蛍光点滅の理解によって開かれる撮像ソリューション

フェリックス・ヴェトメイヤー、サンダー・フォルカン・カクソ、パーベル・フランツォフ、
マサル・クノ、ボルディサール・ヤンコ

量子ドット、ロッド、ワイヤなどの量子発光体における蛍光点滅の微視的原因を理解することが、この点滅を大幅に抑制して優れた撮像能力をもつ斬新な構造を設計するために極めて重要である。

この50年の間に、蛍光分光法の分野は著しく成長した。蛍光技術の利用はまず生化学と生物物理学の分野で開始したが、その後急速に拡大して、今や、生体イメージングから材料特性評価にわたる広い学問分野の万能ツールになった。

蛍光顕微鏡法は、構造と動的過程をサブマイクロメートルのスケールで評価することができる強力なツールだ。例えば、特定の生物親和性をもつフルオロフォアの局在化に利用すれば、生きた細胞の内部構造を可視化できる。長時間のイメージングセッションにおける量子ドット（QD）標識の主要な利点はその光安定性にある[(1)]。汎用色素Alexa Fluor 488（緑色）は180秒間の過程でかなりの光退色を起すが、QD630ストレプトアビジン（赤色）は連続照明下でもその全輝度を維持し続ける（**図1**）。さらに、QDの調節可能な光学的性質と構成材料の多様性によって、発振波長が可視から赤外に及ぶ複雑な標識化戦略とともに容易な多重化を可能にする。

これと並行して単一粒子トラッキング実験を行えば、細胞の輸送機構の解明につながる、細胞内の標識化種の時間依存拡散定数が求められる。QDの高い輝度と光安定性は長距離の単一粒子トラジェクトリを可能にするが、この実験も蛍光間欠性または「点滅」といった興味深い単一分子現象を明らかにする。点滅は、フルオロフォアの発光強度が「オン」と「オフ」の状態間をランダムに揺らいでいるかのように見えるときに起きている。この現象は普遍的であり、半導体ナノワイヤ、ナノロッド、QD、有機色素分子を含む多種多様なナノスケール発光体で観測されている。15年ほど前から研究されてきたにもかかわらず、今日でもなおこの現象は謎につつまれたままだ。

蛍光点滅はなぜ起きるのか？

点滅は、分子の連続励起によって起こるため、特に興味深い現象だ。量子力学は短い時間スケールでのいくつかの強度ゆらぎ（1913年にニールス・ボーアによって予測された現象、いわゆる量子ジャンプ）を説明することはできるが、実験観測によって、フルオロフォアは量子力学的な時間スケール（秒または分）をはるかに超える周期でもオフ状態のままのことが良くあることが明ら

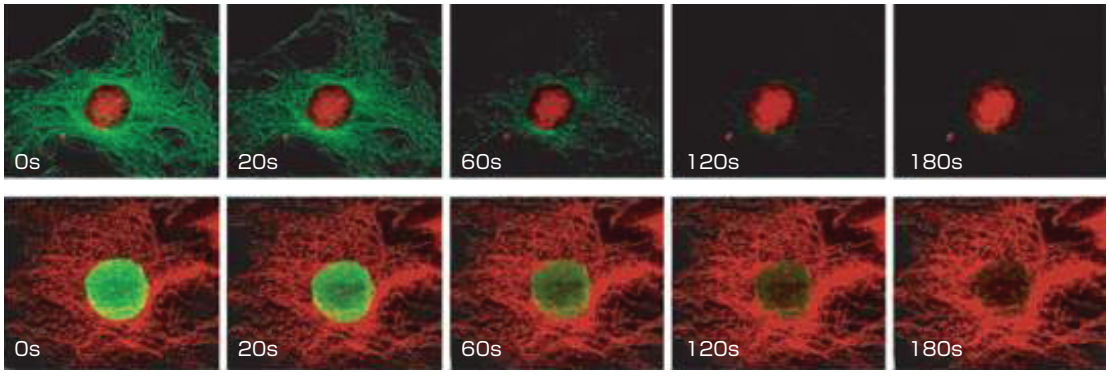


図1　実験結果は、有機色素分子（緑色）に比べて、QD標識（赤色）を使うことによって細胞イメージングにおける光退色が大幅に低減されたことを示している。示された画像は補色関係にあり、上部パネルでは細胞核がQD630-steptavidinで標識化され、周辺はAlexaFluor 488で標識化されており、下部パネルでは逆の標識が使われている。（画像提供：米クアンタムドット社のX.Y.ウー氏）

