

三重項プローブ法

木下一彦・池上明

1. 定義

エオシンに代表される一群の色素、さらに蛋白質中のトリプトファンなどは、光を吸収した後、ある確率で励起三重項状態に移行する。これら三重項プローブ (triplet probe) からの光信号 (吸収変化, りん光など) を利用して、生体高分子やその集合体の構造や動態を探るのが三重項プローブ法である。親戚である蛍光プローブ法との際立った違いは、蛍光寿命 (励起一重項状態の寿命) がナノ秒 (10^{-9} s) 領域にあるのに対し、励起三重項状態の寿命がミリ秒以上に達することで、三重項プローブ法はマイクロ～ミリ秒領域の反応の解析に威力を発揮する。原理的には蛍光法なみに多種の使い方が考えられるが、いまのところ、“三重項偏光解消法”として、生体

膜などの分子集合体内での分子運動を時分割測定するのに用いられることが多い。本稿の解説も、偏光解消法に重点を置く。

2. 原理

まず、典型的な三重項プローブであるエオシンに光を当てたとき、何が起こるか説明しよう。基底状態 S_0 にあるエオシンは、図1の実線のような吸収スペクトルをもつ。長波長端のピーク、520 nm 近辺の光を照射すると、この光を吸収したエオシン分子は、瞬間的 ($\sim 10^{-15}$ s) に励起一重項状態 S_1 に遷移する (図2)。励起されたエオシンのうち数%は、次の数ナノ秒 (S_1 状態の寿命) 以内に励起三重項状態 T_1 に移行し、残りは同じ時間内に

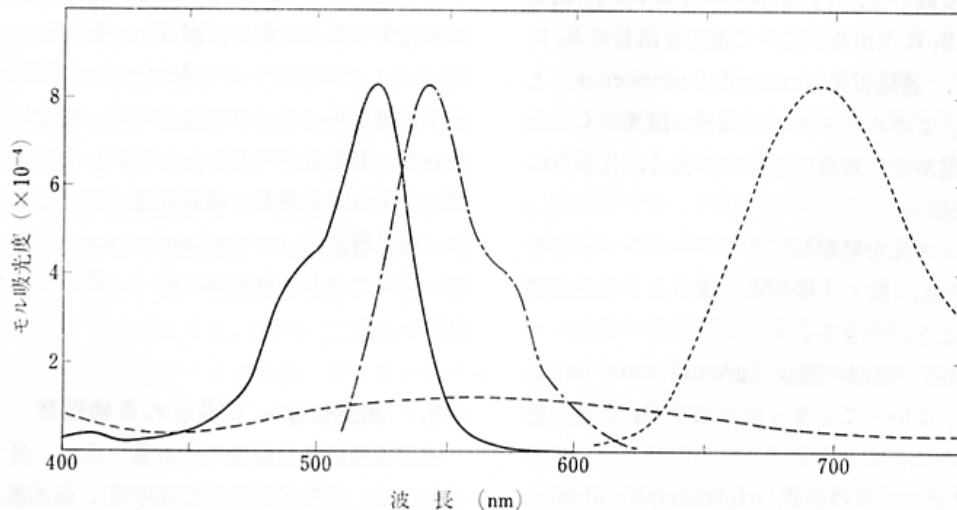


図1. エオシンのスペクトル

実線は基底状態の吸収、破線は励起三重項状態の吸収、鎖線は蛍光および遅延蛍光、点線はりん光。発光スペクトルの縦軸は任意尺度。

Kazuhiko Kinoshita, Jr., Akira Ikegami, 理化学研究所生物物理研究室 (〒351-01 埼玉県和光市広沢 2-1) [The Institute of Physical and Chemical Research, Hirosawa 2-1, Wako-shi, Saitama 351-01, Japan]

