text{M}$ の濃度になるような溶媒と原液の量を計算する。クロロホルムは、プラスチック製のピペットマンチップをわずかに侵蝕するので、ガラス製のピペットやシリンジを用いて、目的の濃度の保存溶液を作成する。保存溶液を冷凍庫に保存する場合は、溶媒が蒸発して濃度が変わることのないように、ふたを強く閉めて、更に、パラフィルムでふたを固定しておく。

(ii) 脂質リポソームの作り方

1. 作りたい脂質の濃度と体積を決め、脂質の保存溶液の必要量を計算し、適当な大きさ (今回の実験では、すべて 4ml の容量) のバイアル瓶を準備する。

2. 脂質のクロロホルム溶液をピペットまたはマイクロシリンジで測り、バイアルに移す。100 μ l 以下であれば、マイクロシリンジを使う。マイクロシリンジは、まず、洗浄用のクロロホルムで何回か洗い（吸い込んでから外に捨てる）、測りたいクロロホルム溶液で1~2回洗って（共洗い）から用いる。使用した後は、洗浄用クロロホルムで洗っておく。
3. 窒素ガス吹き付け装置でクロロホルムを飛ばす。窒素ガス吹き付け装置は、まず、飛ばしたいバイアルの個数だけの吹き付け口を準備し、他の口はピンチコックで塞ぎ、窒素ポンベの元と減圧弁の出口バルブを開ける。次に、吹き付け口（パスツールピペット）から1cm くらいのところに手をかざして風量を確認しながら、減圧弁を徐々に開ける。手で、風を感じる程度の流量で十分である。次に、液面が吹き出し口から5mm 程度離れる距離にバイアルをクランプで固定する。数分でクロロホルムは蒸発する。
4. 残留クロロホルムを完全に蒸発させるため、真空デシケーター中に1時間以上放置する。まず、窒素ガス吹き付け装置でクロロホルムを蒸発させたバイアル瓶をガラスデシケーター中に入れ（バイアル瓶のキャップは外したままか、緩く被せるかのどちらかにする）、デシケーターのふたを閉める。ロータリーポンプにつながった真空ゴムホースをデシケーターの吸い込み口につけて、吸い込み口のcockを閉めてから、ロータリーポンプのスイッチをONにして、まず、吸い込み口までを真空に引く。ロータリーポンプの音が落ちついて吸い込み口までが真空になったら、吸い込み口のcockを少し開ける。ロータリーポンプの油蒸気が激しく出たら、cockを少し閉めて、少しずつ引くようにする。cockを開けてもロータリーポンプの音があまり変わらないようになったら、cockを全開にする。1時間以上引いたら、デシケーターの吸い込み口のcockを閉めて、ロータリーポンプのスイッチをOFFにする。真空ゴムホースをはずし、吸い込み口のcockを徐々に開けて大気圧に戻してから、デシケーターのふたをずらして開けてバイアルを取り出す。このとき、バイアルの壁面に脂質がフィルム状に付着しているのを確認する（濃度の薄く色素を含まない場合は、肉眼でははっきりとはわからないかもしれない）。この状態で、冷凍庫に入れておけば、数週間は脂質は安定である。
5. バイアルに蒸留水をピペットマンで加え、バイアルのふたをきつく締める。一旦水を入れると、脂質は非常に分解しやすくなるので、水を入れた脂質水溶液（リポソーム溶液）は、出来るだけ早く測定する（少なくとも、1週間以上は放置しない）。また、水を入れたバイアル容器を冷凍庫に入れると、氷の生成によって膨張し、バイアル瓶が壊れるので、水を入れた後の試料を保存する場合は、冷蔵庫に入れる。
6. 超音波発生器の準備をする。一般に、超音波によってリポソームを作製する場合、温度は膜が液晶相である温度（主相転移よりも10 程度以上高温）で行う必要がある。したがって、DOPC のリポソームのみを作成する場合は室温の水でもよいが、DPPC を含むリポソームを作成する場合（実験4）は55 程度の湯を超音波水槽に入れてHEATER をONにする。超音波発生器付属のヒーターは出力が弱く、水から温度を上げるには長時間かかるので、湯沸機から湯を入れる。

7. バイアル内の液面が、超音波水槽の液面よりも低くなるように、バイアルを手で持ち、超音波の出力を最大にして、30秒程度超音波をかける。取り出してすぐに試験管ミキサーで激しく攪拌する。この操作を3~4回繰り返す。これで、脂質のフィルムが壁面からはがれ、リポソームが生成される。水溶液が白く懸濁するはずである。この段階のリポソームは、ほとんどが多重層膜 (MLV) になっている。リポソームの膜融合を観察する以外のリポソームは、MLV でよいので、これで操作終了。
8. 膜融合の測定に用いるリポソームは SUV であるので、(7) で調製した MLV に高出力の超音波をかけて SUV を作製する。高出力の超音波は、生物物理研究室の総合棟 533 号室に設置されているプローブ型の超音波発生器を用いて、3~4分超音波をかける。超音波により最初白く濁っていた懸濁液が透明になっていくことを確認する。実際にこの超音波装置を使う場合は、教官や TA などに相談する。

(iii) 器具の洗浄と乾燥

ガラス器具は破損し易いので取り扱いには十分に注意を払い、再使用のためによく洗浄しなければならない。洗浄は使用後、速やかに行うのがよい。水溶性のものであれば、水道水で洗い蒸留水すすげば十分である。脂溶性 (有機溶媒に可溶) であればエタノールで洗い流し蒸留水すすげばよい。そのために、蒸留水の入った洗浄ビンおよびエタノールが入った洗浄ビンが用意してある。勿論、洗剤を用いてスポンジまたはブラシを使えば汚れをほぼ完全に除去することが出来る。洗い難い構造のものは超音波洗浄機が効果的である。いずれにしても、使用した者が汚れについてもっともよく知っているのだから、責任を持って洗うことである。洗浄したガラス器具は乾燥機で乾燥する。乾燥機の温度は 60 で用いる。メスピペットなどの量を計るガラス器具は高温では変形する可能性があるため、自然に風乾させるのが原則である。しかし、メスピペットは風乾ではなかなか乾燥しないので、60 という低温の乾燥機で乾燥させる。加熱により溶けるプラスチック類 (バイアル瓶のふたやピペットマンのチップ) は風乾させる。乾燥した器具は速やかに所定の場所に移して格納する。

(7) 実験操作

(i) [実験0] ピペットマンの較正

実際の実験を行う前に、溶液の体積を計るピペットマンの較正を行う。

1. 100ml か 50ml 容量のビーカーをふたつ準備し、一方に純水を 30~40ml 入れる。空のビーカーを、化学天秤に載せて、ゼロ点をセットする。
2. 較正するピペットマンの最大容量 (5000、1000、200 μ l) に合わせ、純水を取って、天秤内のビーカーに入れて、重さを計る。再度、ゼロ点をセットし直し、同じ操作を 5 回繰り返す。
3. 測定結果のバラツキが極端に大きい場合には、操作自体に誤りがある可能性もある。また、ピペットマン自体が故障している (例えば、内部の O-リングの損傷で、液洩れするような場合) 可能性もあるので、担当教員または TA に申し出る。

