

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 10 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K17845

研究課題名(和文) 生体深部の三次元多色イメージングを実現する三光子励起発光型希土類金属錯体の開発

研究課題名(英文) Rare earth metal complex for multi-color multi-photon imaging

研究代表者

鈴木 康孝 (Suzuki, Yasutaka)

山口大学・大学院創成科学研究科・准教授

研究者番号：30634753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、金属錯体をベースとしたプローブを用いて生体深部での三次元多色イメージングを実現することを目指した。希土類金属錯体をデザインする上で、最適な配位子を明らかにし、実際に生体透過性の高い、1030nmで発振するフェムト秒ファイバーレーザーでの多光子イメージングに成功した。また、研究期間内において、金属錯体プローブのさらなる機能化にも取り組み、金属錯体プローブを用いた生体中の酸素マッピングを実現した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to achieve 3 dimensional multi-photon multi-color imaging of biological material by using coordination complex. During the project, I clarified the appropriate ligand for designing metal complex probe for deep tissue imaging. By using metal complex equipped with appropriate ligand, 1030 nm excited multi-photon imaging was experimentally achieved. In addition, I tried to further functionalization of metal complex. As a result, oxygen concentration monitoring by using multi-photon excitation microscope was achieved in living cell.

研究分野：機能物質化学

キーワード：多光子吸収 蛍光色素 発光生プローブ 生体関連物質 非線形光学

1. 研究開始当初の背景

多光子励起過程における光吸収レートは、入射光強度の累乗に比例する。したがって、励起光を適切な条件の下にレンズでしばって入射すると、光強度の高い焦点付近でのみ多光子吸収が生じ、光励起に空間選択性を付与することができる。この空間選択性により、多光子励起顕微鏡を用いれば“原理的”には組織や臓器の深部の営みを三次元的に観察することが可能である。

多色イメージングは、生体内の異なるターゲットを、発光色が重なり合わないプローブで染め分け、ターゲット間の協奏的な動きを見る技術である。この多色イメージングを多光子励起顕微鏡により行えば、生体内でのターゲット間の協奏的な動きが三次元的に可視化できるはずである。しかしながら、生体深部(～mm)の多色イメージングは未だできていない。

生体深部からの発光を外部から観察するためには、励起光、発光とも水の吸収帯(1300 nm 以上)より短く、ヘモグロビンの吸収(600 nm 以下)よりも長い波長範囲にする必要がある。多光子励起に用いる短パルスレーザーの波長で、この波長範囲内で最も長いものは1030 nm である。多光子励起発光は励起波長よりも短い波長で生じるので、600～1000 nm の範囲で発光を示し、その発光帯が互いに重なり合わない多光子励起発光プローブが複数得られれば、深部の多色イメージングが行える。しかしながら、従来から発光プローブに広く用いられてきた一般的な有機化合物では、発光帯のバンド幅は～300 nm にも及ぶ。したがって、600～1000 nm の範囲で発光を示し、その発光帯が重なり合わないプローブを、有機化合物により複数得ることは現実的ではない。

2. 研究の目的

本研究では、深奥部の三次元多色イメージングを実現するために、発光帯が狭い(バンド幅～30 nm)希土類金属錯体を多光子励起用発光プローブとして活用することを着想し、そのような化合物の開発を行った。1030 nm で効率よく多光子励起できる金属錯体の配位子の調査を行った。また、さらに1030 nm で励起できる金属錯体の機能化もあわせて目指した。

3. 研究の方法

Eu 錯体をモデルに、1050 nm で三光子励起効率の大きい希土類金属錯体を得るための配位子の設計指針、発光量子収率が高くなる配位子の構造を明らかにする。

摂動論に基づいて考えると多光子励起効率は、遷移双極子モーメントと分子の対称性によって決まると考えられる。一般(一光

子の)の光吸収と同様、多光子吸収も吸光度の波長による違いが大きい。目的の達成のためには、1050 nm での三光子励起が可能な配位子を設計することに加え、錯体を形成した際の対称性を最適化する分子設計の二つを行う必要がある。

