

令和元年6月14日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04179

研究課題名(和文) 蛍光性有機液体ナノ粒子の創出と細胞内蛍光イメージングへの応用

研究課題名(英文) Development of fluorescent organic liquid nanoparticles and its application to cellular imaging

研究代表者

多喜 正泰 (TAKI, Masaaysu)

名古屋大学・物質科学国際研究センター(WPI)・特任准教授

研究者番号：70378850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：液体蛍光色素を内包した有機蛍光ナノ粒子の創製を目指した。蛍光ナノ粒子の粒径はトリアルキルシリル置換ピレンの粘度に強く依存し、低粘度液体が最も小さい粒径を与えた。液体ピレンの流動性はナノ粒子コアでも保持されており、「ドーパント色素のナノ粒子内部への自発的取り込み」という新しい概念に基づいた発光色のチューニングに成功した。また可視光で励起可能な耐光性液体蛍光色素を新たに合成し、物性に及ぼすシリル基の導入位置の効果について検討した。さらにこれを内包した蛍光ナノ粒子を作製し、これがエンドサイトーシス機構によって細胞内部に取り込まれることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

色素が液体であるという特徴を活かし、多様な発光色を示す有機蛍光ナノ粒子を「水溶液へのドーパントの添加」という極めて単純な方法で作れ出す手法を発見したことは、今後の材料開発研究においても有用な情報である。また、液体蛍光ナノ粒子を用いて細胞の蛍光イメージングにも成功したことから、生命科学研究への応用も十分に期待できる。

研究成果の概要(英文)：Organic fluorescent nanoparticles containing liquid fluorescent dye have been developed. We found that the particle size of fluorescent nanoparticles strongly depends on the viscosity of trialkylsilyl substituted pyrene, and the low viscosity liquid gave the smallest particle size. The fluidity of liquid pyrene is also maintained in the nanoparticle core, and the emission color was successfully tuned based on the new concept of "spontaneous incorporation of the dopant dyes into the nanoparticles". We also synthesized novel liquid fluorescent dyes with outstanding photostability, and examined the effect of the position of the silyl group on the physical properties. Furthermore, we prepared fluorescent nanoparticles containing the liquid dye and found that they are taken up inside the cell by the endocytosis mechanism.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：液体蛍光色素 有機蛍光ナノ粒子 マルチカラー 超耐光性蛍光色素 蛍光イメージング

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在の生命科学研究において光イメージングは欠くことのできない技術の一つである。イメージング技術の発達には、蛍光顕微鏡やレーザーなどのハード面と、蛍光プローブや蛍光タンパク質などに代表される機能性分子の開発というソフト面が両輪となって推進されてきたのはいうまでもない。しかし、日進月歩のハード面に比べソフト面の進展が若干立ち後れているのも事実である。当該研究分野の飛躍的な発展には、革新的な機能性分子や機能性材料を創製するための新しい化学的手法の開発が重要となっている。

数ある蛍光イメージングツールの中でも、近年高い注目を集めているのが蛍光ナノ粒子である。CdSe や CdTe などの半導体無機材料から構成される量子ドット、あるいは有機蛍光色素をシリカ内部に封入した蛍光シリカナノ粒子などが代表であり、細胞染色やタンパク質標識のみならず、ナノ粒子の特性である EPR 効果を活かした腫瘍の *in vivo* イメージングまで展開されている。しかし、蛍光ナノ粒子開発において共通の課題として挙げられるのが、外部環境や外部刺激に対する応答性をいかにして付与するのか、その新しい方法論の提唱である。実際、pNIPAM などの温度応答性ポリマーをベースに構築された粒子を除いては報告例に乏しい。さらに量子ドットに関しては、潜在的な生体毒性に加え、標識タンパク質の 1 分子イメージングを行う際のブリンキング (蛍光の明滅) が大きな問題点として指摘されている。したがって、蛍光ナノ粒子研究におけるこのような閉塞感を打破し、生体イメージングの革新的なツールを開発するためには、蛍光ナノ粒子の設計において全く新しいコンセプトを提供し、これを実証する研究課題が必要であると考えた。このような学術的背景のもと、本研究では液体の有機蛍光色素を内包したナノ粒子、すなわち蛍光性液体有機ナノ粒子の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、次の 2 つの項目を具体的な課題として定めた。