4. 測定結果に再現性があれば、測定の平均値を、以後の操作で用いる。例えば、 $1000\mu\text{l}$ のピペットマンの測定値が、 $950\mu\text{l}$ であった場合には、以後、このピペットマンで $500\mu\text{l}$ を秤量する場合は、 $550\mu\text{l}$ にセットして使う。
- (ii) [実験1] 水の散乱の測定と、ローダミンBのエタノール溶液の蛍光スペクトルおよび励起スペクトルの測定
1. ローダミンBのエタノール溶液の原液（既に準備されている）から、 $100\mu\text{M}$ の濃厚なエタノール溶液を 2ml 程度、 4ml のバイアル瓶に作成する。M (molar、モラー) という単位は、 mol/l を表す。エタノールは、試薬ビンから 30ml 程度のバイアル瓶に移したのから、ピペットマンで加えてよい。大きな試薬ビンに直接ピペットなどを差し込むことは、試薬全部を汚染してしまう可能性があるため、極力避ける。ローダミンBの溶液が均一になるように、試験管ミキサーで激しく攪拌する。出来た溶液には、テープを貼ってサインペンで溶液の種類・濃度・作成日・作成者などを書き込んでおく（実験2でも用いる）。
 2. 4(1). 蛍光分光光度計の光学系と、4(2). スペクトル測定の実験条件を熟読し、これから、何を測定する装置をどのように制御しようとしているのかを理解する。使用する蛍光分光器の立ち上げ手順 (FP-6300 は4(3)、RF-1500 は4(5)) に従って、装置を立ち上げる。
 3. 測定条件の設定画面 (FP-6300 は図 10、RF-1500 は図 15 と図 16) を開き、どのような測定条件が制御可能であるのかを確認する。
 4. 励起波長を 550nm に移動して、シャッター (FP-6300 では励起側のみ) を開けて、分光器の試料室を開けて、緑色の励起光が出ていることを確認する。また、白紙の破片などを用いて、励起光がセルホルダーのどこに照射されるのか、測定のためには最低どの程度の試料の量があれば良いのかを確認する。
 5. ローダミンBの蛍光スペクトルを測定する前に、蛍光分光器の特性や、波長とエネルギーとの関係などを理解するために、水のレーリー (Rayleigh) 散乱とラマン (Raman) 散乱を測定する。石英セル¹³に、純水¹⁴を測定に必要な量だけ入れて、分光器のセルホルダーにセットする。
 6. 励起波長を 300nm 、発光波長範囲を $280\sim 650\text{nm}$ 、感度 (Sensitivity) を High にセットして、発光側をスキャンして、発光スペクトルを測定する。 300nm 付近に強いピーク、それより数 10nm 長波長側に弱いピーク、 600nm 付近にやや強いピークが観測されるはずである。 300nm のピークが飽和したり、弱すぎたりした場合は、感度やバンドパスを変えて、再度測定する。 300nm 付近のピークはレーリー散乱と呼ばれる散乱で、分子によって励起光と同じエネルギー (波長) で散乱される成分である。レーリー散乱よりもやや長波長側のピークはラマン散乱と呼ばれる散乱で、分子の振動

¹³ 石英セルを持つ時、手垢などが測定に影響を与えないように、分光器にセットした場合の励起光や観測する発光に無関係な場所を持つようにする。すなわち、上部を持つか、または、底と上面で挟むかのどちらかで持つ。

¹⁴ ここでの純水は、洗浄用の洗ピンなどから採取して構わない。後の実験で、リポソーム作成用の純水は、必ず、純水製造装置から、ビーカーなどに直接採取したものをを用いる。

エネルギーの分だけ励起光とずれたエネルギーで散乱される成分である。600nmの成分は、300nmのレーリー散乱が、発光側の回折格子で回折条件を満たしてしまっただけのために観測される artifact¹⁵である。次の測定を開始する前に、このスペクトルを保存し、どのような試料をどのような条件で測定したスペクトルなのかをノートに記録しておく。以後、すべての測定において、測定したスペクトルは保存して、条件等を記録しておく。

7. 励起波長を 310nm に変えて、他の条件は変えずに、発光スペクトルを測定する。次に、励起波長を 350nm に変えて、発光範囲 330 ~ 500nm の範囲で、更に、励起波長を 400nm に変えて、発光範囲 380 ~ 550nm の範囲で、発光スペクトルを測定する。これらの測定を通じて、散乱(レーリー-モラマンも)は、励起波長に依存して、その位置が変わることを理解する。これから測定する蛍光色素の蛍光スペクトルは、蛍光色素の電子状態の変化に対応する光の吸収や発光であるので、励起波長の位置をわずかに変えても、発光のピーク位置はシフトしない。ただし、実験 2 以降のスペクトルの測定では、リポソームや試料中の気泡などによって、蛍光よりも強い散乱が出る場合がある。このような場合に、発光と散乱を区別するためには、励起波長や発光波長を少し変えた場合に、スペクトルのピークがシフトするか否かで判断可能であることを理解する。なお、ここで測定した水の散乱のスペクトルは、6(2)の考察の視点に基づいて、解析する。
8. 1 で作成した原液をエタノールで薄めて、蛍光測定に用いる 1 μ M の希薄な溶液を作る。1 μ M の溶液を石英セルに移し、ローダミン B の蛍光スペクトルを測定する。
9. 励起波長を 520nm、発光波長範囲を 500 ~ 700nm にセットして、発光スペクトルを測定する。純水の測定の条件では、ピークが飽和してしまうはずであるので、感度を落として再度測定する。

注意：RF1500 の場合、スペクトルの強度が、感度が LOW でバンドパスを最も狭くした場合でも飽和したときは、発光側に ND フィルター（30 % と 5 % 透過の 2 種類を準備してある）を入れて、光量を落とす。

10. 発光スペクトルのピークに発光波長を合わせ、励起スペクトルを測定する。励起スペクトルのスキャン範囲は、発光波長よりも短波長側（高エネルギー側）だけしか意味がない。最短波長は、分光器の限界に近いところまで出来るだけ広くとる。一般に、励起スペクトルの短波長側の小さなピークは、メインのピークに比較して強度が極端に弱いので、その領域だけ拡大して表示することも必要である。
11. 励起スペクトルのピークに励起波長を合わせ、再び発光スペクトルを測定し、上の結果と比較する。その他の励起波長（励起スペクトルの短波長側の小さなピークなど）でも発光スペクトルを測定してみて、励起波長を変えると発光スペクトルの強度や形状がどのように変化するか（あるいは変化しないのか）を観察し、その原因を考える。励起波長とともに波長が変わる成分は、散乱であることに留意する。

¹⁵実際には存在しないが、測定の問題などが原因で見かけ上見えてしまうもの。この場合は、600nmの回折条件では、その半波長の 300nm の光も回折条件を満たしてしまうために生じる。

注意：励起波長を短波長(高エネルギー)に設定した場合には、その近傍で発光する可能性もあるので、発光波長範囲は、その波長付近から取るように、毎回、変更すること。

12. いくつかの発光波長で励起スペクトルを測定し、発光波長を変えると励起スペクトルの強度や形状がどのように変化するか(あるいは変化しないのか)を観察し、その原因を考える。この時、上で測定した発光スペクトルで全く強度がない波長に発光波長をあわせても、有効な励起スペクトルは測定出来ず、現われるのは散乱の成分のみであろう。ブロードな(=幅の広い)発光スペクトルの短波長側や長波長側に発光波長を合わせたときに、励起スペクトルが変化するかどうかも観察する。
 13. 以上の操作を通して、蛍光の発光スペクトル・励起スペクトルとは何であり、観測されたスペクトルから、光による分子の励起状態への遷移とその後の発光の過程にどのような特性があるのかを、Jablonskiのダイアグラムから理解する。例えば、高次の電子状態へ励起した場合に発光はどこから起こるか、発光スペクトルの形状が励起エネルギーなどに依存するのかなどを考える。
 14. その他の測定条件(バンド幅、感度、スキャンスピードなど)を色々に変えてみて、スペクトルを測定する。スペクトル形状が測定条件によって見かけ上どのように変化しているかを観察し、その原因について考察する(このテキストだけでなく、分光器の取扱説明書、参考文献も参考にする)。測定したスペクトルは、一旦分光器のメモリーに保存し、まとめてパソコンに転送する。測定条件を変えた場合にスペクトルがどのように変化するか細かい点を見るためには、スペクトル間の差や比をとる、面積や最大強度などで規格化してプロットするなどの方法があるので、色々試してみる。
- (iii) [実験2] ローダミンBのグリセリン中での蛍光異方性の励起波長依存性の測定
1. 実験の効率上、実験4のDPPCとDOPCのリポソーム作成(クロロホルムを蒸発させるまで)の操作を、以下のローダミンBのグリセリン溶液を作成する操作と同時に行って、クロロホルムを真空デシケーター中で完全に蒸発させている間に、実験2のスペクトル測定を行った方がよい。
 2. [実験1]で作成した $100\mu M$ のエタノール溶液から、ローダミンBのグリセリン溶液($1\mu M$)をつくる(濃厚なエタノール溶液をグリセリンに溶かす。グリセリンに対してエタノールが1%以下であれば、溶媒として無視してよい)。グリセリンは粘性が高く、簡単には均一な溶液にならないので、バイアル瓶を試験管ミキサーでよく攪拌する。石英セル¹⁶に移し、試料室にセットする。
 3. 発光スペクトルと励起スペクトル(励起スペクトルは220nmから測定する)を測定する。実験1で測定したローダミンBのエタノール中のスペクトルと比較して、スペクトル形状が、大きくは変わっていないことを確認する。