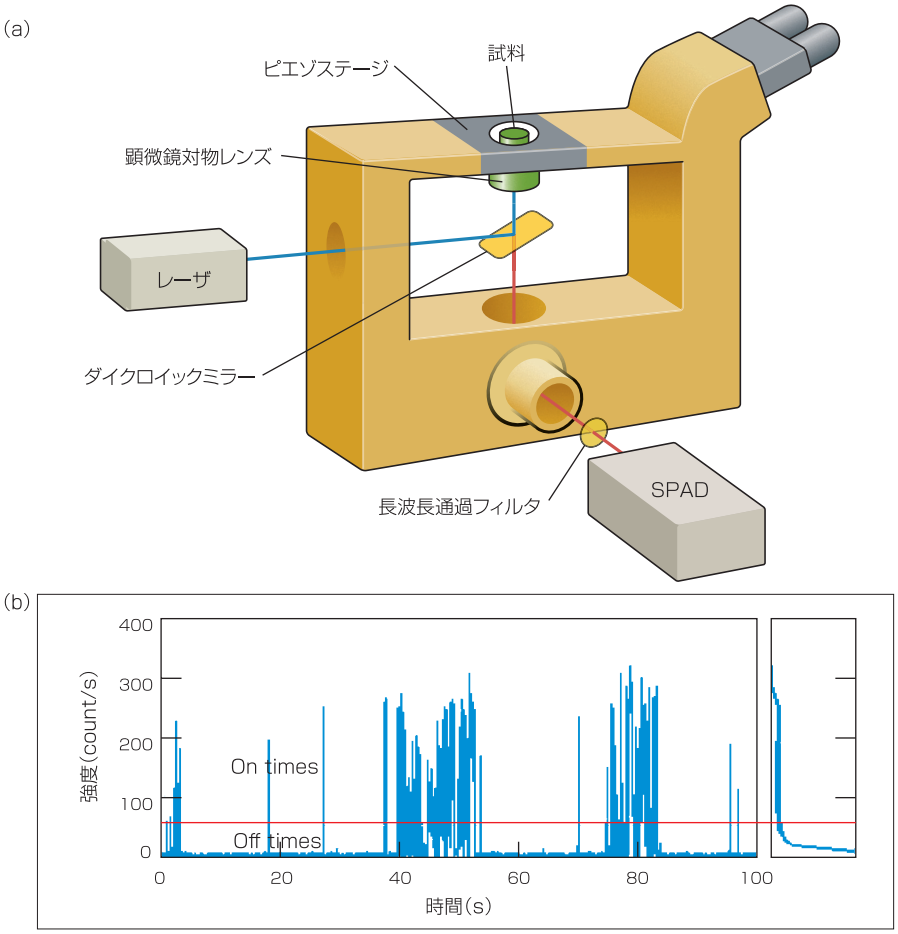


図2　(a)は単一粒子分光の一般的な実験スキームを示している。1例として、放射強度の特徴的ゆらぎを示す単一QD点滅トラジェクトリが示されている(b)。閾値解析に対するオンとオフ時間を定義する典型的な閾値(赤線)も示されている。(画像提供:ノートルダム大学)

かになった。米ノートルダム大学(University of Notre Dame)のわれわれの研究チームは、このイメージング障害を最小化するための実験技術の開発を目標として、実験と理論の双方から研究を続けてきたが、最近、コロイド状QDなどの単一フルオロフォアにおける点滅の起源が明らかになり始めた。

