



高精細な蛍光イメージングのための 色素分子の開発

東京大学
浅沼大祐

1. はじめに

蛍光イメージングは、生きている細胞の活動を高精細に観察することを可能とし、多様な生命現象のメカニズムの解明に貢献してきた。2008年のノーベル化学賞でその発見と応用が受賞対象となった緑色蛍光タンパク質 GFP は、可視化したい分子に蛍光標識として付与することで目的分子の挙動の可視化を実現し、生体分子の働き解明に多大な貢献をしてライフサイエンス研究に飛躍的な進歩をもたらした。しかしながら、蛍光イメージングの際に照射する励起光で蛍光分子が壊れてしまう光褪色の現象により観察に制約が伴っている。近年、顕微鏡技術の進展に伴い、安定した蛍光観察を可能とする技術の開発に対するニーズは益々高まっている。2014年のノーベル化学賞の受賞対象となった超解像顕微鏡法は、光の回折限界以下の高解像度で分子を可視化する画期的な技術であるが、原理的に非常に強い励起光の照射を必要とし、光褪色はより深刻な問題となる。本稿では、高精細な蛍光イメージングの実現に向け、有機小分子の色素分子に着目して光褪色の問題を解消する研究開発について取り上げる。

2. 蛍光色素の光褪色のメカニズム

蛍光色素の光褪色は、蛍光顕微鏡での観察の際に生じる現象である^{1,2)}。細胞膜上の受容体等の分子の動態を明らかにする光褪色後蛍光回復法 (FPR もしくは FRAP)³⁾として光褪色の現象を逆に利用する場合もあるが、色素が光分解してしまうとそれ以上の蛍光観察は行えなくなるため、光褪色は蛍光イメージングにおける大きな問題である。蛍光色素は光子を吸収すると基底状態 S_0 から第一励起一重項状態 S_1 に遷移した後、蛍光を発する放射の経路、または、その他の非放射の経路を介して基底状態 S_0 に戻る(図 1)。このとき、一重項状態 S_1 にある蛍光色素は項間交差により第一励起三重項状態 T_1 へと遷移し得る。蛍光色素の一重項状態 S_1 からの遷移のうち蛍光放出と比較して項間交差が起こる確率は小さく、例えば、蛍光色素として有名なフルオレセインは、一重項状態 S_1 から他の状態への遷移に関する速度定数は 2.4×10^8 (1/s)、蛍光放出、項間交差の速度定数はそれぞれ 2.1×10^8 (1/s)、 6.6×10^6 (1/s) であり⁴⁾、フルオレセインは励起されると蛍光放出が 88%の確率で起こるのに対し、項間交差は 2.8%と小さい。しかしながら、三重項状態 T_1 の寿命は 10^{-6} (s) 程度であり、 10^{-9} (s) 程度である一重項状態 S_1 の寿命と比較して桁長く、また、三重項状態 T_1 は一重項状態 S_0 と比較してエネルギーが大きく反応性が高いために蛍光観察の際に問題を生じる。蛍光イメージングでは色素を繰り返し励起して蛍光を得るため、長寿命かつ高反応性の三重項状態 T_1 への遷移が累積していき、蛍光色素の光褪色に関わる化学反応も累積していく。多様に開発されている蛍光色素について光褪色は個別に解明されていない部分が多いが、光褪色の主要な経路に蛍光色素の励起三重項状態が関与すると考えられる。三重項状態 T_1 にある蛍光色素は観察溶液中の酸素分子と物理的な消光現象を生じて反応性の高い一重項酸素 (1O_2) を生成し、また、酸化還元反応を介して種々の活性種を生成する。これらの活性種や他の求核性分子は蛍光色素と反応して光褪色を引き起こし得る。また、観察の条件によっては、