¹⁶実験室には、2種類のガラスセルが存在する。パイレックスガラス製と石英ガラス製である。違いは、短波長側の光をどこまで透過するかで、紫外領域が重要な場合は、石英ガラス製を用いる。この実験は、高次の電子状態への励起にも興味があるので、必ず、石英ガラス製のセルを用いる。石英ガラス製には、“U”の刻印がある。

4. 4(4). 偏光子を使った測定に従って、偏光付属装置を試料室にセットする。
5. 発光スペクトルのピークに発光波長をセットし、VV、VH、HV、HH、VVの各偏光で励起スペクトルを測定し、ファイルにセーブしておく。後で、各スペクトルを40、41式にしたがって演算する場合に、あまり強度が少ないと、計算によるデジタル誤差が生じるので、感度を上げて強度をかせぐ。感度を”HIGH”にすると飽和してしまい、感度が”LOW”だとシグナルが弱い場合には、バンド幅を広げて（あるいは狭めて）調節する。また、ゼロ点が合っていないと、スペクトル強度がマイナスになってしまう場所が生じるので、感度の調整後、ゼロ点補正を行ってから測定する。最初と最後のVVのスペクトルを比較し、変化していないことを確認する。有意に変化している場合には、測定中に何らかの状態が変わってしまったためであり、そのままでは、途中の偏光スペクトルも信用できないので、再度、測定する。変わってしまう原因で、最もありそうなものは、グリセリンの粘性が高いために、色素が均一に溶けていないことや、グリセリン中に残った気泡が徐々に抜けていったために、散乱が減り、励起光強度が変わったため、などが考えられる。
6. データをSTEXに転送し、g-factor や anisotropy などのプログラムを用いて、データを解析する。まず、分光器の偏光に対する感度補正を行うためのG因子を求める。G因子は、通常発光波長に依存し、励起波長には依存しないが、ここでは励起スペクトルを用いてそれを確認する。G因子とは、散乱平面（励起光の方向と検知する蛍光の方向を含む平面）と平行・垂直な偏光方向をそれぞれH、Vで表し、例えば、励起波長 (ν_{ex}) に依存した、H偏光に対するV偏光の蛍光強度を $I_{HV}(\nu_{ex})$ と表すと、

$$G(\nu_{ex}) = I_{HV}(\nu_{ex})/I_{HH}(\nu_{ex}) \quad (40)$$

と定義される。このG因子を含めて、蛍光異方性は、実験的に、

$$r(\nu_{ex}) = \frac{I_{VV}(\nu_{ex}) - G(\nu_{ex})I_{VH}(\nu_{ex})}{I_{VV}(\nu_{ex}) + 2G(\nu_{ex})I_{VH}(\nu_{ex})} \quad (41)$$

と求められる。

7. G因子、蛍光異方性、偏光に依存しない蛍光強度 (41 式の分母) の励起波長依存性をプロットしてみる。550nm で励起した場合の蛍光異方性は、文献値では室温で、 0.36 ± 0.01 であるので、これと実測値を比較する。また、蛍光異方性の励起波長依存性について考察する。

(iv) [実験3] ペリレンのグリセリン溶液の蛍光異方性の測定

(v) [実験4] ペリレンの DPPC および DOPC 脂質二分子膜リポソーム中での蛍光異方性の測定

実験3と4は、温度変化に時間がかかるので、同時に行う。

1. ペリレンのストック溶液はあらかじめ作製されているものを利用する。

2. 試料の調製法、脂質リポソームの作り方にしたがって、DOPC と DPPC の脂質 2 分子膜リポソームを作製する。脂質濃度 $100\mu\text{M}$ のものを 2ml つくる。その際、脂質と色素(ペリレン)を良く混合させるため、クロロホルムを蒸発させる前に、ペリレンの保存溶液を $1\mu\text{M}$ になるように加える。クロロホルムを完全に除去するためにロータリーポンプで 1 時間以上真空乾燥させるまでは、蛍光分光器を使う日の前の実験日に行っておく。そのバイアルにきつくふたをして、冷凍庫に入れておく。
3. 温度変化の測定は 15°C から開始するが、FP6300 につなげてある恒温循環水槽の冷却に時間がかかる(「取扱説明書」(19p)) ので、実際の測定を行う日は、出来るだけ早く、水温を 15°C に設定して、「RFE.」キーを押しておく(キーを押してから冷却器が作動するまで、30 分かかる)。また、最初は分光器に水を循環させる必要はないので、「PUMP」キーは OFF にしておく。
4. 試料の調製法、脂質リポソームの作り方にしたがって、冷凍庫に保存してあったバイアルに水を 2ml 加え、MLV リポソームを作製する。この時、DPPC については、いわゆる相転移温度以上で操作する必要があるので、超音波発生器の水温を 55°C 程度に設定する(DOPC についても同じ温度で作成して構わない)。
5. グリセリンを 2ml バイアルにとり、ペリレンのストック溶液を、濃度が $1\mu\text{M}$ になるように加え、試験管ミキサーで激しく攪拌する。グリセリン溶液は粘性が高いため、湯の中に少し浸し、温度を上げてから、攪拌すると良い。
6. 3 種の試料を石英セルに移し、脂質リポソーム溶液にはマイクロスターラーチップを入れ、溶媒の蒸発を抑え異物の混入を防ぐために、石英セルにパラフィルムなどでふたをする。
7. 蛍光分光器のスイッチを ON にする。偏光付属装置がセットされていない場合は、保管容器から取りだしセットする。
8. グリセリン溶液を用い、室温で、蛍光スペクトルおよび励起スペクトルを測定する。ペリレンは、励起・発光スペクトルともいくつかのピークが見られるはずであるが、(散乱の影響を少なくするため)励起波長と発光波長がバンドパスよりも大きく(4 倍以上)離れたピークを選択する。しかし、あまりに離れた波長の組を選択すると蛍光強度が弱くなって正確な測定ができなくなるので、蛍光強度との兼ね合いで適切な波長を選択する。決めた励起波長で、2 種類のリポソームについても、発光スペクトルを測定する。3 種類の試料の色素濃度は同じなので、同程度の発光強度が得られていることを確認する。この時測定したスペクトルは、必ず、保存しておく。以下の測定では、スペクトルスキャンは行わず、このように決めた励起波長と発光波長での偏光測定を行う。
9. 恒温水槽の水温が 15°C になっているか確認する。まだ冷えてなくて、出来るだけ早く測定を開始したい場合には、氷で水温を 15°C まで冷やすことも可能である。氷は、隣の電気伝導度の実験室に製氷器があるはずなので、借用する。

10. 水槽内のセル立てに3つの試料が入った石英セルを入れる。恒温循環水槽の「PUMP」キーをONにして、水を分光器に循環させ、測定を開始する。
11. 上の操作で決めた励起波長と発光波長で各偏光に対応する光強度を測定する。測定は、4(4)(ii)の波長を固定した測定で行う。試料をセットし、VV,VH,HV,HH,VVの順に偏光子をまわしてデータの値を読みとり、ノートに記録しておく。最後にVVをもう一度測定するのは、光照射や温度の変化等によって強度に変化があるか否かを確認するためである。ひとつの試料が終わったら、すぐに次の試料について同じ測定を行う。設定温度が室温から大きく離れているときは、水槽と試料室のセルホルダーの温度にずれがあるので、試料室に移してからできるだけ早くデータを取得した方がよい。
12. 3種類の試料について、各々5個の偏光データを取得したら、水槽の温度を25 に上げる。画面に表示されている時間変化測定のデータは、一応、保存しておく。
13. 温度が安定したら、3種類の試料について、各々5個の偏光データを取得する。温度は、15、25、35、40、42、45、55、65 の順に測定する。室温より高温での温度制御に、冷却器は必要ないので、35 に設定したときに、「RFE」キーを押して、冷凍器をOFFにする。温度を大きく上昇させる時、恒温循環水槽のヒーターだけでは時間がかかり、急いでいる場合には、湯沸器の湯を水槽内に入れてもよい。そうする場合には、恒温循環水槽背面のドレインバルブから水を抜きながら、水槽内の水量を調節する。すべての温度で、3種類の試料について、各々5個の偏光データを取得したら、実験は完了である。
14. 解析においてまず算出したいのは、各試料各温度における蛍光強度および蛍光異方性の値である。最初と最後に得たVVの値が変わっていなければ、4つの偏光データを用いて強度および蛍光異方性の値を算出する。大きく変わっている場合には、直線補間¹⁷などによって、VH,HV,HHの値を補正して用いることが必要である。aniso_vs_temp というプログラムには、この機能が組み込まれている(詳しくは、aniso_vs_temp のプログラムの内容を見ること。) 蛍光異方性は41式にしたがって計算する(但し、波長は固定しているので、励起波長依存性はない)。蛍光異方性の温度依存性についての原因について考える。蛍光強度は41式の右辺の分母に対応する。蛍光強度は、次に述べるように、蛍光寿命を見積もるためにも用いる。