単一分子蛍光顕微鏡法は、個々の発光体における点滅の研究を可能にする強力なツールである。初期実験では実験的な信号対雑音(SN)比を向上させるために極低温が使われたが、現在は検出器技術の進歩によって低量子収量の系でさえ室温研究が可能になった。一般的な実験方式では、高開口数の顕微鏡対物レンズを通して、レーザ放射を通常直径150～500nmの回折限界スポットへと集束させる(図2)。この励起領域に置かれた分析物は励起照明を吸収し、異なる周波数の光を再放出する。この同一顕微鏡対物鏡が、この放出の一部を約1%の典型的なシステムワイド収集効率で収集する。これらの測定で最も汎用されている検出器は単一光子計数アバランシェフォトダイオード(SPAD)であり、これを使えば単一フルオロフォアの発光強度が時間の関数として求まる。

点滅:分かっていることは何か

第一に、蛍光間欠性の最も著しい特

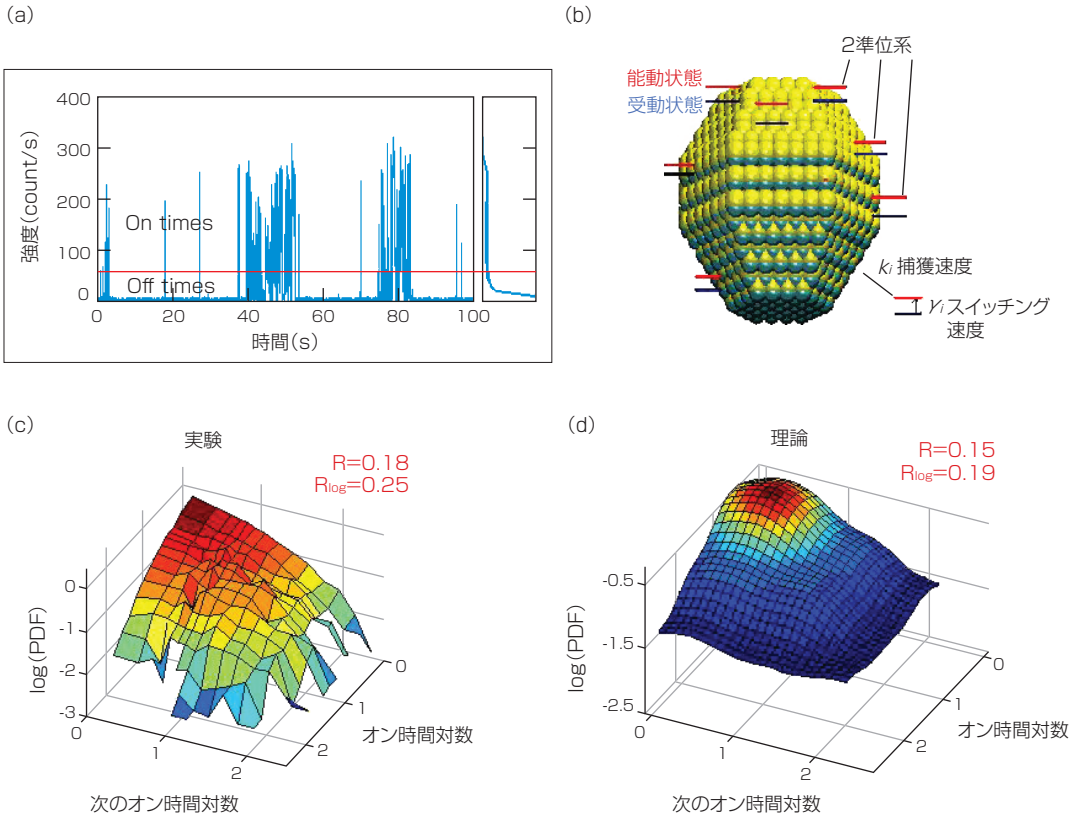


図3 図式は、オン状態とオフ状態の定義(a)、再結合中心として機能する2準位系をもつQDの表現(b)、オン時間(水平軸)と次のオン時間(面外軸)の実験確率密度分布関数(垂直軸、色コード化)(c)、MRCモデルで複雑化された確率密度関数の理論計算(d)を示している。連続するオン時間間の正の相関は、対角線「隆線」として認められる対角線に沿った増大した確率密度に起因する。これは、オン時間が長くなるにつれ次のオン時間もほぼ確実に長くなることを意味する。理論計算は半定量的に実験結果を再現している。(画像提供:ノートルダム大学)