①超耐光性液体蛍光色素を内包した高輝度蛍光ナノ粒子の創製

超耐光性ともいえる異次元の光安定性をもつ蛍光色素骨格に、長鎖トリアルキシル基の導入することによって蛍光色素の液体化を図る。得られる超耐光性液体蛍光色素をナノ粒子内部に封入し、新たなイメージングツールである高輝度蛍光ナノ粒子を創製する。

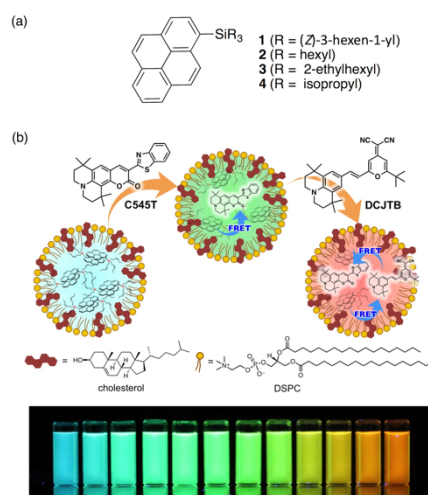
②ナノ粒子内の相転移現象に基づいた蛍光ナノ温度計の創製

新概念である「ナノ粒子内の相転移現象」に基づき、外部温度変化に対して蛍光応答を示す蛍光ナノ温度計を創製する。このナノ粒子は有機液体 (=マトリックス) と、マトリックスの相変化に対応して蛍光波長がシフトする蛍光分子から構成される。外部温度の低下につれてマトリックスの粘性が上昇し、凝固点あるいはガラス転移温度で固体になる。この変化に伴って蛍光分子の運動状態が変化し、その状態の違いを発光波長の違いとして出力できれば、蛍光波長あるいは蛍光強度比から温度に変換できる蛍光ナノ温度計となる。

3. 研究の方法

①-1. 長鎖トリアルキシル基を導入した液体有機色素の創製と物性評価

ピレン骨格に種々のトリアルキシル基を導入した液体ピレンを合成した。得られた液体ピレンと生体膜脂質である 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphor-choline (DSPC) およびコレステロールをクロロホルムに溶解させ、これを沸騰した蒸留水に攪拌しながら滴下し、この分散液をプローブ型のホモジナイザーを用いて 20 分間超音波処理することにより、液体ナノ粒子を得た。各ナノ粒子の粒径は、動的分散法 (DLS) を用いて測定し、粒径と粘度の相関関係について検証した。



①-2. ドーパントによる液体ナノ粒子の多色化

ナノ粒子の水分散液に他の発光色を示すドーパントを加えると、色素が自発的にナノ粒子内部に取り込まれるという現象を見出した。具体的には Coumarin 545T (C545T) と DCJTb をそれぞれ緑色ドーパント、赤色ドーパントとして用いたところ、添加量に応じて蛍光共鳴エネルギー移動効率が変わり、多色化が実現された (右図)。

①-3. 超耐光性液体蛍光色素の合成と物性評価

ピレンは紫外光励起が必要であることに加え、耐光性にも乏しい。そのため、トリヘキシルシリル基を導入した可視光で励起可能な超耐光性液体蛍光色素を合成した。示差走査熱量測定 (DSC) により、トリヘキシルシリル基の導入位置の違いによる物性の違いについて検討した。また合成した各色素について、溶液状態と無溶媒状態の光物性を測定し比較した。

①-4. 超耐光性液体蛍光色素によるナノ粒子の物性評価

ポリビニルアルコール 100 mg を蒸留水 2.0 mL に溶解し、これを攪拌しながら液体色素の酢酸エチル溶液を滴下した。得られた混合液を 1 時間攪拌したのち、ホモジナイザーを用いて 10 分間超音波処理した。これを、攪拌している 100 mL の蒸留水に対して滴下し、ナノ粒子を作製した。精製は、まず 15 分間遠心分離することで大きな粒子を沈殿させて取り除いた。上澄み液

は遠心式限外ろ過フィルターを用いて余分な PVA を洗浄した。さらに 0.45 μm のシリンジフィルターを通して大きなナノ粒子を排除し、目的のナノ粒子を得た。得られたナノ粒子に関しては、光物性測定に加え、DLS および TEM による粒径測定も行った。

