

蛍光分子の光褪色過程における三重項/暗状態の過渡応答解析

Analysis of triplet/dark state dynamics of fluorescent molecules

in the photobleaching process

東理大理工 ○坂田 のどか、前迫 啓志、神山 直人、戸田圭亮、須田 亮

Tokyo Univ. of Sci., ○Nodoka Sakata, Satoshi Maesako, Naoto Kamiyama, Keisuke Toda,
and Akira Suda

E-mail: 6213041@ed.tus.ac.jp

蛍光分子の光褪色は、蛍光イメージングの定量的な解析の妨げとなる。特に二光子励起蛍光観察においては光褪色の影響が大きく、励起状態吸収 (Excited State Absorption: ESA) が原因の一つとされている[1]。また、蛍光分子は項間交差により三重項状態などの暗状態へ遷移するが、この暗状態からの ESA が光褪色を引き起こすと考えられている[2]。本研究では、eGFP における暗状態の挙動を蛍光強度の過渡的な変化から測定するとともに、ESA から光褪色に至る分岐比を算出した。また、各状態の寿命をもとに意図的に ESA を引き起こすことで、光褪色の支配的な状態の特定を行った。

暗状態の観察は、励起光の照射時間を音響光学素子によってマイクロ秒からミリ秒の範囲で制御することで行った。試料は eGFP 水溶液に Mowiol を混合し、拡散の影響を抑制した。その結果、二つの暗状態が推定され、それぞれ 350 μ s と 15 ms の寿命を持つことが分かった (Fig. 1)。また光褪色の分岐比は試料拡散の影響が残ったため、蛍光強度の減衰と併せて回復の様子も測定した。結果として、光褪色の分岐比は 10^{-8} と計算された (Fig. 1)。

光褪色の支配的な状態を特定するには、波長 760 nm の半導体レーザーを ESA 誘起光として用いた。ESA 誘起光の照射タイミングは光チョッパーによって制御し (Fig. 2)、各タイミングにおける褪色速度より光褪色に関する励起状態の割合を求めた。結果として、Fig. 1 における S_1 と T_1 が併せて 5 %、D が 10 %、D より更に長い寿命が 26 %、ESA 以外の褪色が 59 %と求められた。この結果より、光褪色過程は想定した 4 準位系の暗状態 D より更に長い寿命の状態を含んでいることが示唆された。当日は褪色速度など詳細なデータを踏まえて報告する。

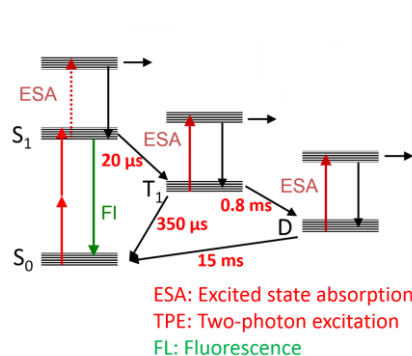


Fig. 1. 4-level energy diagram

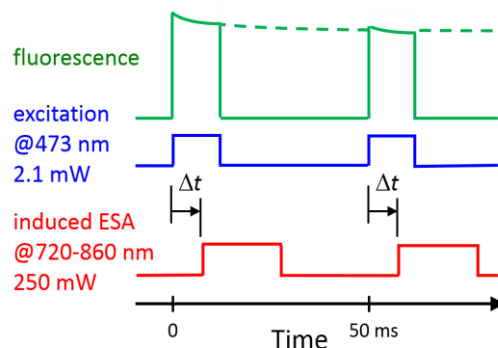


Fig. 2. Timing of laser irradiation

[1] G. H. Patterson and D. W. Piston, *Biophys. J.* **78**, 2159(2000).

[2] G. Donnert, C. Eggeling, and S. W. Hell, *Nat. Methods* **4**, 81(2007).