温度を変えると溶媒の粘性だけでなく、蛍光寿命も変化する。本実験装置(定常光の測定)では、蛍光寿命を直接に測定するのは不可能であるが、寿命が一成分(緩和が単純な指数関数)であれば、全蛍光強度の測定値から次の式によって、温度による蛍光寿命の変化を算出できる。

$$\tau = \tau_S \frac{I_{VV} + 2GI_{VH}}{(I_{VV} + 2GI_{VH})_S} \quad (42)$$

¹⁷一般には、離散的なデータ点の途中を、直線的に補間する方法である。この場合には、最初と最後のVVの値が変わった要因が、時間に対して直線的に変化していると仮定して、途中のVHなどの値を類推する。

ここで、 τ_S 、 $(I_{VV} + 2GI_{VH})_S$ は、標準温度（ここでは 25 とする）での蛍光寿命と全蛍光強度である。 τ_S の値は文献値を用いる（APPENDIX を見よ）。

次に、蛍光異方性のマイクロ粘性との関係にもとづいて、グリセリン溶液について、変形ペラン・ウェーバーのプロットを試みる。粘性の値は、参考文献 2 を参照する。

の値として文献値を用いれば、ペリレンの回転分子体積が定まる。計算の際、数値だけを計算するようなことをせず、必ず単位も式の中に入れて計算すること。これにより、 V が体積の次元になっていることを確認せよ。ペリレンの比重を 1.35 と仮定して、算出した分子体積と比較してみる。次に、脂質リポソームの蛍光異方性の値を温度に対してプロットする。また、DPPC の相転移温度を文献の値と比較してみる。余裕があれば、グリセリンの結果から外挿して、縦軸の蛍光異方性の値を粘性に変換してみると、脂質二分子膜の炭化水素鎖の部分がどの程度のマイクロ粘性を持っているのかを、一般的な溶媒の粘性などと比較して考えてみるができる。

- (vi) [実験 5] DOPC 脂質二分子膜リポソーム中でのローダミンラベル脂質と NBD ラベル脂質間の蛍光エネルギー移動の測定
- (vii) [実験 6] DOPC の SUV リポソームのポリエチレングリコールによる膜融合の観察
[実験 5] と [実験 6] も 1 日のうちに測定を終わらせた方がよいので、並行して手順を説明する。

1. 測定を行う前の実験日に脂質リポソームのフィルムをバイアルに作製して冷凍庫に保存しておく。作製するのは、次のものである。以下、ローダミンラベルした DOPE を Rh-DOPE、NBD ラベルした DOPE を NBD-DOPE と表記する。作りたい水溶液の量が違うので注意すること。
 - (a) 水溶液 40ml 中で DOPC/Rh-DOPE = 100 μ M/1.0 μ M
 - (b) 水溶液 40ml 中で DOPC/NBD-DOPE = 100 μ M/1.0 μ M
 - (c) 水溶液 2ml 中で DOPC/NBD-DOPE/Rh-DOPE = 100 μ M/1.0 μ M/0.1 μ M
 - (d) 水溶液 2ml 中で DOPC/NBD-DOPE/Rh-DOPE = 100 μ M/1.0 μ M/0.2 μ M
 - (e) 水溶液 2ml 中で DOPC/NBD-DOPE/Rh-DOPE = 100 μ M/1.0 μ M/0.4 μ M
 - (f) 水溶液 2ml 中で DOPC/NBD-DOPE/Rh-DOPE = 100 μ M/1.0 μ M/0.7 μ M
 - (g) 水溶液 40ml 中で DOPC/NBD-DOPE/Rh-DOPE = 100 μ M/1.0 μ M/1.0 μ M
 - (h) 水溶液 2ml 中で DOPC/NBD-DOPE/Rh-DOPE = 100 μ M/1.0 μ M/2.0 μ M
 - (i) 水溶液 100ml 中で DOPC = 100 μ M
2. 前日に作製しておいたリポソームのフィルムに水を 2ml 加え、室温で超音波を 30 秒間、試験管ミキサーでの攪拌を 30 秒間、のサイクルを 3~4 回程度行う。溶液が白濁、または色素の色に濁るはずである。蛍光の測定は、すべて、脂質濃度を 100 μ M、2ml で行うので、(a),(b),(g) は 20 倍の濃度、(i) は 50 倍の濃度のリポソーム溶液を作製したことになる。

3. (a),(b) を 20 倍に薄めたものを 2ml 作り、それぞれの発光スペクトルと励起スペクトルを測定し、共鳴エネルギー移動が起こる条件について考える。
30 式からわかるように、共鳴エネルギー移動速度はドナーの発光スペクトルとアクセプターの励起スペクトルの重なりに比例するので、NBD の発光スペクトルとローダミンの励起スペクトルの重なりを確認する。
共鳴エネルギー移動が起きたかどうかを調べるためには、ドナー (NBD) だけを励起し、アクセプター (ローダミン) が励起されない励起波長を選択して、発光スペクトルを測定する必要がある。NBD の励起スペクトルのピークの近傍で、ローダミンの励起スペクトルの極小の波長を励起波長として選ぶ。実際にその波長で、ローダミン入りリポソーム ((a) を薄めたもの) の発光スペクトルを取ってみて、どの程度励起されるのかを確認する。
その後、両者を混ぜて試験管ミキサーで攪拌し、上で決めた励起波長で、発光スペクトルを測定してみる。ただ混ぜただけでは、エネルギー移動は起きないことを確認する。
4. (g) を 20 倍に薄めたものを 2ml 作製し、それと (c) ~ (h) までの発光スペクトルを測定する。励起波長は、上で求めた、NBD だけを励起する波長を選ぶ。ローダミン (アクセプター) の濃度が高くなるにしたがって共鳴エネルギー移動が起こってくるはずである。これらの発光スペクトルは、後の解析のためにパソコンに転送しておく。これで、[実験 5] は終了。
5. 次に、ポリエチレングリコール (PEG) による膜融合の実験をおこなう。共鳴エネルギー移動の生成と解消の 2 種類の実験で膜融合を観察する。
6. 準備として、PEG6000 の 50 重量%水溶液を作製する。30ml のバイアルに PEG6000 を 7g 程度測り、同じ重量の水を加える。簡単には溶けないので、高温の湯であたためて溶かす。この操作は、実験の前日に行っておく。
7. (a),(b),(g),(i) の濃厚脂質リポソームをリポソームの作製法にしたがって SUV 化する。
8. まず、共鳴エネルギー移動の解消の実験を行う。(g) の SUV 化した溶液 (20 倍の濃度のもの) 100 μ l と (i) の SUV 化した溶液 (50 倍の濃度) 200 μ l を加えて、PEG の濃度が、重量で 0%,5%,10%,20%,30%,40% となるような水溶液を各 2ml 調製する。これで、各溶液中で、ドナーとアクセプターを含んだリポソームが DOPC 脂質濃度で 100 μ M、DOPC のみのリポソームが脂質濃度で 500 μ M になったはずである。各々の試料を試験管ミキサーで激しく攪拌する。
9. PEG 濃度の異なる各試料について、(4) の実験と同じ励起波長で発光スペクトルを測定する。PEG によって膜融合が進行し、共鳴エネルギー移動が解消し、ドナー (NBD) のピークが現れることが観察される。
10. 次に、共鳴エネルギー移動の生成の実験を行う。(8) の操作と同様に、(a),(b) の SUV 化した溶液を各 100 μ l 加えて、PEG 濃度が、重量で 0%,5%,10%,20%,30%,40% となるような水溶液を各 2ml 調製する。各々の試料を試験管ミキサーで激しく攪拌する。

11. (9)と同様に発光スペクトルを測定し、膜融合が進行するのにもなって、共鳴エネルギー移動が生成するのを観測する。
12. (10)の操作は、ドナーとアクセプターのリポソームの濃度比が1:1の場合であったが、アクセプターを含むリポソームの濃度を2倍に増やした場合についても、余裕があれば、実験してみる。
13. さらに余裕があれば、PEG6000だけでなく、重合度の違うPEGについて、膜融合効率に違いが現れるか否かを実験してみる。