三光子励起極大波長は実際には一光子吸収極大波長の三倍よりも短い波長に現れることが多い。そのため、1050 nm の1/3の波長である350 nm に吸収帯がある配位子が適した配位子とは限らない。そこで、希土類金属錯体と錯形成が可能な配位子の中から350～450 nm に吸収極大がある配位子を選び、配位子だけの三光子吸収スペクトルを測定する。光源には、研究室所有のフェムト秒再生増幅器を用い、絶対法により正確に測定する。

4. 研究成果

(1) 希土類金属錯体からなる多光子励起プローブ

多数の配位子を検討した結果、図1に構造式を示す(a)及び(b)の発光量子に優れており、プローブとして用いることに適切であることがわかった。そこで、これらの化合物の一光子及び三光子の分光学的性質を精査した。

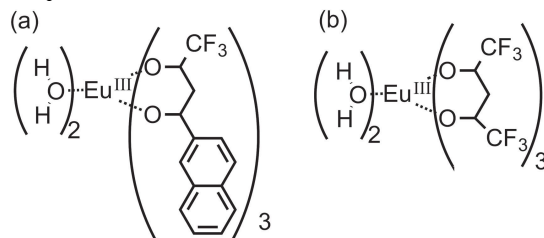


図1、Eu(ntfa)及びEu(hfa)の構造式

図2には、Eu(ntfa)及びEu(hfa)の一光子の吸収スペクトル及び発光スペクトルを示している。吸収スペクトルにおいては、いずれの化合物においても希土類金属錯体に典型的な配位子由来の吸収帯のみが確認された。このことから、希土類金属錯体においては、吸収の性質を決めるのは、配位子の種類のみであり、金属の種類によらないことが確認出来た。また、発光スペクトルにおいては、どちらの化合物もほとんど同じ発光帯を示していた。この発光帯は中心金属のユーロピウムに由来するものであった。すなわち、希土類金属錯体においては、発光特性は、中心金属の種類だけに依存して変化する性質を有していることを確認した。

これらの希土類金属錯体由来する性質は、多色化において非常に重要な性質である。これまで、多光子吸収材料として普通に報告されてきている物質は、有機分子や金属-配位子間の電子移動がある遷移金属錯体である。これらの物質は、多光子吸収の性質と発光の性質をそれぞれ独立して、制御すること

が不可能である。一方で、希土類金属錯体は、吸収の性質と発光の性質を配位子と、中心金属の選択によって独立してコントロールすることが可能である。そのため、単一の励起光源で複数の化合物を別々の色で発光させることが必要な、多光子多色イメージングにおいては、吸収の性質は同じで、発光の性質のみを変化させた物質群を準備する必要がある。希土類金属錯体を用いれば、同じ配位子を有し、異なる中心金属を選択するだけで、そのような物質群を生み出すことが可能である。

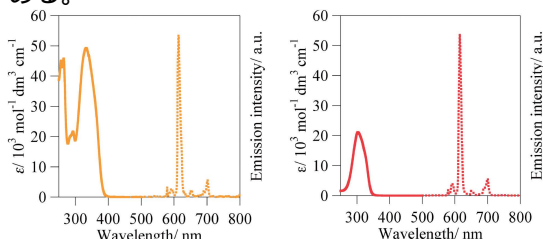


図2、Eu(ntfa)及びEu(hfa)の吸収(実線)及び発光スペクトル(破線)

次に1030 nmでの励起効率の調査を行なった。より励起効率の高い配位子を用いることがより低パワーでのイメージングを可能にする。強いパワーのレーザーの照射は、生体への侵襲を招くため、より低いパワーで励起できる配位子を明らかにすることは重要である。図3には、Eu(ntfa)及びEu(hfa)の三光子吸収スペクトルを示している。この調査から、1030 nmにおいては、Eu(ntfa)がより多光子励起効率が高い、すなわちより低パワーでイメージング出来ることが明らかになった。実際、Eu(ntfa)を用いて付着細胞を染色することで、1030 nmで発振するファイバーレーザーで多光子励起顕微鏡像を取得することが可能であった。このことから、1030 nm励起に適した配位子は、ntfaであることが明らかになった。この配位子と異なる中心金属を組み合わせれば、生体深奥部での多光子励起多色イメージングが実現するはずである。