Triplet Probe Techniques

【Key word】 【三重項プローブ】 【りん光】 【遅延蛍光】 【偏光解消法】

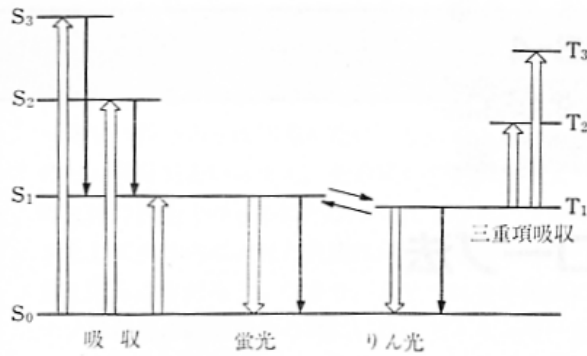


図2. 分子のエネルギーレベルの模式図

↑ ↓ は光子の吸収・放出を伴う遷移; ↑ ↓ はそれ以外の遷移。

S_0 へ戻る。 S_1 から S_0 へ戻る場合は、数割の確率で光子を1個放出するが、これがエオシンの蛍光で、図1鎖線のようなスペクトルをもつ。当然、蛍光が出てくるのは励起後数ナノ秒の間だけである。

さて、 T_1 状態へ移ったエオシンは、数ミリ秒程度(室温・無酸素状態での T_1 の寿命)の間そこにとどまる。 T_1 状態のエオシンに光を当てると、図1破線のような吸収スペクトルが得られるが、これは T_1 からより高位の励起状態への遷移によるものである。一方、 T_1 から基底状態への帰還は、1割前後の確率で光子の放出を伴い、これがりん光(phosphorescence)である。 T_1 のエネルギーが S_1 より低いことを反映し、りん光スペクトル(図1点線)は蛍光より長波長側にある。最後に、試料温度がある程度高いと、 T_1 状態のエオシンが、たまたに熱励起により S_1 に上がる。続いて蛍光を出して S_0 に戻る確率が高く、遅延蛍光(delayed fluorescence)として観測される。このスペクトルは最初の蛍光のものと変わらないが、見かけの寿命は圧倒的に長く、代わりに強度ははるかに低い。

結局、強いパルス光を照射して多くのエオシン分子を T_1 にもって行けば、数ミリ秒の間、次のような三重項信号を観測することができる。

- ① 520 nm 付近の吸収の減少(ground-state depletion signal): T_1 にってしまった分だけ S_0 状態の色素分子の数が減ることによる。
- ② 580 nm 付近の吸収の出現(triplet-triplet absorption signal)。
- ③ 700 nm 付近のりん光(phosphorescence)。
- ④ 540 nm 付近の遅延蛍光(delayed fluorescence)。
- ⑤ 540 nm 付近の蛍光の減少(fluorescence depletion): 試料に定常光を照射し続けた場合、試料からの発光は大部分が $S_0 \Rightarrow S_1 \Rightarrow S_0$ による蛍光(prompt fluo-

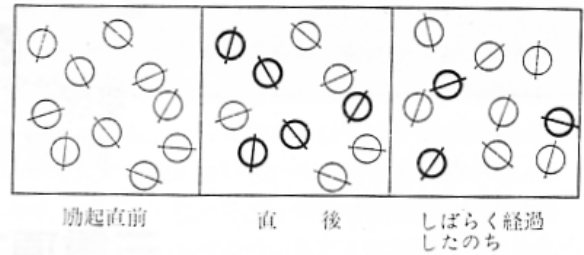


図3. 偏光解消の原理

○はプローブ分子で、棒は遷移モーメントの方向を表す(吸収・発光モーメントは互いに平行とした)。太線は励起三重項状態の分子を示す。

rescence)で、りん光や遅延蛍光は1%以下である。そこに強いパルス光を照射すると、 S_0 にいる分子が減るため、定常光励起に由来する蛍光強度が減少する。すなわち①の蛍光版である。