すべての実験が終了したら、作成した水溶液、エタノール溶液は棄てて、ガラス器具などは、洗浄しておくこと。

§5 計算機によるデータ解析

蛍光分光器で測定したデータは、一般物理学実験の計算機システム(STEX)上で、perlのプログラムと、gnuplotを使って解析する。この節では、パソコンのデータをSTEXに転送する方法を説明し、STEX上での解析方法の初歩を解説する。

(1) データのSTEXへのFTPによる転送

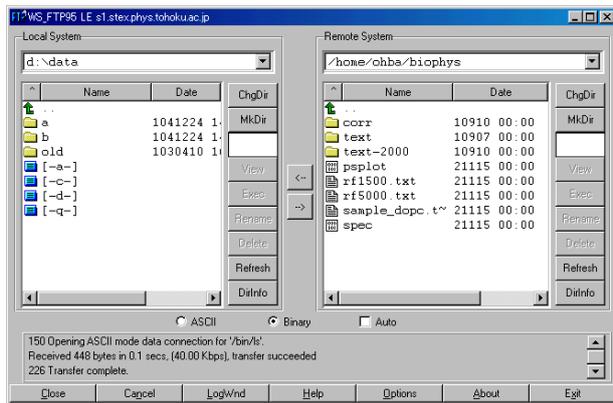
FTP (File Transfer Protocol) は、ネットワークを介して異なるOS間(同じOS間でも良いが)で、ファイルを転送するための標準的な方法である。ただし、FTPでは、サーバーとクライアントがUser IDとパスワードで認証する際に、ネットワーク上に、生のパスワードが流れるので、途中のネットワークでパケットの盗聴が行われていると、User IDとパスワードが見られてしまう可能性がある。そのため、(プロバイダーと大学内部との間のように)途中のネットワークが信頼できない場合は使ってはいけない¹⁸。

Windowsには、コマンドラインでFTPを行うftp.exeというソフトが標準で入っているが、ここでは、GUI(Graphical User Interface)でファイル転送を行う「WS_FTP」(RF-1500用のノートPCに入っている)と「FFFTP」(FP-6300用のノートPCに入っている)というソフトでの転送方法を説明する(図20を参照)。

1. デスクトップ上の「WS_FTP95」または「FFFTP」のアイコンをダブルクリックする。
2. 接続ホスト(WS_FTP95では、Profile Name)として、c01.stex.phys.tohoku.ac.jpとかs1.stex.phys.tohoku.ac.jpを選択する。STEXでは、home directoryはすべてのクライアント(c01~c30)とサーバー(s1とs01)で共通なので、どこに転送しても同じである。
3. 「User ID」欄にSTEXでの自分のUser IDを、「Password」欄にパスワードを入力し、OKボタンを押す。Passwordは空白のままでOKを押しても、接続した後、パスワードを聞いてくるので、そこで入力してもよい。
4. 接続に成功すると、左側にlocalなdirectoryの表示、右側にremoteなdirectoryの表示が現れる。データをhome directory直下に置くと、整理できなくなるので、remote

¹⁸最近では、暗号化された経路上で、ftpを行うsftpという方法が標準的になって来ている。

WS_FTP95の転送画面



FFFTPの転送画面

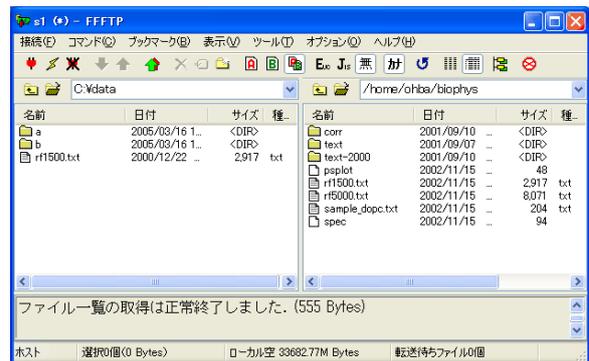


図 20: FTP による STEX へのデータ転送

で、生物物理実験用の directory を作成し、更に、実験課題ごとの sub directory を作成して、そこに転送する。remote で directory を作成するためには、WS_FTP では右側の「MkDir」ボタンをクリック、FFFTP では右側の窓を active にして(ファイルか directory をクリック) コマンドメニューの「フォルダー作成」を選択して、directory 名を入力する。

5. local なファイルをマウスで選択してから、右側にドラッグ&ドロップ (WS_FTP では、中央の右矢印ボタンをクリック) すると転送する。
6. 転送が終わったら、接続を Close して、ソフトウェアを終了する。

(2) gnuplot によるスペクトルデータの表示と解析

gnuplot はグラフソフトであり、本実験では分光器データを視覚化するために利用する。gnuplot の基本的な使い方は、「一般物理学実験用計算機システムの使い方」の第7章を参照すること。また UNIX のコマンドについては同書付録 A が参考になる。ここでは分光器から取り込んだデータをプロットする具体的な方法について述べる。

(i) ファイルの準備

まず STEX に login する。次に、分光器から取り込んだデータを加工するプログラムを用意してあるので、それを持ってくる。UNIX シェルのコマンドラインから次のように入力する。

```
/home/ohba/gnuplot/setup.sh
rehash
```

/home/ohba/gnuplot/setup.sh を実行すると、以下のファイルが、各自の、home directory¹⁹の、bin²⁰ と biophys directory にコピーされる。

¹⁹login した時に入る directory。シェルでは、\${HOME} とか ~/ で表わされる。

²⁰STEX の標準環境では、~/bin directory の下に自分で作った実行形式のプログラムを置けば、どの directory からでも、プログラム名だけで直接実行できる。

normal 最大値で規格化するプログラム
 area 面積で規格化するプログラム
 area と normal に `-s start_X -e end_X` のオプションを与えると、その範囲での最大値や面積で規格化する。(散乱のあるスペクトルで、散乱部分は除いて規格化したい場合に便利)

spec_calc Yの値に定数を加減乗除するプログラム
 spec_calc2 X座標が同じふたつのファイルの、Yの値の加減乗除を行い出力する
 nm2wavenumber X座標を、波長 (nm) から波数 (cm⁻¹) に変更するプログラム
 xshift X座標の値から、一定量だけ引いて、出力する
 g-factor G因子の励起波長依存性を計算するプログラム
 anisotropy 蛍光異方性の励起波長依存性を計算するプログラム
 raw データファイルから余分なヘッダーを取り除くプログラム
 rawall current directory にある .txt のファイルすべてについて、余分なヘッダーを取り除き、.dat の名前で保存する。
 aniso_vs_temp 実験 3, 4 の各温度での偏光の強度から、異方性や強度を出力する。
 psjoin 複数の印刷用 (ポストスクリプト) ファイルをひとつにまとめる。

(ここまでは、実行形式のプログラムなので、~/bin にコピー)

(以下は、サンプルデータなどなので、~/biophys にコピー)

spec グラフの体裁を整えるスクリプト
 psplot postscript で出力するスクリプト
 rf1500.txt RF1500 のサンプルデータ
 fp6300.txt FP6300 のサンプルデータ
 sample_dopc.txt aniso_vs_temp で使うデータ形式

なお、上記の解析プログラムには、ほとんどの場合、プログラムの最初に簡単な使い方が書いてある。使い方がわからない場合は、

```
less ~/bin/normal
```

のように、直接、プログラムの内容を見て、(必要があれば) 変更して用いること。また、新たに解析用のプログラムを追加する場合もある。その場合には、最新情報は、

```
/home/ohba/gnuplot/README
```

ファイルに書いてあるので、このファイルを見ること。

以下では、RF1500 および FP6300 から取り込んだデータのファイル名をそれぞれ rf1500.txt および fp6300.txt とし、current directory にあるとする。

