

令和 5 年 4 月 24 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05518

研究課題名（和文）有機蛍光色素による凝集誘起発光（AIE）を利用した新規近赤外蛍光分析試薬の創成

研究課題名（英文）Synthesis of Novel Near-infrared Fluorescence Analytical Reagents Using Aggregation-induced Emission (AIE) by Organic Fluorescent Dyes

研究代表者

川上 淳（Kawakami, Jun）

弘前大学・理工学研究科・教授

研究者番号：60261426

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）：有機蛍光色素を用いた蛍光分析試薬は、簡便で汎用性が高く、特に、生命科学においては必要不可欠なものになっている。しかし、従来のものの多くは平面構造で、希薄溶液中では強い蛍光を示すが、高濃度溶液中では分子が積み重なった集積構造を形成して凝集起因消光を起こす。本研究では、分子内に回転運動が可能な嵩高い置換基を導入することで、希薄溶液中では熱放射を伴う無輻射過程が勝り無蛍光であるが、高濃度溶液中や凝集状態では、回転運動の抑制と集積構造の取り難さにより蛍光強度が増大する凝集誘起発光を利用した新規近赤外蛍光分析試薬を構築を目指した。その結果、幾つかのモデル分子の合成に成功し興味ある知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の蛍光分析試薬は、平面構造の有機蛍光色素を用いたものが多く、希薄溶液中では強い蛍光を示すが、濃度の増大により分子が積み重なった集積構造を形成して凝集起因消光を起こすため、検出感度や定量性に問題があった。

本研究で合成された、分子内電荷移動型の蛍光性トリプタンスリンに回転可能な嵩高い置換基を導入した系は、希薄溶液中では熱放射を伴う無輻射過程が勝り無蛍光であるが、高濃度溶液中や凝集状態では回転運動と積み重なった集積構造の抑制により生体蛍光プローブとして最適な近赤外領域での凝集誘起発光を示すものである。よって、今後の蛍光分析試薬開発において学術的・社会的に意義のある成果と言える。

研究成果の概要（英文）：Most fluorescence analysis reagents using organic fluorescent dyes have a planar structure and show strong fluorescence in dilute solutions, but in concentrated solutions, they form aggregate structures in which molecules are stacked, causing aggregation-caused quenching (ACQ).

In this study, by introducing bulky substituents that allow rotational movement into the molecule, we aimed to construct new near-infrared fluorescence analysis reagents using aggregation-induced emission (AIE), in which the non-radiative process with thermal radiation prevails in dilute solution, but the fluorescence intensity increases in concentrated solution or in an aggregated state due to suppression of rotational movement and difficulty in forming integrated structures. Several model molecules were successfully synthesised and interesting findings were obtained.

研究分野：有機光化学，超分子化学

キーワード：蛍光分析試薬 有機蛍光色素 凝集誘起発光 近赤外 トリプタンスリン

1. 研究開始当初の背景

有機蛍光色素を用いた蛍光分析試薬(蛍光性化学センサー・蛍光プローブ)は、簡便で汎用性が高く、特に現在では、生命科学において生命現象を理解する分子ツールとして必要不可欠なものになっている。しかし、これらの蛍光分析試薬があらゆる場面においてその能力を十分に発揮できるかと言えばそうではない。最も懸念されるのが凝集起因消光(aggregation-caused quenching, ACQ)である。多くの有機蛍光色素は、平面構造をしており、 π 共役平面の領域を増減することでHOMO-LUMOギャップの変化に対応した色の蛍光を示す。例えば、代表的な有機蛍光色素であるピレンは、希薄溶液中では効率よく蛍光を発光する。しかし、濃度を上昇させて分子間距離が3~4Åになると、サンドイッチ型に配列されてモノマー蛍光よりも長波長側にエキシマー蛍光を示し、さらに高濃度の溶液中では、 π - π スタッキング相互作用が強くなり、分子がびたりと積み重なった集積構造を形成して消光する(図1)。そのため、希薄溶液中でしか使えず、高濃度条件や固体状態での利用が困難なのが実情である。従って、ACQによる検出感度や定量性の低下を改善するためには、新しい方法論に基づく蛍光分析試薬の構築が必要となる。