5種の信号のうち、①②⑤は検出用の定常光源がいる。そして、強力なパルス光により試料中のプローブ分子の数%以上を T_1 にもっていかないと、検出が難しい。③④は弱いパルス光源で間に合うが、励起パルス光にはほぼ同期して出る蛍光(瞬間強度は三重項発光の百万倍以上)から光電子増倍管を守らねばならず、時間分解能を上げるのが難しい。

さて、三重項偏光解消の測定をするときは、励起用のパルス光を鉛直方向に偏光させておけばよい。この光を吸収できるのは、たまたま励起の瞬間に(吸収の遷移モーメントが)鉛直ないしそれに近い方向に向いていたプローブだけなので、三重項信号は上の5種とも鉛直方向に偏光することになる(図3)。その後、プローブ分子(を結合した高分子)が回転ブラウン運動をするにつれ、分子の向きがバラバラになるので、偏光が解消する。すなわち、偏光度が時間とともに減少する過程を測定すれば、分子の回転運動の時間経過が測れることになる。なお、偏光解消法(optical anisotropy decay method)についてのやさしい解説は文献1、詳しくは2と3を見られたい。

3. 測定によって得られる物理量

三重項光信号を特徴づける量、吸収・発光スペクトル、信号強度、寿命(信号の減衰時間)、偏光度などは、蛍光と同様、プローブの環境を反映して変化する。以下の例のように、“環境”の何をどう反映するのかがはっきりしていれば、よい情報が得られる。

偏光解消信号は、実験条件さえ適切なら、回転運動のみを反映する。得られる量は、基本的に回転ブラウン運動の速さと回転範囲の2つである。速さ(回転拡散定

数)のほうは、プローブと一体になって回転する物体(生体高分子, その一部, または複合体)の大きさ(形状因子を含む)と媒質の粘度の積に反比例するので, 一方がわかっていれば他方がわかる。また, 膜や線維構造などにおける内部運動の場合は, 一般にプローブのとりうる向き(回転範囲)が制限されるため, 偏光度が0まで減衰せずに一定値にとどまる。制限の様子・程度からは, 内部構造の異方性や柔軟度が推定できる。

三重項信号の寿命も, 変化の原因が特定できればよい情報源となる。たとえば, 酸素や重原子などは衝突により寿命を減少させる。したがって寿命測定から, これらの物質の濃度や拡散定数, ないしプローブへの近づきやすさ, などがわかる。蛍光法にも同様の使い方があがるが, 三重項信号のほうはずっと敏感である。ただし, 応用例はまだあまりない。

4. 他の測定法との比較

まず, 三重項偏光解消法について述べよう。

代表的な回転運動測定法としては, 偏光解消法のほかに NMR, EPR がある。これら磁気共鳴スペクトルも, プローブの向きの制限度(オーダーパラメーター)と回転の速さの両方を反映するが, 両者の分離が難しい。一般にはどちらかだけがスペクトルを決めていると仮定して解析することになる。この点, 偏光解消法は, 回転運動の時間経過を見るので, 両パラメーターの分離が容易である。逆に, 運動状態の異なるプローブが共存するのを分離・検出するのは磁気共鳴法のおはこで, 偏光解消法には荷が重い(p. 150 参照)。

時間領域に注目すると, NMR の得意なのが大体ミリ秒(間接的にはピコ秒も), EPR がナノ秒, 飽和移動 EPR がマイクロ秒, 偏光解消法では蛍光法がナノ秒, 三重項法がマイクロ秒を守備範囲とする。水溶液中の回転ブラウン運動は, アミノ酸や色素など低分子がピコ秒域, 球状蛋白質がナノ秒域に入る。DNA 二重らせんのねじれ運動はナノ秒, 曲げがマイクロ秒, 少し太いアクチン線維になると, ねじれがマイクロ秒, 曲げがミリ秒~秒となる。膜中では, 脂質分子の揺動運動がナノ秒, 膜蛋白質の回転がマイクロ秒である。