(ii) gnuplot の起動

gnuplot を起動するには、シェルのコマンドラインから

```
gnuplot
```

と入力する (リターンキーも押すこと)。すると何やらメッセージが表示されるが、無視して構わない。最後の行に

```
gnuplot>
```

と表示されるので、これからここにコマンド(命令)を入力して gnuplot を使うことになる。

gnuplot で、実際にデータをプロットするためには、そのデータが置いてある directory にいた方が便利である。その directory に移ってから、gnuplot を起動すれば良いのだが、gnuplot を立ち上げた後でも、current directory を変更出来る。例えば、home directory で gnuplot を立ち上げたあとで、上で作成した biophys directory に移り、そこにあるファイルのリストを見るためには(括弧内は説明)、

```
gnuplot>pwd (current directory を表示させる)
/net/s1/home/ohba
gnuplot> cd "biophys" (biophys directory に移る)
gnuplot> pwd (current directory を確認する)
/net/s1/home/ohba/biophys
gnuplot> !ls -l (シェルの ls -l コマンドを起動)
total 13
-rw-r--r--  1 ohba  wheel   48 Sep  3 16:25 psplot
-rw-r--r--  1 ohba  wheel 2917 Sep  3 16:25 rf1500.txt
-rw-r--r--  1 ohba  wheel 8071 Sep  3 16:25 fp6300.txt
-rw-r--r--  1 ohba  wheel  94 Sep  3 16:25 spec
!
gnuplot>
```

とする。ちなみに、ひとつ上の directory に移るのは、cd "../" である。

(iii) とにかくプロットしてみる(データをそのままプロットする場合)

分光器から転送したデータには、実験条件などの(gnuplot にとってはよけいな)ヘッダが付いているため、そのままではプロットできない。そこで用意してある raw コマンドを使って適切に変換してからプロットする。それには、gnuplot のコマンドラインで、次のようにする。

```
gnuplot> plot "<raw rf1500.txt"
```

これで画面にグラフが表示される。"<raw rf1500.txt" の部分は、plot の入力として、raw rf1500.txt の出力を用いることを意味する。

ひとつのデータを plot する場合には、上記の方法が簡単であるが、多くのファイルに raw コマンドを通すのは面倒である。そこで、rawall というコマンド(シェルスクリプト)を準備した。これは単純なスクリプトであるので、ソースを見ればわかるが、current directory にある、".txt" という拡張子のついたファイルすべてについて raw を通した結果を ".dat" というファイルに書き出すようになっている。RF1500 でとったデータの拡張子が ".txt" 以外の場合には、エディターで rawall を変更する。また、raw を他のプログラムに変更することも可能。例えば、prog="normal" とすれば、最大値で規格化したファイルを生成する。

(iv) 規格化してからプロットする

上述の方法では、グラフの縦軸は分光器の測定条件によりまちまちで、データの比較の際に都合が悪い。そこで、規格化するプログラムを2種類用意した。

最大値による規格化

normal は最大値による規格化を行なうプログラムである²¹。gnuplot のコマンドラインで

```
gnuplot> plot "<normal rf1500.txt"
```

とすると、最大値で規格化されたグラフが表示される。散乱が発光スペクトルのピークよりも強い場合、全領域の最大値で規格化すると、散乱のピークで規格化されてしまい、比較したいスペクトルで規格化されない。その場合には、

```
gnuplot> plot "<normal -s start_X -e end_X rf1500.txt"
```

のように、-s と -e で、最大値を捜す範囲を与えると、その範囲の最大値で規格化したスペクトルを出力する。

面積による規格化

area は面積による規格化を行なうプログラムである。gnuplot のコマンドラインで

```
gnuplot> plot "<area rf1500.txt"
```

とすると、面積で規格化されたグラフが表示される。この場合も、-s と -e で、面積を計算する範囲を与えることができる。

複数のグラフを重ねて表示するときは、ファイル名を comma で区切って連ねる。例えば次のようにする。

```
gnuplot> plot "<normal rf1500.txt","<normal fp6300.txt"
```

(v) グラフの体裁を整える

グラフを線で描く

デフォルト (何も指定しないこと) では、データは点でプロットされる。グラフを線で描くには、gnuplot のコマンドラインで、あらかじめ次のように指定しておく。

```
gnuplot> set data style lines
```

この後 plot コマンドを使うと、折れ線グラフで表示される。(すでに plot コマンドを使用した後なら、単に replot と入力するだけでグラフが再表示される。)

なお、点で表示したいときは

²¹normal や area は、元のデータファイルの余分なヘッダーを取り除いてから処理を行うので、raw を通してから使う必要はない。

```
gnuplot> set data style points
```

点と線で表示したいときは

```
gnuplot> set data style linesp
```

とする (linesp は linespoints の略)。

グラフの表題と軸ラベルの変更

グラフの表題を「fluorescence」(蛍光)にする。

```
set title "fluorescence"
```

x 軸のラベルを「wavelength」(波長)にする。

```
set xlabel "wavelength"
```

y 軸のラベルを「intensity」(輝度)にする。

```
set ylabel "intensity"
```

凡例の変更

デフォルトでは、凡例はデータファイル名になっている。これを変更するには、plot コマンドに title オプションを付ける。

```
gnuplot> plot "<normal rf1500.txt" title "RF1500", "<normal  
fp6300.txt" title "FP6300"
```

(コマンドが長くなり行が折り返しても、1行に続けて入力し、最後だけリターンキーを押すこと。)

グラフの大きさの変更

例えば、縦横 70% に縮小して出力したい場合、

```
gnuplot> set size 0.7,0.7
```

と指定した後 plot する。この指定はプリンタへの (postscript ファイルへの) 出力にも有効である。

(vi) グラフをプリンタで印刷する

利用するプリンタは postscript プリンタであるため、gnuplot のグラフを postscript 形式でファイルに出力しておく必要がある。

1. まず生成される postscript ファイルのファイル名を決める。ここでは fp6300.ps とする。gnuplot のコマンドラインから次のように入力する。

```
gnuplot> set output "fp6300.ps"
```

次に、postscript 形式で出力するように設定する。

```
gnuplot> set terminal postscript
```

続けて、実際に出力するグラフをプロットする。

```
gnuplot> plot "fp6300.txt"
```

(すでに plot コマンドを使用した後なら、単に replot と入力するだけでよい。) これで fp6300.ps という名前の postscript ファイルが生成された。このとき、画面にグラフは表示されない。

2. 次に、postscript ファイル fp6300.ps を、lpr コマンドでプリンタに送る。それには、gnuplot のコマンドラインから次のようにする。

```
gnuplot> ! lpr fp6300.ps
```

(「!」は gnuplot のコマンドで、シェルコマンドを実行する機能を持つ。) これでグラフがプリンタから出力される²²。

3. 再び画面にグラフを表示する設定に戻すには、

```
gnuplot> set terminal x11
```

とする²³。

²²プリンタを選ぶ場合は、lpr -P プリンタ名 とする。プリンタ名は、各プリンタのパネルに書いてあるので確認する。

²³x11 とは X Window system のこと

(vii) G 因子と蛍光異方性のスペクトル演算

G 因子のスペクトルを計算する

シェル上で次のコマンドにより、hv と hh のスペクトルから G 因子のスペクトルを計算し、g.txt に保存する。

```
g-factor hv.txt hh.txt > g.txt
```

その後 gnuplot で g.txt をプロットする。

蛍光異方性のスペクトルを計算する

シェル上で次のコマンドにより、vv, vh, hv および hh のスペクトルから蛍光異方性のスペクトルを計算し、r.txt に保存する。

```
anisotropy vv.txt vh.txt hv.txt hh.txt > r.txt
```

その後 gnuplot で r.txt をプロットする。

§6 レポートの書き方

実験レポートは以下の形式で作成し、実験最終日に提出する。グループで協力して作成してもよいが、レポートはそれぞれ提出すること。鉛筆でもペンでもワープロや \TeX を使ってもよい。時間の関係で行えなかった実験については、できたところまでをまとめればよい。また、問題 1、2 を解いて、実験レポートに添付すること。この問題を先に解いた方が、実験についての理解が深まって、考察が書きやすいと思われる。

(1) レポートの形式

- 一枚目に表紙をつけ、実験テーマ、学年、学生実験の番号、氏名を大きく書き、本文は二枚目以降に書く。
- 本文は次の形式で各実験毎に分けて書く。

[実験 n]

目的

簡単で良い。

実験操作

実際にどのような操作を行い、何を測定したのかの概略を記述する。操作毎に番号をつけて書く。操作がそれ以前に記述したものと重なっている場合には、[実験 n] の何番目の操作と同様に、というように省略してもよい。

結果と考察

実際に測定されたデータと、それをある仮定に基づいて解析したデータとを区別して記述する。個々のスペクトルの図を添付するよりも、比較すべき一連の測定をひとつのグラフにプロットした方がわかりやすいので、出来るだけまとめてプロットする。必要であれば、最大値や面積で規格化