①-5. 超耐光性液体ナノ粒子の光安定性評価

水中に分散させたナノ粒子に対して、キセノンランプ (300 W) を照射し、照射時間に対して最大蛍光波長における蛍光強度の変化追跡した。比較のため、トルエン溶液についても同様の実験を行った。

①-6. 超耐光性液体ナノ粒子を用いた細胞イメージング

作製したナノ粒子を用いた細胞イメージングを行った。希釈したナノ粒子を含む培地を用いて HeLa 細胞を 37 $^{\circ}\text{C}$ で 17 時間培養し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光画像を取得した。

②-1. 粘度応答性を有する蛍光色素の合成と物性評価

励起状態で分子内回転が起こる色素は、周囲の粘性に応じて蛍光特性が変化するものと予想した。周囲の粘性により応答しやすいように、色素に長鎖アルキル基を導入した蛍光色素を合成し、その光物性を測定した。また、色素の粘度依存性を確認するために、2-Methyl THF 中における温度可変スペクトルを測定した。

②-2. 温度応答に対するマトリックスの効果の検証

より高い温度にガラス転移温度をもつマトリックスを探索し、それぞれについて光物性測定を行った。特に、PEG200 およびポリビニルアセテート (PVAc) 中における温度依存性について詳細に検討した。PVAc 中における蛍光測定は以下の通り薄膜中で行った。ガラスボトムディッシュのガラス部分に、PVAc と蛍光色素を少量のクロロホルムで溶かしたものをスピコートすることにより薄膜を形成した。さらに薄膜の温度可変蛍光スペクトルの測定はスペクトル顕微鏡をもちいて、ガラスボトムディッシュ中に蒸留水を入れて測定することで温度が均一に膜に伝わるようにした。

②-3. 温度依存性蛍光ナノ粒子の作成と機能評価

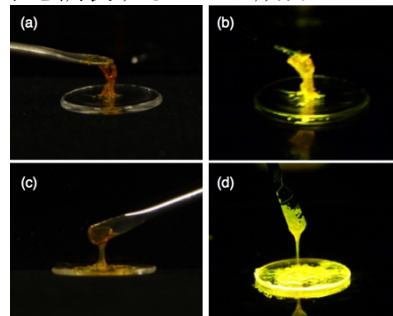
ポリビニルアルコールを蒸留水に溶かし、色素と PVAc を酢酸エチルに溶かしたものを攪拌しながら滴下した。その混合液を 1 時間攪拌し続けた後、2 分間超音波処理した。さらに、これを攪拌している蒸留水に加え、15 分間遠心分離処理を行った。沈殿物を洗浄し、目的のナノ粒子を得た。得られたナノ粒子について、DLS および TEM から粒径を評価した。また、プレートリーダーを用いて、ナノ粒子の温度依存性について検討した。

4. 研究成果

①-1. まず、アルキル基の効果について検討したところ、cis-オレフィンに有するピレンが最も低い粘度を示した。低粘度液体の方が小さい粒子を与え、DLS から平均粒径が 150 nm 程度であることを明らかにした。また、得られたナノ粒子は水中でも凝集せず、長期間安定に存在した。この場合、粒径は水溶液中で少なくとも 1 週間は変化せず、熱力学的にも安定であることがわかった。これは、小さい粒子が次第に大きな粒子へ成長するオストワルド熟成が起こりにくいためであると考えられる。一方、高粘性液体の場合は、ナノ粒子の粒径は大きくなり、粒径分布も幅広くなった。

①-2. 用いた 2 つのドーパントはピレンとの重なりが大きく、FRET 効率が高いものを選択している。ドーパント濃度を液体ピレンに対して 5 mol% まで添加していくとピレンのエキシマー由来する青色の発光帯が減少していくと同時に、ドーパントの発光帯が上昇する様子が観測された。スペクトル変化から、FRET 効率は、C545T で 96%、DCJTb で 95% にまで達した。また、両者を同時に添加すると、ナノ粒子内で段階的にピレンから、C545T、さらに DCJTb へと段階的に FRET が進行していることがわかった。以上の結果を踏まえ、両者の添加量を調節することにより、蛍光量子収率 0.36 をもつ白色発光ナノ粒子を調製することに成功した。