そこで本研究では、分子内に回転運動が可能な嵩高い置換基を導入することで、希薄溶液中では熱放射を伴う無輻射過程が勝り無蛍光であるが、高濃度溶液中など凝集状態では回転運動の抑制とびたりと積み重なった集積構造の取り難さにより蛍光強度が増大する凝集誘起発光(aggregation-induced emission, AIE)を利用した、検出感度と定量性に優れ、生体蛍光プローブとして最適な近赤外領域(650~900 nm)で発光する新規近赤外蛍光分析試薬の構築を立案するに至った。

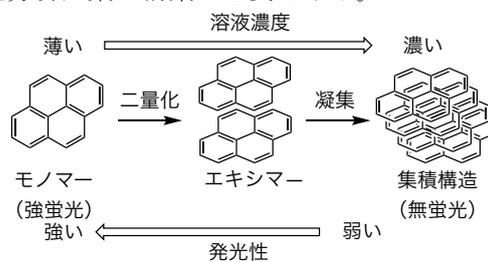


図1 ピレン濃度と発光性の関係

2. 研究の目的

2001年に香港科技大学のB. Z. Tang教授らによって、凝集すると蛍光消光するこれまでの有機蛍光色素とは一線を画す、凝集すると蛍光強度が増大するAIE性の有機蛍光色素が報告された(*Chem. Commun.*, 2001 (18), 1740-1741)。励起エネルギーの消費は、光を放出する輻射過程と、熱を放出する無輻射過程との競合であるが、代表的なAIE色素のテトラフェニルエチレンは、希薄溶液中ではフェニル基の回転運動による熱放射を伴う無輻射過程が勝り無蛍光であるが、高濃度溶液中で凝集するとフェニル基の回転運動が抑制され、光放射を伴う輻射過程が勝り、蛍光を示す(図2)。また、ピレンやテトラフェニルエチレン等の一般的な有機蛍光色素は600 nm以下の可視領域で発光するものが多いが、生体蛍光プローブとして用いる場合には、血液中のヘモグロビンや水の吸収の影響が少ない650~900 nmの“生体の窓”と呼ばれる生体透過性に優れた近赤外領域で吸収・発光する有機蛍光色素が重要且つ必要となる。

そこで本研究では、ACQによる検出感度と定量性の低下を改善する新しい方法論としてAIEを利用した新規近赤外蛍光分析試薬の創成を目的とした。

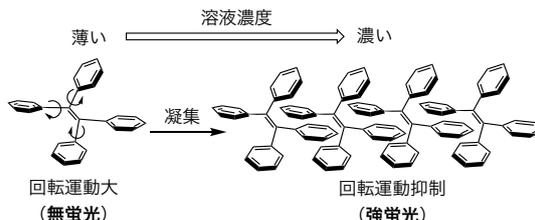


図2 テトラフェニルエチレンの濃度と発光性の関係

3. 研究の方法

本研究では、本研究代表者が見出した蛍光性トリプタンスリンの骨格を基本構造とするオリジナルのAIE色素をモデル分子として合成を行った。トリプタンスリンは、小分子でありながら、2-位の電子供与性基と6-位の電子求引性基(R)の置換基効果により分子内電荷移動(intramolecular charge transfer, ICT)の度合を調整することで近赤外領域での吸収・発光が可能である(図3)。

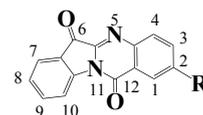


図3 2-位置換トリプタンスリン (R: 電子供与性基)

合成が完了したものから、各種分光学的測定(NMR, ESI-MS, X線結晶構造解析, 紫外可視近赤外吸収スペクトル, 蛍光スペクトル etc.)を行い、吸収極大波長($\lambda_{a, max}$), 蛍光極大波長($\lambda_{f, max}$), 蛍光量子収率(Φ_f)の溶媒効果や濃度効果等の光物理学的性質を明らかにした。また、密度汎関数理論計算により理論的側面についても詳細に検討した。さらに、合成したAIE色素による金属イオンの蛍光検出(蛍光応答性)等、各種分光学的測定により、非凝集状態及び凝集状態において比較検討し、AIEを利用した近赤外蛍光分析試薬としての特性を調べた。