したスペクトルをまとめてプロットする。
実験毎にどのような点を考察すべきなのかを次に述べるので参考にする
こと。

[感想]

最後に、実験全体を通じての感想や要望を書く（今後の学生実験の内容
を向上させるための参考にするためのもので、採点には考慮しないので、
内容は何でもよい）

(2) 考察の視点

実験 1 純水を試料として測定した散乱スペクトルから、次のことを確認する。

- レーリー散乱とラマン散乱のピークの位置の差は、横軸を波長で表した場合は一定にはならないが、横軸を波数(cm^{-1})で表した場合は一定になること。(xshift や nm2wavenumber プログラムを用いる。)
- ラマン散乱のレイリー散乱からのシフト量(ラマンシフト)は、水の振動エネルギーを反映している。3原子分子である水の振動モードは、3つの自由度があり、その中で、強いラマン散乱を出すのは、全対称伸縮振動(気相中では、 3650cm^{-1})であることがわかっている。液体の水の場合は、水素結合などの分子間相互作用のために、気相中とはやや異なったラマンシフトを示し、 3440cm^{-1} という報告がある。実測値をこれらの値と比較してみる。

励起波長を変えたとき、発光スペクトルはどのように変化したのか、発光波長を変えたとき、励起スペクトルはどのように変化したのか、についてまとめ、これらの結果から、光によって励起された分子とその後の発光の過程について、どのようなことがわかるかを考察する。

その他の測定条件を変えたときに、スペクトルは見かけ上どのように変化するのか、その原因について考察する。

実験 2 蛍光異方性の測定の原理、蛍光異方性を変化させる要因について考察する。

ローダミン B の蛍光異方性の励起波長依存性にどのような特徴が見られるかを考え、その原因について考察する。

実験 3 蛍光異方性 r と蛍光強度を各温度について算出し、温度に対してプロットする。蛍光異方性の温度変化の原因を、蛍光異方性の定義から考えて、まず、定性的に（直観的な）説明を試みる。さらに、定量的に解析するために、参考文献 [2] のグリセリンの粘性データを用いて、変形ペランウェーバープロットを行う。データにばらつきがあっても大胆に直線をひいて、切片と傾きを算出する。ペリレンの室温での τ を 5nsec と仮定して (APPENDIX 参照)、ペリレンの回転体積を求める。また、切片から r_0 の値を求める。得られた回転体積や r_0 の値が妥当か否かを考えることで、ペランウェーバーのモデルと実際の溶液中での分子の回転運動との関連について考えて見る。

実験4 蛍光異方性と蛍光強度を各温度について算出し、温度に対してプロットする。ペリレンの室温での τ を5nsecと仮定して、各温度での蛍光寿命をその強度から算出する。DPPCの相転移温度および相転移前後での変化の温度依存性をDOPCと比較しながら考察する。ペリレンは疎水的な蛍光分子で、水にはほとんど溶けず、また水中での量子効率も低いので、観測された蛍光異方性は、ペリレンの膜中での分光特性を反映している。余裕があれば、水の中に形成されたミクロな膜の柔らかさとはどの程度なのかを直観的に理解するため、実験3の結果を用いて、各温度での蛍光異方性の値を粘性に変換して、脂質リポソームの疎水性部分の粘性を一般的な溶媒の粘性と比較する。

実験5 アクセプター（ローダミン）濃度の異なる発光スペクトルをまとめてプロットし、アクセプター濃度によってスペクトルがどのように変化しているかを観察し、その原因を考察する。

アクセプターの濃度に対して、ドナー（NBD）の蛍光とアクセプターの蛍光のピーク値をプロットし、エネルギー移動の効率を考察する。両者は重なっているため、精密な解析のためには、適当な方法で分ける必要があるかもしれない。その場合には、重なったふたつのスペクトルから、それぞれの成分の強度を見積もる方法を考える。また、NBDの励起波長でローダミンもわずかに励起されるため、エネルギー移動ではない直接の励起によるローダミンの発光も含まれていることに留意する。

実験6 共鳴エネルギー移動の生成と解消の実験それぞれについて、発光スペクトルをプロットする。また、PEGの濃度に対して、ドナーとアクセプターの蛍光のピーク値をプロットし、膜融合がどの程度進行したかを考察する。

§7 問題

以下の2問を解いて、実験レポートに添付すること。

(1) 問題 1

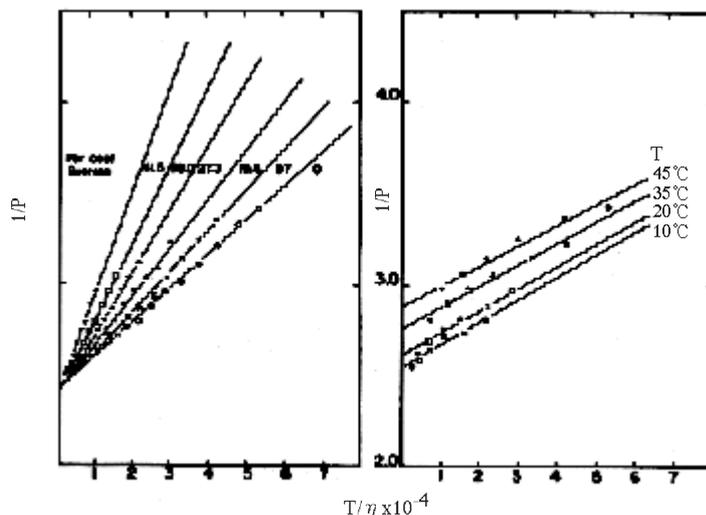


図 21: DNS という色素でラベルした免疫グロブリンの蛍光偏光度。温度と水溶液中の sucrose(砂糖) 濃度を変えて、溶液の粘性を変化させて測定したもの。左図は、同じ sucrose 濃度について、右図は、同じ温度について直線を引いた。

図 21 は DNS 色素でラベルした免疫グロブリンというタンパク質の蛍光偏光度 (P) を測定したデータである。溶液中にサッカロースを加えて粘性を変えて、さらに種々の温度で測定したデータを、左図は同じサッカロース濃度について直線を引き、右図は同じ温度について直線を引いたものである。蛍光偏光度 P とは、慣用的に用いられるパラメーターで、入射偏光に平行と垂直のふたつの偏光蛍光成分 I_v と I_h を用いて、

$$P = (I_v - I_h)/(I_v + I_h) \quad (43)$$

と定義される。テキストで記述している蛍光異方性 r とは、

$$r = 2P/(3 - P) \quad (44)$$

と関係づけられる。この蛍光偏光度 P を用いると、テキスト本文 11 式のペラン・ウェーバーのプロットは、

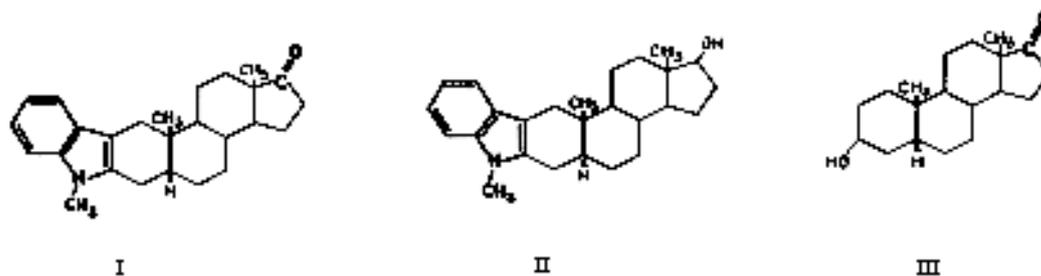
$$\left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3}\right) = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3}\right)\left(1 + \frac{k_B T \tau}{\eta V}\right) \quad (45)$$

と書くことができる。図 21 の右図から、

	切片 ($1/P$)	傾き ($g/(K \cdot cm \cdot sec)$)
10	2.51	1.20×10^{-5}
20	2.59	1.18×10^{-5}
35	2.73	1.12×10^{-5}
45	2.85	1.08×10^{-5}