三重項法のひとつの特徴は, 時間軸上で5桁以上にまたがる信号を同一装置・同一条件下で測定できることにある(吸収法で時間分解能約10ナノ秒が得られている)。蛍光法はふつう2~3桁だから, 複雑な運動(したがって構造)の解析には三重項法がまさる。もちろん両法の時間領域はずれているのだが, 媒質の粘度を上げた

りして運動時間を三重項領域にもってくる手がある。

同じ偏光解消法の仲間として, 三重項プローブの代わりにヘムなど天然の発色団の光化学反応を利用するものがある。原理は三重項吸収偏光解消法とまったく同じで, 反応生成物の吸収スペクトルがもとと変わることを利用する。11-2(p. 156)を参照されたい。

最後に, 三重項プローブ法一般について簡単に位置づけをしよう。X線・粒子線から NMR まで広い意味の分光法を比べたとき, 紫外・可視光領域のスペクトルから得られる情報は質・量ともかなり劣る(共鳴ラマンを別として)。そのかわり時間分解測定が容易で, ピコ秒以下から秒以上まであらゆる時間域をカバーできる。他の分光法が“成分軸”“構造軸”など時間軸に直交する方向で威力を発揮するのに対し, 時間軸こそが紫外・可視分光の生命ともいえよう。その中でマイクロ秒を担当するのが三重項法というわけである。高感度, 試料の状態を乱さない, など光測定一般の利点は三重項法でもいかされている(必要なプローブ濃度は吸収法で数 μM , 発光ならずと低くてよい)。温度ジャンプ・電場ジャンプなどの緩和法も光でマイクロ秒という範疇に入り得るが, これらがいったん平衡を乱すのに対し, 三重項プローブ法は平衡状態にある試料の測定が基本である。

5. 測定例

従来の応用例の大部分は, 三重項偏光解消法による膜蛋白質の回転運動の解析で, 膜蛋白質の集合状態(蛋白質-蛋白質相互作用)や内部運動に関する情報が得られている。11-2(p. 152)および文献4(吸収法中心の総説), 5(発光法中心の総説), 6(蛍光退色法で細胞1個を対象とする測定を行なった)などを見られたい。

膜以外では, DNA 二重らせんのねじれ・曲げ運動を解析した例⁷⁾, アクチン線維のねじれに対する固さが曲げに対するものより1桁小さいことを示した例⁸⁾, ミオシン線維の動的構造を解析した例⁹⁾などがある。偏光解消法でどのくらいのことがわかるか, 最後の例の結果をまとめてみると, ミオシン分子の頭部が長さ16nm くらいの扁長楕円体で近似できること, その頭部は付け根の回りに ± 35 度くらい揺れ動き, その時定数は0.2 μs であること, さらにその付け根から14nm くらいにわたってロッド部が ± 48 度も揺れ動き, その時定数は2 μs であること, などが示された。

蛋白質中のトリプトファンからの三重項信号については, 文献10, 11を見られたい。

文 献

- 1) 木下一彦: 日本物理学会誌, **37**, 479-484 (1982)
- 2) 御橋廣真: 蛍光測定——生物科学への応用 (木下・御橋編), p. 1, 学会出版センター, 東京 (1983)
- 3) Kinosita, K. Jr., *et al.*: *Adv. Biophys.*, **17**, 147-203 (1984)
- 4) Cherry, R. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 289-327 (1979)
- 5) Jovin, T. M., *et al.*: *Ann. New York Acad. Sci.*, **366**, 176-196 (1981)
- 6) Johnson, P., Garland, P. B.: *FEBS Lett.*, **132**, 252-256 (1981)
- 7) Hogan, M., *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3518-3522 (1982)
- 8) Yoshimura, H., *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **179**, 453-467 (1984)
- 9) Kinosita, K. Jr., *et al.*: *Biochemistry*, **23**, 5963-5975 (1984)
- 10) Kai, Y., Imakubo, K.: *Photochem. Photobiol.*, **29**, 261-265 (1979)
- 11) Kim, H., Galley, W. C.: *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **61**, 46-53 (1983)