4. 研究成果

(1) 2-(4-(N,N-ジフェニルアミノ)フェニル)トリプタンスリン誘導体の凝集誘起発光と固体発光

回転運動が可能な嵩高い置換基を有する 2-(4-(*N,N*-ジフェニルアミノ)フェニル)トリプタンスリン誘導体 **T2PhNPh₂9Ph(COOEt)₂** の吸収・発光挙動について、蛍光性トリプタンスリンの典型的な例である 2-アミノトリプタンスリン (**T2NH₂**) と比較しながら説明する。

1 × 10⁻⁵ mol/L の濃度を調製した 1,4-ジオキササン (1,4-dioxane), トルエン (PhMe), クロロホルム (CHCl₃), 酢酸エチル (AcOEt), テトラヒドロフラン (THF), ジクロロメタン (CH₂Cl₂), 2-プロパノール (2-PrOH), エタノール (EtOH), メタノール (MeOH), アセトニトリル (MeCN), *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF), ジメチルスルホキシド (DMSO) 中で測定した吸収スペクトルを図 4 に示す。

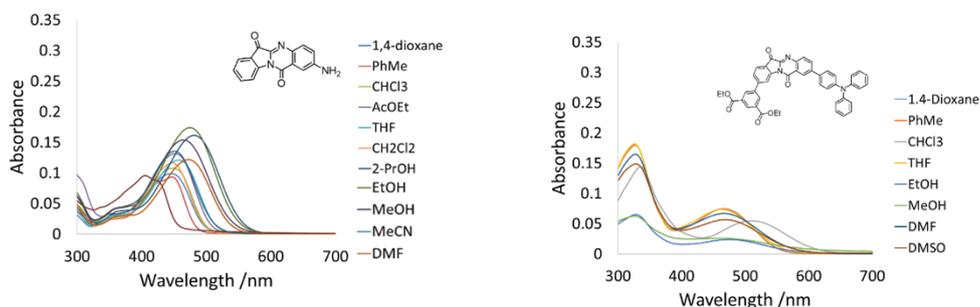
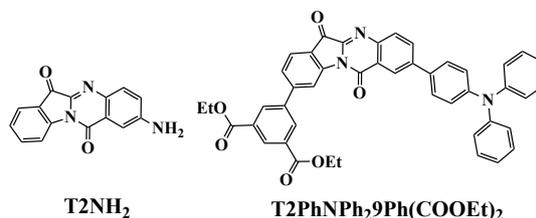


図 4 **T2NH₂** (左) と **T2PhNPh₂9Ph(COOEt)₂** (右) の吸収スペクトル

T2PhNPh₂9Ph(COOEt)₂ は, **T2NH₂** と比べてより長波長側に吸収帯が観測される。これは, 4-(ジフェニルアミノ)フェニル基のアミノ基よりも強い電子供与性と, **T2PhNPh₂9Ph(COOEt)₂** の方がより共役が拡張しているためと考えられる。