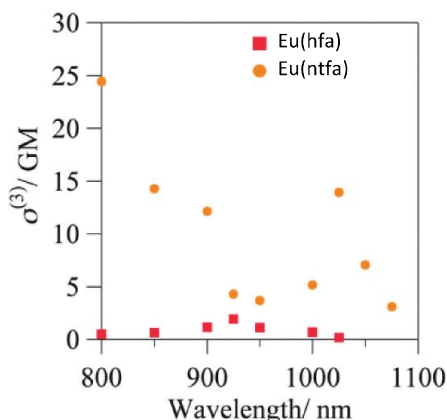


図3 Eu(ntfa)及びEu(hfa)の三光子吸収スペクトル

(2) 金属錯体からなる多光子酸素センシングプローブ

希土類金属錯体からなる多光子励起プローブの開発の道筋を示すことができたため、研究期間の後半ではプローブの更なる機能化の可能性の探索を行った。その機能として細胞中の酸素濃度に着目した。酸素濃度のセンシング可能なプローブとして、イリジウム錯体に着目した。用いたイリジウム錯体の構造式を図4に示す。

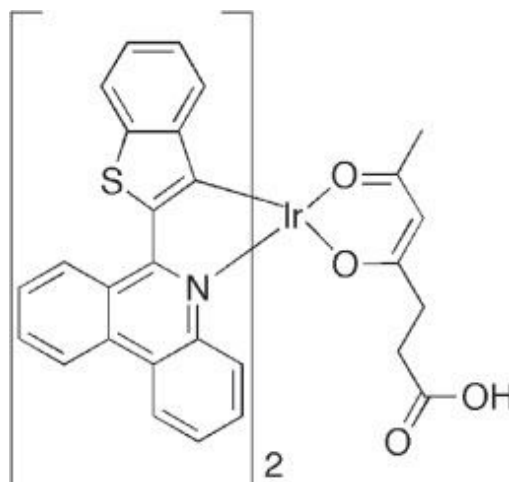


図4 用いたイリジウム錯体の構造式

一光子及び二光子吸収特性を評価したところ、この化合物も1030 nmで発振するフェムト秒ファイバーレーザーで励起可能であることが明らかになった。窒素雰囲気下及び常酸素状態下における多光子顕微鏡像を図5に示す。窒素雰囲気下、すなわち酸素濃度が低い状態の多光子顕微鏡像においては、細胞の形が見られるが、常酸素状態下では細胞を見る事が出来なかった。すなわち、このイリジウム錯体を用いれば細胞中の酸素濃度を多光子励起顕微鏡で観察出来ることを意味している。

常酸素雰囲気下

窒素雰囲気下
(低酸素条件)

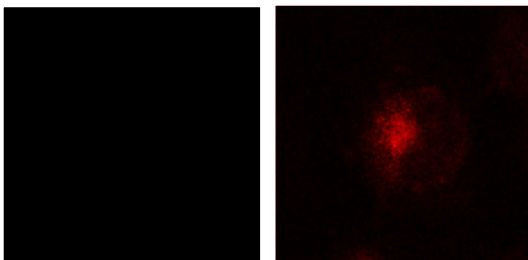


図5 常酸素及び窒素雰囲気下のイリジウム錯体により染色した細胞の多光子イメージング像

以上のように、本課題では、多光子多色イメージング用のプローブ材料の開発、及び金属錯体からなる多光子プローブの機能化に取り組んだ。また、これらの研究に止まらず、関連する技術に関する研究の推進にも取り組み、いくつかの業績を得ることに成功した。

た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 16 件)