①-3. トリヘキシルシリル基の位置が異なる 2 種類の超耐光性色素 (パラ置換体 p1 とメタ置換体 m1) を橙色のオイルとして得た。m1 は容器を傾けるとゆっくり流れるのに対し (右図下段)、p1 は全く動かず (右図上段)、粘度に違いが生じた。両者について DSC 測定を行った結果、ガラス転移温度は、トリヘキシルシリル基をパラ位に導入したものよりもメタ位に導入した方が低くなった。これは、メタ位の方がパラ位よりも色素骨格に近いので、より効率的に色素同士の凝集を防いでいるためだと考えられる。各色素について溶液状態 (シクロヘキサン、トルエン、ジクロロメタン、アセトン、DMF 中) と無溶媒状態の光物性を測定し比較したところ、蛍光スペクトルは溶媒の極性が増すにつれて大きく長波長シフトする様子が観測された。一方、蛍光量子収率は溶媒の極性が増すにつれ、減少したが、シクロヘキサン、トルエン、ジクロロメタンでは 0.83 以上の良好な値を示した。この場合、ケイ素置換基は希薄溶液中の色素の光物性に大きな影響を与えないことも確認している。これに対し、無溶媒状態では、ケイ素置換基の導入位置による光物性の違いが現れ、m1 よりも p1 の方が長波長側に発光を示した。無溶媒状態におけるそれぞれの蛍光量子収率は



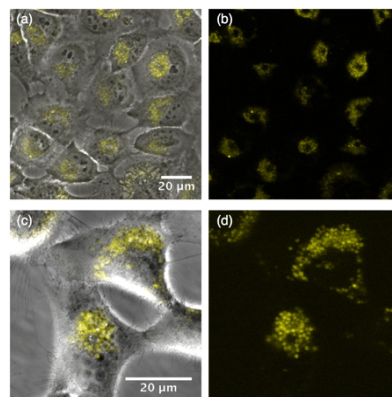
は遠心式限外ろ過フィルターを用いて余分な PVA を洗浄した。さらに 0.45 μm のシリンジフィルターを通して大きなナノ粒子を排除し、目的のナノ粒子を得た。得られたナノ粒子に関しては、光物性測定に加え、DLS および TEM による粒径測定も行った。

それぞれ m1 で 0.31, p1 で 0.46 であった。ケイ素置換基がフェニル基のパラ位にある場合、ヘキシル基が色素骨格を効率的に覆うことができず、分子間相互作用が働きやすくなったと考えられる。これに起因して置換体はパラ置換体と比べて蛍光が長波長シフトし、かつ蛍光消光が起こったと考えられる。

①-4. 作製したナノ粒子では化合物による違いは現れず、いずれも約 140 nm の粒径をもつ粒子であることがわかった(NP-p1: $d = 144 \pm 44$ nm; NP-m1: $d = 141 \pm 40$ nm)。また、NP-p1, NP-m1 は水中で少なくとも 1 週間は粒径に変化がなく、安定であることがわかった。透過型電子顕微鏡(TEM)による観察では、大きさにばらつきがあるものの球形の像が観察され、目的のナノ粒子が作製できたことが確認された。TEM 像から求めた粒径分布から、平均粒径を NP-p1 で 46 nm, NP-m1 で 51 nm と求めた。ナノ粒子の蛍光量子収率はいずれも 0.48 と良好な値を示したことに加え、励起スペクトルと蛍光スペクトルから求められるストークスシフトは約 4700 cm^{-1} と大きく、自己吸収による消光の影響や、イメージングの際の励起散乱光によるバックグラウンドの影響を低く抑えることができるものと思われる。

①-5. 溶液状態ではキセノンランプを 1 時間照射しても初期強度の 97% が残存していたが、ナノ粒子の場合は 10 分間の照射で速やかな褪色が認められ、NP-p1 で 30%, NP-m1 で 36% の蛍光強度しか得られなかった。さらに 1 時間照射した後は、それぞれ元々の蛍光強度の 7%, 12% にまで減少した。ナノ粒子化することによる耐光性の喪失の原因については、現在解析を進めているところではあるが、ナノ粒子内部の環境を考慮すると、この安定性の違いは色素濃度、あるいは分子間距離に依存しているものと予想される。