次に, **T2NH₂** と **T2PhNPh₂9Ph(COOEt)₂** の蛍光スペクトルを図 5 に示す。

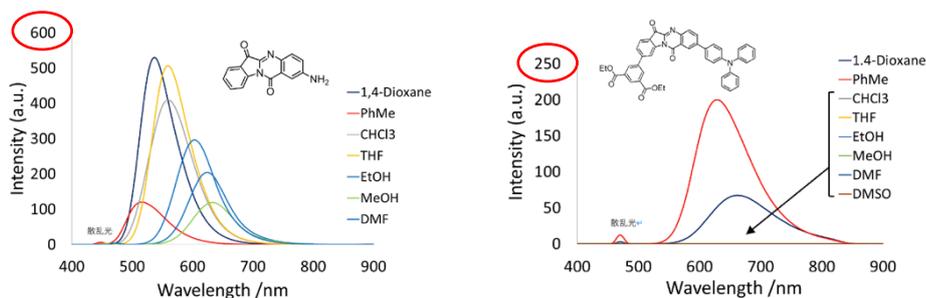


図 5 **T2NH₂** (左) と **T2PhNPh₂9Ph(COOEt)₂** (右) の蛍光スペクトル

T2NH₂ は, 種々の溶媒中で強い蛍光が観測されたが, **T2PhNPh₂9Ph(COOEt)₂** は, 殆どの溶媒中で蛍光は観測されず, 蛍光が観測された無極性溶媒の 1,4-ジオキササンとトルエン中の蛍光強度も, **T2NH₂** と比べて著しく弱いものであった。なお, 1,4-ジオキササンとトルエン中での蛍光は, 650 nm 以上の近赤外領域を含む発光であった。**T2PhNPh₂9Ph(COOEt)₂** で蛍光が観測されなかった理由は, フェニル基の回転運動による熱放射を伴う無輻射過程が勝ったためと考えられ, AIE が期待できる結果と言えた。

そこで, 良溶媒のテトラヒドロフランと貧溶媒の水との混合溶媒を用いて, 水の割合を変化させることで凝集状態を作り出すことで, 凝集誘起発光 (AIE) が観測されるか調べた。その結果を図 6 に示す。水の割合が 50% を過ぎると, 蛍光強度が徐々に増大し, 85% で最大に達し, AIE が観測された。90% 以上になると, 蛍光強度が減少しているが, これは溶質の析出によるものと思われる。

次に, 以前 2-アミノトリプタンスリン誘導体において, 蛍光応答性が観測された, Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Al³⁺ 各過塩素酸塩の添加実験を, 試料濃度 1 × 10⁻⁵ mol/L の THF/水の混合溶媒 (THF/H₂O=1/4) 中で行った。その結果, 金属イオン添加時には, 蛍光極大波長が短波長シフトし, 蛍光強

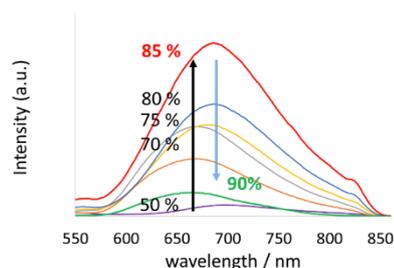


図 6 **T2PhNPh₂9Ph(COOEt)₂** の THF/水混合溶媒中の蛍光スペクトル変化

度の低下が観測されたものの大きな変化は観測されなかった (図 7)。これは、金属イオンと相互作用すると考えられるトリフェニルアミン部の窒素原子が、嵩高いフェニル基に囲まれて相互作用が妨げられたためと予想される。

一方、**T2PhNPh₂9Ph(COOEt)₂** は固体状態でも近赤外波長領域を含む波長で発光し (図 8)、外部からの“こする”や“つぶす”などの機械的な刺激を加えることで、分子の構造変化に伴い発光の色が変化するメカノクロミック発光 (MCL) を示唆する結果も得られており、今後、圧力センサー等への応用が期待できる。

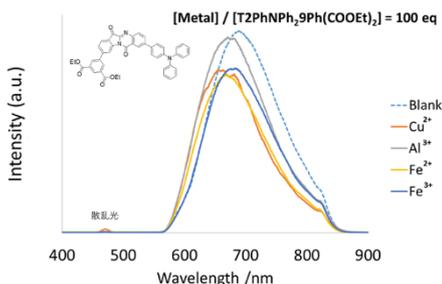


図 7 **T2PhNPh₂9Ph(COOEt)₂** の金属塩添加時の THF/水 (1/4) 混合溶媒中の蛍光スペクトル変化

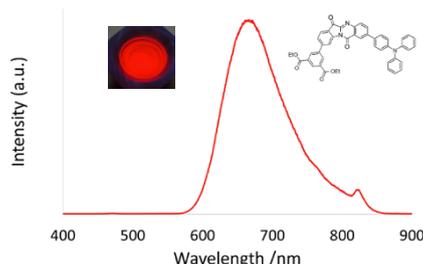


図 8 **T2PhNPh₂9Ph(COOEt)₂** の固体状態での蛍光スペクトル (写真は 366 nm の UV 照射により発光している様子)

上記 (1) の研究成果は、論文発表前の未公表データであるが、以下の (2) ~ (5) の研究成果は、引用文献①~④の論文として既に公表されているため、より簡潔に内容を示す。