1. M. Tominaga, Y. Higashi, T. Kumamoto, T. Nagashita, T. Nakato, Y. Suzuki, J. Kawamata, "Optical trapping and orientation manipulation of 2D inorganic materials using a linearly polarised laser beam", *Clays and Clay Minerals*, 査読有, in press. DOI: <https://doi.org/10.1346/CCMN.2017.064075>
2. T. Nagashita, Y. Higashi, A. Ikeda, M. Tominaga, T. Kumamoto, Y. Suzuki, T. Nakato, J. Kawamata, "An assembled structure of a nanosheet liquid crystal induced by laser beam using an objective lens with a low numerical aperture", *Clay Sci.*, 査読有, 2018, 22, 13-17.
3. M. Tominaga, T. Nagashita, T. Kumamoto, Y. Higashi, T. Iwai, T. Nakato, Y. Suzuki, J. Kawamata, "Radiation pressure induced hierarchical structure of liquid crystalline inorganic nanosheets" *ACS Photonics*, 査読有, 2018, 5, 1288-1293.
4. T. Takeda, S. Noro, T. Nakamura, Y. Suzuki, J. Kawamata, T. Akutagawa, "Selective MeCN/EtCN sorption and preferential inclusion of substituted benzenes in a cage structure with arylsulfonamide-armed anthraquinones", *Cryst. Eng. Comm.*, 査読有, 2018, 20, 17-24.
5. T. Takeda, Y. Suzuki, J. Kawamata, S. Noro, T. Nakamura, T. Akutagawa, "The emergent intramolecular hydrogen bonding effect on the electronic structures of organic electron acceptors", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 査読有, 2017, 19, 23905-23909.
6. P. Debnath, S. Chakraborty, S. Deb, J. Nath, B. Dey, D. Bhattacharjee, H. Soda, M. Tominaga, Y. Suzuki, J. Kawamata, S. A. Hussain, "Effect of nano clay Laponite on stability of SHG active J-aggregate of a thiocyanine dye onto LB films", *Appl. Clay Sci.*, 査読有, 2017, 147, 105-116.
7. T. Koide, M. Takesue, T. Murafuji, K. Satomi, Y. Suzuki, J. Kawamata, K. Terai, M. Suzuki, H. Yamada, Y. Shiota, K. Yoshizawa, F. tani, "An Azulene-Fused Tetracene Diimide with a Small HOMO-LUMO Gap", *ChemPlusChem*, 査読有, 2017, 82, 1010-1014.
8. M. Matejdes, D. Himeno, Y. Suzuki, J. Kawamata, "The effect of the negative charge density on switchable properties of pseudoisocyanine dye", *Appl. Clay Sci.*, 査読有, 2017, 144, 54-59.
9. M. Matejdes, D. Himeno, Y. Suzuki, J. Kawamata, "Controlled formation of pseudoisocyanine J-aggregates in the interlayer space of synthetic saponite", *Appl. Clay Sci.*, 査読有, 2017, 140, 119-123.
10. M. Tominaga, Y. Nishioka, S. Tani, Y. Suzuki, J. Kawamata, "Tunable High-Pressure Field Operating on a Cationic Biphenyl Derivative Intercalated in Clay Minerals" *Scientific Reports*, 査読有, 2017, 7, Article number: 7651.
11. M. Tominaga, Y. Oniki, S. Mochida, K. Kasatani, S. Tani, Y. Suzuki, J. Kawamata, "Clay-Organic Hybrid Films Exhibiting Reversible Fluorescent Color Switching Induced by Swelling and Drying of a Clay Mineral", *J. Phys. Chem. C*, 査読有, 2016, 120, 23813-23822.
12. H. Moritomo, A. Fujii, Y. Suzuki, T. Yoshihara, S. Tobita, J. Kawamata, "Biological oxygen sensing via two-photon absorption by an Ir(III) complex using a femtosecond fiber laser", *Jpn. J. Appl. Phys.*, 査読有, 2016, 55-9.
13. J. Harada, T. Shimojo, H. Oyamaguchi, H. Hasegawa, Y. Takahashi, K. Satomi, Y. Suzuki, J. Kawamata, T. Inabe, "Directionally tunable and mechanically deformable ferroelectric crystals from rotating polar globular ionic molecules", *Nature Chem.*, 査読有, 2016, 8, 946-952.
14. Y. Suzuki, H. Moritomo, A. Fuji, K. Satomi, J. Kawamata, M. Yamamoto, Y. Hasegawa, "Three-photon-induced Luminescence of Europium Acetylacetonate-type Complexes", *Chem. Lett.*, 査読有, 2016, 45, 538-540.
15. Y. Suzuki, D. Himeno, M. Tominaga, S. Tani, K. Nozaki, J. Kawamata, "Narrowing of X-Ray Diffraction Peak of Clay-Organic Hybrid Films by Swelling and Drying Procedure", *Clay Sci.*, 査読有, 2015, 19, 79-83.
16. S. Fujii, Y. Suzuki, J. Kawamata, R. Tsunashima, "Large in-plane/out-of-plane anisotropic conduction in PEDOT-based hybrid films: lamellar assemblies structured by mono-layered nanosheets", *J. Mater. Chem. C*, 査読有, 2015, 3, 7153-7158.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 大西省三、松本和也、浅村直哉、守友博紀、鈴木康孝、川俣純、"赤色発光性ピレン誘導体の二光子励起特性"、日本化学会第 98 春季年会、平成 30 年 3 月 21 日、日本大学理工学部(船橋市)
2. 大西省三、富永亮、鈴木康孝、川俣純、仁子陽輔、小西玄一、"ミトコンドリア染色用赤色発光性化合物の多光

