

蛍光タンパク質の光褪色過程における暗状態ダイナミクス

Dark-state Dynamics of Fluorescent Protein in Photobleaching Process

東理大理工, °(M2)坂田 のどか, (B)秋澤 一史, 詫間 恵, 神山 直人, 須田 亮

Tokyo Univ. of Sci., °Nodoka Sakata, Akisawa Kazufumi, Megumi Takuma, Naoto Kamiyama,
and Akira Suda

E-mail: 6217611@ed.tus.ac.jp

蛍光タンパク質は一定の時間発光した後、褪色により蛍光を発しなくなるが、その原因は明らかではない。また、計測技術の発展により 1 分子からの微弱な蛍光を検出できるようになると、蛍光分子の発光が明滅することが観測された [1]。蛍光分子が発光しない状態には、励起一重項状態から項間交差で遷移した励起三重項状態だけでなく未知の暗状態も含まれる。ここでは、それらの総称として暗状態と呼び、代表的な蛍光タンパク質である緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の暗状態ダイナミクスについて議論する。

まず、多分子からの蛍光を観察して EGFP の暗状態の寿命を推定した。励起光を連続的に照射すると蛍光強度は減衰し、その後、間欠照射に切り替えると強度の回復が観測された。これは、蛍光分子が基底状態と励起一重項状態の間の遷移を繰り返すうちに一部が暗状態へ遷移し、照射を止めると暗状態にある分子が基底状態に戻るためである。Fig. 1 に示すように EGFP のエネルギー準位を 5 準位系と仮定し、これをもとに速度論的に解析し、実験結果を再現できる時定数を見積もった。最も寿命の長い暗状態は秒のオーダーに及ぶという結果が得られた。

しかし、溶液中の蛍光タンパク質分子を集団として観測すると、個々の分子が暗状態にあるのか、褪色しているのか見分けがつかない。

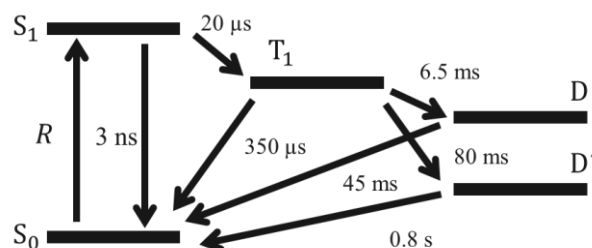


Fig. 1 Energy-level diagram of EGFP

そこで、全反射顕微鏡を用いて明滅する EGFP の経時変化を追ひ、暗状態に滞留する時間を 1 分子ごとに計測した。この結果を統計的に処理して溶液中の蛍光分子の強度変化と比較した。

また、光褪色の原因として励起状態吸収 (ESA) が挙げられている [2]。励起光に加えて、近赤外光を照射することで光褪色が促進されと考えられる。2 波長の光を照射しながら 1 分子観察することで、暗状態と光褪色の関係性も明確になる。当日は褪色速度など詳細なデータを踏まえて報告する

[1] Dickson, R. M., Cubbit, A. B., Tsien, R. Y. and Moerner, W. E. *Nature* **388**, 355 (1997).

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