(2) 2-(*N,N*-ジフェニルアミノ)トリプタンスリンの凝集誘起発光^①

2-(*N,N*-ジフェニルアミノ)トリプタンスリン (**T2NPh₂**) を合成し、THF/水の混合溶媒中で、水の割合が 80%以上になると AIE を示すことや (図 9)、固体発光を示すことを (図 10)、明らかにした。

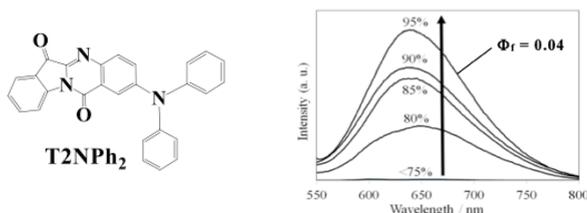


図 9 Fluorescence spectra of **T2NPh₂** in water/THF.

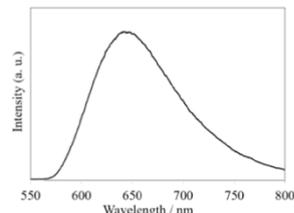
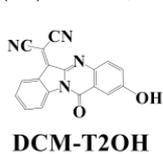


図 10 Fluorescence spectrum of **T2NPh₂** in the solid state.

(3) 2-ヒドロキシトリプタンスリン類縁体の近赤外発光^②



トリプタンスリンの 6-位のカルボニル基を、より電子求引性の強いジシアノメチレン基に置換した 2-ヒドロキシトリプタンスリン類縁体 (**DCM-T2OH**) を合成し、高極性の

非プロトン性溶媒 (アセトニトリル, *N,N*-ジメチルホルムアミド, ジメチルスルホキシド), プロトン性溶媒 (メタノール, エタノール) およびアセトニトリル 20% を含む水溶液において、細胞や組織の“生体の窓”と呼ばれる近赤外領域 (650-900 nm) に吸収および発光が観測されることを明らかにした (図 11)。

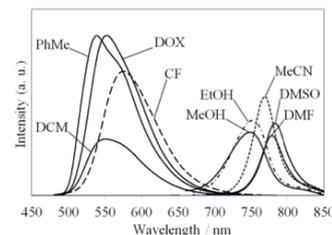
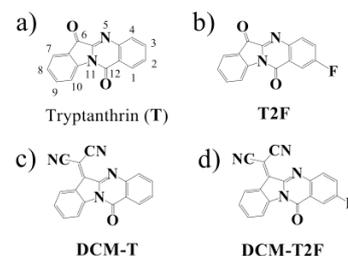


図 11 Fluorescence spectra of **DCM-T2OH** in solvents with different polarities.

(4) トリプタンスリン類縁体の固体状態での発光^③

トリプタンスリン (**T**) および 2-フルオロトリプタンスリン (**T2F**) は固体状態では発光を示さない。これは、平面構造に起因する強い π - π スタッキング相互作用によるものと推定される。しかし、6-位カルボニル基をより強力な電子求引基であるジシアノメチレン基に置換した類似体である **DCM-T** および **DCM-T2F** は、平面構造であるにもかかわらず固体状態で発光を示すことを明らかにし (図 12),



X線結晶構造解析の結果をもとにその理由について考察した。

(5) 1-(2-ベンゾチアゾリル)-2-ヒドロキシトリプタンスリンの励起状態分子内プロトン移動による蛍光^④

2-ヒドロキシトリプタントリン (T2OH) の1-位にプロトン受容体としてベンゾチアゾールを導入した 1-(2-ベンゾチアゾリル)-2-ヒドロキシトリプタンスリン (T2OH1BT) を合成した。

T2OH1BT は極性溶媒中ではヒドロキシ基のプロトン解離により 630 nm~670 nm で蛍光発光し、低極性溶媒中では励起状態分子内プロトン移動 (ESIPT) により 575 nm~610 nm で蛍光発光すること (図 13), また、固体状態でも蛍光を示すことを (図 14), 明らかにした。

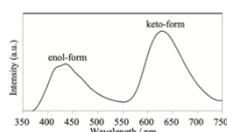
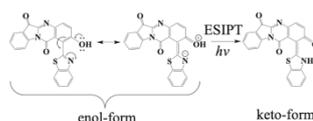
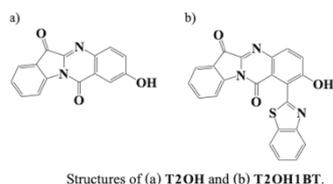


図 13 Fluorescence spectrum of T2OH1BT in the solid state excited at 340 nm.