徴は固有の時間スケールの欠如である。フルオロフォアをオンまたはオフに切り替えるための特性速度が存在しない。このことは、単一QD放射トラジェクトリにおけるオン対オフ状態を区別する閾値解析によって裏付けられた。半対数グラフ上にプロットされた結果としてのオンまたはオフ時間のヒストグラムから、関連するオン/オフの確率密度が広範囲の時間スケールにわたって分布していることが即座に見て取れた。実際、オンとオフ時間の広い分布は対数-対数プロットでうまく捕らえることができ、時間で50年間、確率密度で70年間にわたって線形特性を示している。これは、それらが一つのフルオロフォアの光物理を起源としていることを顕著に表している。したがって、QDのオン時間とオフ時間もべき乗則分布になる。べき乗則は日常生活で頻繁に出会う、例えば、言葉の使用頻度、停電時間、富の分布などの事柄を説明する。

点滅のべき乗則特性には共通の一致があるものの、その物理的起源はまだ論争中である。しかし、一つの明確な結論は、それが表面と環境に関係しているということだ。特に、最近の研究によれば、点滅は、経験的にではあるが、QDを別の厚い半導体層で被覆すると停止する[2]。ノイハウザー氏(Neuhauser)が率いる研究チームは、偏在するもう一つの単一分子レベルの現象としてのスペクトル分布と点滅との間に相関があることを明らかにした[3]。これは、QDスペクトル拡散の共通の説明がその表面を含むがゆえに重要である。

点滅を説明するために、多数のモデルが提案された[4]。最初の一つはQDの帯電/放電機構に関連する。すなわち、帯電(イオン化)したQDは無放射であり、中性状態に戻った後に放射すると考えた。その結果、点滅は単一分子レベルの電子移動事象の目視観測として作り直された。このモデルは、訴求力はあるが,いくつかの欠点に悩まされる。特に、オンとオフの状態間のスイッチング事象を容易に説明する一方、オン時間またはオフ時間の確率密度に対するべき乗則特性を予測しない。結果として、このモデルは、べき乗則分布が生じるように様々な方法で改良されることになった。これは、多重アクセプタ状態、それらのスペクトル拡散、さらにはトンネル障壁の高さまたは幅のゆらぎなどの導入に関係する。放出されたキャリアの拡散または単に無放射キャリア再結合速度の本質的なゆらぎを誘起する代替べき乗則予測モデルも提案された。

上記のモデルはいずれも連続する空間拡散概念でべき乗則点滅を説明する。しかし、ごく最近の研究によって、連続するスイッチング事象が相関しな

いことが明らかになった（**図3**）[5]。すなわち、隣接するオン時間の間に相関があり、隣接するオフ時間の間にも同様の相関があるということだ。これは、短いオン（オフ）時間後には短いオン（オフ）時間が続くことを意味している。初期モデルにおけるこれらの相関の欠如は、今や、べき乗則分布した確率密度を維持する一方で、研究者たちをこうした相関関係を予測する新しい理論の開発へと駆り立てている。

そのような一つのモデルは複数再結合中心（MRC）モデルであり、これは各QDが数個（約10個）の無放射再結合中心を持つと仮定する[6]。物理的にいえば、これらは深いトラップであるか、あるいはQD表面に局在する電荷分布である。その後、電子正孔対が外部光源によって励起されると、電子正孔対は、これらの再結合中心を通って光子を放出することなく再結合することが可能である。この無放射再結合プロセスの速度（いわゆる「捕獲速度」）は、各中心に関連して、それぞれ能動状態と受動状態に対応する高い値と低い値の間をランダムに変化しうる。したがって、再結合中心は効率の良い確率的2準位系であり、その全無放射速度は個々の捕獲速度の単純な和である。この全無放射速度のゆらぎが次々に蛍光放射強度のゆらぎに導き、結果として放射の点滅をもたらす。これらの個々の無放射速度は、数桁にわたる時間スケールに分布して相互に作用し、結果として、連続するオンまたはオフ事象間の相関が出現する。