①-6. 共焦点イメージングの結果、細胞内から蛍光シグナルが観測され、特に核周辺に集積している様子がうかがえた(右図)。さらに拡大すると、1-2 μm の顆粒状のものが観測された。一般にナノ粒子などの大きな構造体の細胞内への取り込みは、エンドサイトーシス機構で進行することが知られており、エンドソームやリソソームに局在していることが多い。リソソームの大きさは約 1-2 μm であり、観測された像と一致する。したがって、本研究で作製したナノ粒子も同様のエンドサイトーシス機構によって細胞内に取り込まれたものと推測され、取り込み時においてもナノ粒子構造が維持されていることが示唆された。



②-1. カルバゾールを電子供与基として有する蛍光色素は、THF 溶液中で 424 nm に最長吸収波長を示し、549 nm に黄緑色の蛍光を示した。2Me-THF 中における蛍光スペクトルの温度依存性を測定したところ、室温から融点である 137 K までは長波長シフト、融点からガラス転移温度である 91 K 付近までは短波長シフトが観測された。まず 137 K までの長波長シフトについては溶媒自身の温度による極性変化に依存するものであると考えられる。一方で融点からガラス転移温度までは大きな波長の変化が観測され、ガラス転移温度より低い温度では波長はほとんど変化していなかったため、ガラス転移における結晶構造の変化が分子の動きを抑制しているのではないかと示唆された。

②-2. PEG200 を用いた場合、 -70°C と 0°C の間では、蛍光波長が 38 nm シフトし、高温域で長波長側にシフトする様子が観測された。この変化域は PEG200 のガラス転移温度と一致することから、スペクトルのシフトはガラス転移におけるマトリックスの粘度変化によるものであると考えられる。一方、色素を PVAc 中に分散させたものでは、わずかではあるが温度によるスペクトルの変化が観測できた。ここで 20°C と 40°C 間の差スペクトルを計算したところ、温度の低下に伴って長波長成分が減少し、短波長成分が増加していくことが読み取れ、これはこれまでの測定に矛盾しない結果となった。

②-3. 色素を内包したナノ粒子は約 200 nm の均一なサイズで作製できた。得られたナノ粒子について温度可変スペクトルの測定を行ったところ、温度変化依存的に蛍光波長がシフトする様子を確認することができた。しかし、その変化量はイメージング応用を考慮すると小さく、高感度な温度検出はできない。ナノ粒子になった際に色素の動きを完全にとめられていないのではないかと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

M. Taki, S. Azeyanagi, K. Hayashi, S. Yamaguchi, Color-tunable Fluorescent Nanoparticles Encapsulating Trialkylsilyl-substituted Pyrene Liquid, *J. Mater. Chem. C*, 5, 2017, 2148-2148.

DOI: 10.1039/C6TC05208H

[学会発表] (計 5 件)

① 千田樹絵子, 多喜正泰, 有本知子, 湯川博, 馬場嘉信, 山口茂弘, 耐光性近赤外蛍光ナノ粒子の創製と in vivo イメージングへの応用, 日本化学会第 98 春季年会, 2018 年

- ②千田樹絵子, 多喜正泰, 山口茂弘, ホスファローダミン色素を内包した耐光性近赤外蛍光ナノ粒子の創出, 第11回バイオ関連化学シンポジウム, 2017年
- ③梶原啓司, 多喜正泰, 佐藤良勝, 山口茂弘, Super-photostable Fluorescent Probes for Lipid Droplets Imaging, 2nd International Symposium on Biofunctional Chemistry, 2017年
- ④大崎博司, 多喜正泰, 山口茂弘, Visualizing Lipid Droplets by a Negatively Solvatochromic Fluorescent Probe, 日本化学会第97春季年会化学会, 2017年
- ⑤千田樹絵子, 名倉和彦, 多喜正泰, 山口茂弘, 局所温度計測を可能にする有機蛍光色素含有高分子ナノ粒子の創成, 第65回高分子討論会, 2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

〔その他〕

<http://orgreact.chem.nagoya-u.ac.jp/olddocs/Home.html>

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：山口茂弘

ローマ字氏名：Shigehiro Yamguchi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。