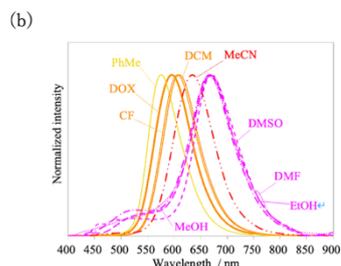
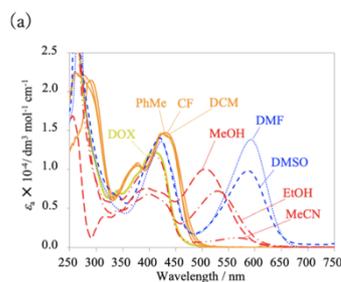


図 14 (a) UV-vis absorption and (b) fluorescence spectra of T2OH1BT.

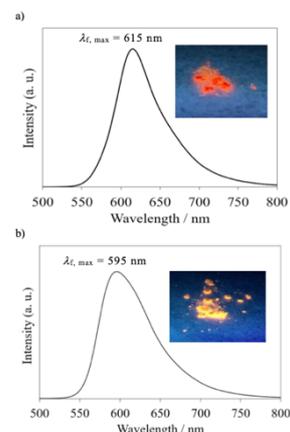


図 12 Fluorescence spectra of a) DCM-T and b) DCM-T2F at excited 460 nm in the solid state. Inset: Photograph of a) DCM-T and b) DCM-T2F under 365 nm UV light in the solid state

最後に、本研究はコロナ禍での研究であったため、研究を進めるにあたり大変苦労した。しかし、本研究を通して、上記に示した幾つかの知見を得ることができた。特に、今回合成した凝集誘起発光 (AIE) 性蛍光色素の固体発光やメカノクロミック発光 (MCL) 挙動は、次世代圧力センサーなどへの応用が期待できる。ようやく、通常の研究活動が行える状況になりつつあり、今後、本研究で得られた知見をもとに、さらなる発展を目指す所存である。