となる。ここで、切片とは $T/\eta \rightarrow 0$ の $1/P$ の値、傾きとは T/η に対する $1/P$ の変化量である。この値と緩和時間 $\tau = 10\text{ nsec}$ を用いて、各温度における免疫グロブリンの回転体積 V を算出せよ。回転体積の温度依存性について、考えられる原因をあげよ。また、免疫グロブリンの分子量 150000 と比重 1.2 g/cm^3 を仮定して、免疫グロブリン 1 分子が占める空間的な体積を算出し、回転体積と比較せよ。(計算の際、数値だけを計算するようなことをせず、必ず単位も式の中に入れて計算すること。これにより、 V が体積の次元になっていることを確認せよ。)

(2) 問題 2



分子 II は、Indole 部分 (窒素を含む 5 員環の部分) が発光し、分子 III の Ketone 部分 ($\text{C}=\text{O}$) の部分はその発光に対応する吸収をもっているため、蛍光エネルギー移動の II はドナー、III はアクセプターとして振る舞う。図 22 は、メタノールとヘプタン中で、II の蛍光スペクトルおよび III の励起スペクトルを測定したもので、溶媒に依存して、スペクトルの重なり (J) が変化することがわかる。分子 I は、分子内にドナーとアクセプターをもち、分子内で蛍光エネルギー移動をする分子である。分子 I, II の蛍光寿命 (それぞれ τ_I , τ_{II}) と、II の蛍光スペクトルと III の励起スペクトルの重なり (J) を各種溶媒中で測定したのが次の表である。この表から、共鳴エネルギー移動速度 k_T が J に比例することを示せ。

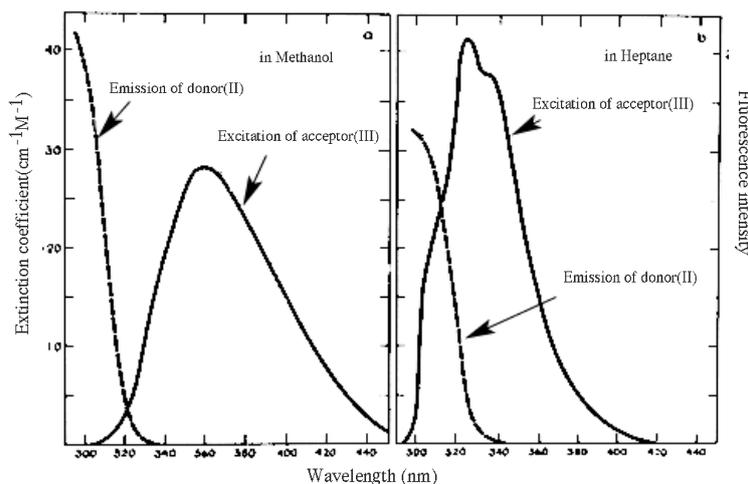


図 22: ドナー (II) の発光スペクトルとアクセプター (III) の励起スペクトルの重なり。溶媒によってスペクトルの重なりが変化する (左はメタノール、右はヘプタン)。

溶媒	$\tau_I(nsec)$	$\tau_{II}(nsec)$	$J(cm^6/mmole \times 10^{19})$
Methanol	5.3	5.6	1.5
Ethanol	5.6	6.5	3.0
Dioxane	3.6	5.4	13.0
Ethyl acetate	3.3	4.7	12.8
Ethyl ether	2.1	4.5	30.0
Heptane	1.1	2.8	60.3

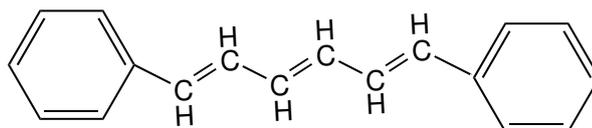
参考文献

- [1] 日本分光学会測定法シリーズ3、「蛍光測定」、木下一彦・御橋廣眞編、学会出版センター
これは、実験室に置くことにするので、測定中などに不明なことがあったら、参照すること。
- [2] 化学便覧、基礎編2
北青葉山分館にある。各種溶媒の粘性の温度依存性のデータが載っている。新旧の2種類の版があるので新しい版を参照すること。旧版には狭い温度範囲のデータしか載っていない。
- [3] 「生体膜の動的構造」第2版、大西俊一著、東京大学出版会
- [4] 「生体膜のバイオダイナミクス」、野澤義則・大木和夫著、羊土社
3と4は、生体膜研究の入門書としては、最適である。
- [5] 生化学実験講座14「生体膜」、日本生化学会編、東京化学同人
- [6] Principles of Fluorescence Spectroscopy, J.R.Lakowicz, Plenum Press
蛍光分光についての古典的名著

§8 APPENDIX:各種蛍光プローブと脂質の構造など

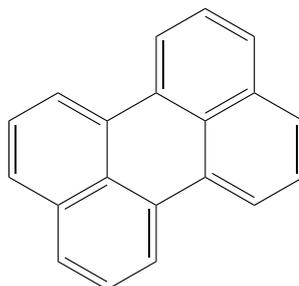
以下では、本実験で用いる蛍光色素や脂質の特性についてまとめておく。表記は、MW: 分子量 (molecular weight)、 λ_{ex} : 励起スペクトルのピーク (括弧内の溶媒で)、 λ_{em} : 発光スペクトルのピーク (括弧内の溶媒で)、 τ : 蛍光寿命、 Φ : 量子収率、溶媒: 良く溶ける溶媒、などである。

- DPH(1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene)、MW=232.33



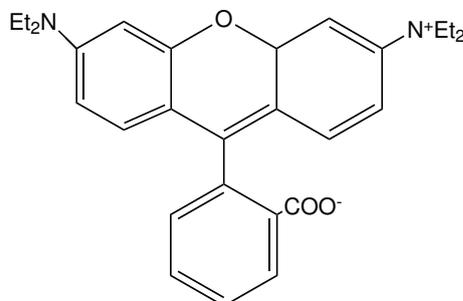
$\lambda_{ex} = 355nm$ (ヘキサン)、 $\lambda_{em} = 430nm$ (ヘキサン)、 $\tau = 10.5ns$ (流動パラフィン中)、 $\Phi = 0.8$ (ヘキサン)、溶媒 = THF

- ペリレン (perylene)、dibenz[de,kl]anthracene、MW=252.3



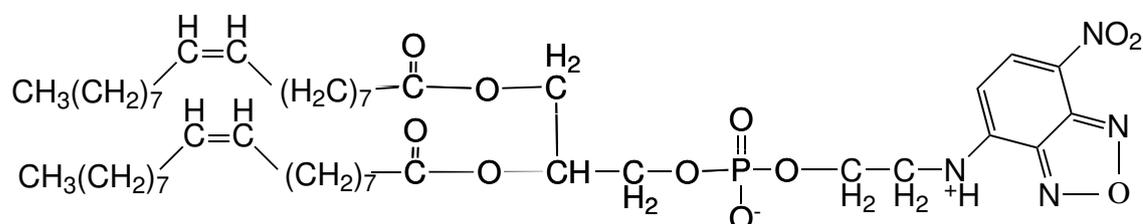
$\lambda_{ex} = 411nm$ 、 $\lambda_{em} = 470nm$ 、 $\tau = 4 \sim 6ns$ 、溶媒 = EtOH, MeOH, Acetone

- ローダミン B、Rhodamine B、MW=479.03



$\lambda_{ex} = 530nm$ (エタノール)、 $\lambda_{em} = 570nm$ (エタノール)、水に可溶

- DPPC、dipalmitoyl-phosphatidylcholine、MW=734.05
 図 1 の PC の脂肪酸（炭化水素鎖）の部分に、パルミチン酸（炭素数 16 の直鎖飽和脂肪酸）が 2 本結合した分子。DPPC の脂質二分子膜はその構造や物性について最も詳しく調べられている。主相転移温度は 41.5 。
- DOPC、dioleoyl-phosphatidylcholine、MW=786.12
 図 1 の PC の脂肪酸（炭化水素鎖）の部分に、オレイン酸（炭素数 18 で、9 と 10 番目の C-C 結合がシス型の二重結合となっている直鎖脂肪酸）が 2 本結合した分子。相転移温度は -20 付近で、室温では液晶相にある。
- NBD-DOPE、N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-dioleoyl-phosphatidyl-ethanolamine、MW=906.13
 図 1 の PE の脂肪酸部分にオレイン酸を 2 本、頭に NBD 色素を結合させた蛍光ラベル試薬。



$$\lambda_{ex} = 460nm、\lambda_{em} = 534nm$$

- Rh-DOPE、MW=1285.11
 上の NBD-DOPE の NBD 色素の代わりに、ローダミンをラベルした蛍光色素。
 $\lambda_{ex} = 530nm、\lambda_{em} = 586nm$