- 子励起挙動" 2017 年光化学討論会、平成 29 年 9 月 5 日、東北大学（仙台市）
3. Yasutaka Suzuki, "Luminescent molecular probes for multi-photon imaging", Regius Chair 200th Anniversary Symposium,平成 29 年 9 月 26 日, University of Glasgow (Glasgow, UK)
 4. 守友博紀、牧野洋平、大村悠理子、浅村直哉、松下寛史、大西省三、鈴木康孝、川俣純、"ピリジニウム誘導体をプローブとしたフェムト秒ファイバーレーザー励起多光子蛍光イメージング"、日本化学会第 97 春季年会、2017 年 3 月 18 日、慶應義塾大学（横浜市）
 5. 大村悠理子、大西省三、牧野洋平、藤木祥平、守友博紀、鈴木康孝、川俣純、"ピアリアル部位を有するミトコンドリア膜電位応答性プローブの二光子励起発光特性"、日本化学会第 97 春季年会、2017 年 3 月 18 日、慶應義塾大学（横浜市）
 6. H. Moritomo, A. Fujii, T. Shiraishi, K. Satomi, H. Sugihara, Y. Suzuki, J. Kawamata, "Mitochondrial selective efficient two-photon induced fluorescent probes possessing alkyl pyridinium group", Pacificchem 2015, 平成 27 年 12 月 17 日 (Hawai Convention Center)
 7. Y. Suzuki, H. Moritomo, A. Fuji, T. Shiraishi, J. Kawamata, "Efficient Two-Photon Fluorescent Molecules Excitable by a femtosecond Fiber Laser", 第 53 回日本生物物理学会年会、平成 27 年 9 月 14 日、金沢大学(金沢市)
 8. 守友博紀、白石崇人、藤井旺成、里見浩一郎、鈴木康孝、川俣純、"ピリジニウム基をもつ高効率二光子励起プローブのミトコンドリアからの発光挙動" 2015 年光化学討論会、平成 27 年 9 月 9 日大阪市立大学（住吉区）
 9. 守友博紀、鈴木康孝、仁子陽輔、小西玄一、川俣純、"ピレン誘導体をプローブに用いたフェムト秒ファイバーレーザー励起二光子蛍光イメージング"、日本化学会第 96 春季年会、平成 27 年 3 月 27 日、同志社大学（京田辺市）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：ミトコンドリア膜電位応答性蛍光化合物
 発明者：川俣純、鈴木康孝、浅村直也、仁子陽輔、関仁望
 権利者：山口大学、高知大学
 種類：特許
 番号：特願 2017-216664
 出願年月日：2017 年 11 月 10 日
 国内外の別： 国内

取得状況（計 1 件）

名称：二光子吸収化合物
 発明者：大阪新薬株式会社、鈴木康孝、川俣純、守友博紀、富永亮、小西玄一、仁子陽輔
 権利者：山口大学
 種類：特許権
 番号：特許第 6284225 号
 取得年月日：平成 30 年 2 月 9 日
 国内外の別： 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 康孝 (SUZUKI YASUTAKA)
 山口大学・大学院創生科学研究科・准教授
 研究者番号：30634753

(3)連携研究者

川俣 純 (KAWAMATA JUN)
 山口大学・大学院創生科学研究科・教授
 研究者番号：40214689