<引用文献>

- ① **Jun Kawakami**, Mizuki Harada, Shunji Ito, Aggregation-induced Emission Properties of 2-(*N,N*-diphenylamino)tryptanthrin, *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, **44** (4), 153-156 (2019).
- ② **Jun Kawakami**, Chika Osanai, Shunji Ito, Photophysical Properties of 2-Hydroxytryptanthrin Analog as a Near-Infrared Dye for Fluorescent Imaging, *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, **45** (1), 19-22 (2020).
- ③ **Jun Kawakami**, Chika Osanai, Shun Ohta, Shunji Ito, Solid-State Fluorescence of Tryptanthrin Analogs, *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, **46** (1), 45-48 (2021).
- ④ **Jun Kawakami**, Masahiro Takahashi, Shunji Ito, Fluorescence Based on Excited-State Intramolecular Proton Transfer of 1-(2-Benzothiazolyl)-2-hydroxytryptanthrin, *Journal of the Japan Society of Colour Material*, **95** (7), 185-188 (2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawakami Jun, Osanai Chika, Ohta Shun, Ito Shunji	4. 巻 46
2. 論文標題 Solid-State Fluorescence of Tryptanthrin Analogs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transactions of the Materials Research Society of Japan	6. 最初と最後の頁 45 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14723/tmrsj.46.45	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kawakami Jun, Harada Mizuki, Ito Shunji	4. 巻 44
2. 論文標題 Aggregation-induced Emission Properties of 2-(N,N-diphenylamino)tryptanthrin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transactions of the Materials Research Society of Japan	6. 最初と最後の頁 153 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14723/tmrsj.44.153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kawakami Jun, Osanai Chika, Ito Shunji	4. 巻 45
2. 論文標題 Photophysical Properties of 2-Hydroxytryptanthrin Analog as a Near-Infrared Dye for Fluorescent Imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transactions of the Materials Research Society of Japan	6. 最初と最後の頁 19 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14723/tmrsj.45.19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 KAWAKAMI Jun, TAKAHASHI Masahiro, ITO Shunji	4. 巻 95
2. 論文標題 Fluorescence Based on Excited-State Intramolecular Proton Transfer of 1-(2-Benzothiazolyl)-2-hydroxytryptanthrin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Japan Society of Colour Material	6. 最初と最後の頁 185 ~ 188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4011/shikizai.95.185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 剛矢, 伊東 俊司, 川上 淳
2. 発表標題 トリプタンスリン誘導体によるFRET型金属イオン用蛍光性化学センサーの合成
3. 学会等名 第31回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉村 幸成, 伊東 俊司, 川上 淳
2. 発表標題 トリプタンスリン誘導体による凝集誘起発光型金属イオン用蛍光性化学センサーの合成
3. 学会等名 第31回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 剛矢, 伊東 俊司, 川上 淳
2. 発表標題 トリプタンスリン誘導体によるFRET型金属イオン用蛍光性化学センサーの合成
3. 学会等名 CSJ化学フェスタ2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉村 幸成, 伊東 俊司, 川上 淳
2. 発表標題 トリプタンスリン誘導体による凝集誘起発光型金属イオン用蛍光性化学センサーの合成
3. 学会等名 CSJ化学フェスタ2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田 瑞樹, 伊東 俊司, 川上 淳
2. 発表標題 凝集誘起発光性トリプタンスリン誘導体及び類縁体の合成と吸収・発光挙動
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 若狭 唯, 伊東 俊司, 川上 淳
2. 発表標題 トリプタンスリン-ホウ素錯体の合成と吸収・発光挙動
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小山内知佳, 伊東俊司, 川上 淳
2. 発表標題 分子内電荷移動型トリプタンスリン類縁体の合成と吸収・発光挙動
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山翔太郎, 伊東俊司, 川上 淳
2. 発表標題 分子内に2つの2-アミノトリプタンスをもつ化合物の合成と吸収・発光挙動
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田瑞樹, 伊東俊司, 川上 淳
2. 発表標題 凝集誘起発光性トリプタンスリン誘導体の合成と吸収・発光挙動
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Goya Takahashi, Ryuta Sekiguchi, Shunji Ito, and Jun Kawakami
2. 発表標題 Tryptanthrin Derivatives as FRET-based Fluorescent Chemosensors for Metal Ions
3. 学会等名 令和4年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kosei Tamamura, Ryuta Sekiguchi, Shunji Ito, and Jun Kawakami
2. 発表標題 Tryptanthrin Derivatives as AIE-based Fluorescent Chemosensors for Metal Ions
3. 学会等名 令和4年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Munakata, Ryuta Sekiguchi, Shunji Ito, and Jun Kawakami
2. 発表標題 Synthesis and Photophysical Properties of Tryptanthrin Derivatives with Bulky Substituents
3. 学会等名 令和4年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

弘前大学大学院理工学研究科川上淳研究室ホームページ
<http://www.st.hirosaki-u.ac.jp/~jun/jklab/jklab001.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	原田 瑞樹 (Harada Mizuki)		
研究協力者	玉村 幸成 (Tamamura Kosei)		
研究協力者	高橋 正寛 (Takahashi Masahiro)		
研究協力者	小山内 知佳 (Osanai Chika)		
研究協力者	若狭 唯 (Wakasa Yui)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山 翔太郎 (Yama Shotaro)		
研究協力者	高橋 剛矢 (Takahashi Goya)		
研究協力者	棟方 祐貴 (Munakata Yuki)		
研究協力者	太田 俊 (Ohta Shun) (20733132)	弘前大学・大学院理工学研究科・助教 (11101)	
研究協力者	伊東 俊司 (Ito Shunji) (10213042)	弘前大学・大学院理工学研究科・教授 (11101)	
研究協力者	関口 龍太 (Sekiguchi Ryuta) (60806222)	弘前大学・大学院理工学研究科・テニユアトラック助教 (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関