予測モデル

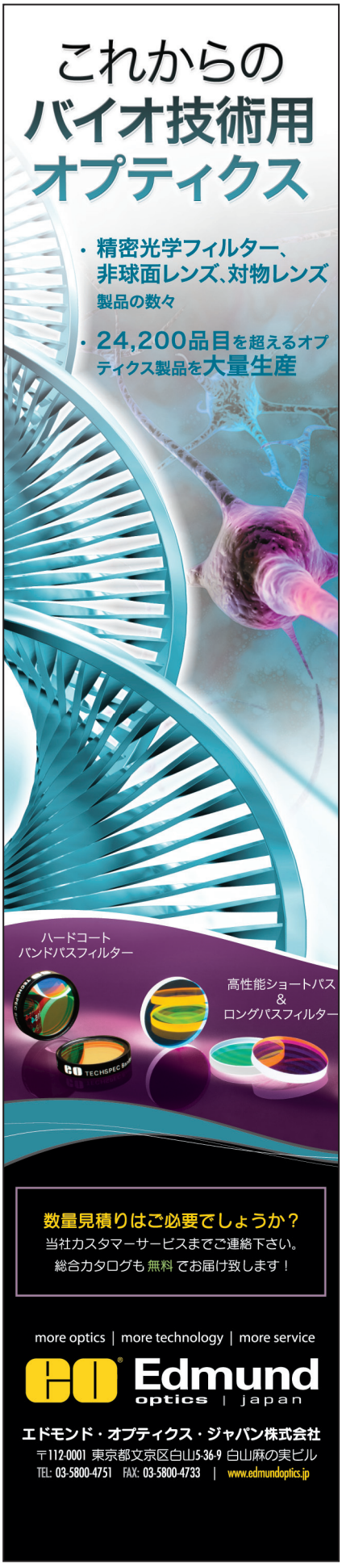
MRCモデルによれば、点滅過程の主な特徴は、①オン時間とオフ時間の（切頭頂）逆べき乗則分布、②オンとオフ時間統計の強い閾値依存性、③点滅トラジェクトリの1/fパワースペクトル、④連続するスイッチング事象間の相関、などである。今のところ、MRCモデルがこのような時間相関を予測する唯一のモデルであり、それゆえ、点滅の解明と最終的制御に向けた重要な足掛かりを指し示している。

この目標に向かって、MRCモデルが喚起するトラップ状態の物理的性質をより良く識別することによって、われわれは、最終的に、QDの関連する光物理過程に対するそれらの関与を排除する合理的な合成アプローチを開発することが可能になるだろう。実際には、これは、ナノ結晶表面を不動態化するためのより適切な表面配位子の特定か、少なくともイメージング用途の妨害になる長い時間スケールの間欠性事象の排除を必要とする。最終的に、MRCモデルは蛍光蛋白質や色素分子などの他の系における蛍光間欠性を理解するための、より広い理論的枠組を示唆している。

参考文献

(1) X. Wu et al., Nat. Biotech., 21, 41(2003).
(2) X. Wang et al., Nature, 459, 686(2009).
(3) R.G. Neuhauser et al., Phys. Rev. Lett., 85, 3301(2000).
(4) P.A. Frantsuzov et al., Nat. Phys., 4, 519(2008).
(5) F.D. Stefani et al., New J. Phys., 7, 197(2005).
(6) P.A. Frantsuzov et al., Phys. Rev. Lett., 103, 207402(2009).

著者紹介

フェリックス・ヴェトメイヤー（Felix Vietmeyer）とサンダー・フォルカン・カクソ（Sandor Volkan-Kacso）はノートルダム大学 理論科学研究所の研究助手、パーベル・フランツォフ（Pavel Frantsuzov）は客員研究准教授、マサル・クノ（Masaru Kuno）は准教授、ボルディサール・ヤンコ（Boldizsar Janko）は教授兼リーダである。e-mail：bjanko@nd.edu

LFWJ