

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18934

研究課題名(和文) 単一波長照射による蛍光オンオフ高耐久性ナノ粒子の開発と単一粒子蛍光計測への応用

研究課題名(英文) Fluorescence on-off switching by single wavelength irradiation: Development of highly durable nanoparticles and application to single particle fluorescence measurement

研究代表者

宮坂 博 (Miyasaka, Hiroshi)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授

研究者番号：40182000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光ON-OFF状態制御が可能な分子からなるナノ粒子(1万分子以上)が、粒子全体として蛍光ON-OFF挙動を示すことを見出した。このナノ粒子は光吸収確率の増大により、弱励起光強度で蛍光測定可能であることから、超解像蛍光顕微測定に用いた場合、長時間測定を可能とする。本研究ではこのON-OFF機構解明を目的として詳細な測定と解析を行った結果、光反応によりON状態分子が隣接して生成した場合、著しく弱蛍光性の会合体が生成し励起エネルギー捕捉により粒子全体の蛍光がOFFとなること、一方、開環反応が進行し会合体から単量体となった場合、粒子全体からの蛍光がONになることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単一分子の蛍光像の重心を数nmの分解能で決定し超解像を得る手法は、静的画像のみならず単一分子の動的拡散挙動測定も可能とする。この方法では蛍光ONとOFF状態をスイッチできる分子が重要な役割を果たす。しかし測定には非常に強い励起光強度が必用で、色素の光劣化も迅速に進行するため、長時間、広空間域の知見を得ることは困難であった。本研究では、近年我々が見出した可視単一波長照射下で、全体として蛍光ON-OFF挙動を示すナノ粒子を対象に、その構解明を行った。得られた知見から、非常に弱い照射光強度で測定可能かつ長時間測定を可能とする新たな蛍光ON-OFF可能なナノ粒子の合理的設計が可能となった。

研究成果の概要(英文)：It was found that nanoparticles composed of more than 10000 molecules enabling the controlled fluorescence ON-OFF states exhibit fluorescence ON-OFF behaviors as a whole particle. Because these nanoparticles allows the fluorescence measurement with weak excitation light intensity due to an increase in the light absorption probability, they enable long-time measurement when they are applied to the super-resolution fluorescence microscopy. In this study, detailed measurements and analyses were carried out with the aim of elucidating this ON-OFF mechanism. As a result, when ON-state molecules are produced adjacent to each other by a photoreaction, a significantly weakly fluorescent aggregate is formed, which captures excitation energy, leading to the fluorescent OFF state of the whole particle. On the other hand, the fluorescence of the whole particle was turned on when the ring-opening reaction took place in the aggregates resulting in the independent ON state.

研究分野：光機能材料

キーワード：超解像蛍光観測 蛍光スイッチング 会合体生成 ナノ粒子 1波長制御

1. 研究開始当初の背景

単一分子レベルの蛍光観測に基づく超解像光学顕微手法は、光の回折限界（約 200 nm）をはるかに超える数 nm サイズの空間分解能を有するイメージング法として、微小物質の構造測定に広く利用されている。多くの超解像手法の中でも、単一分子の蛍光像の重心を数 nm の空間分解能で決定し超解像を得る方法（localization 法）は、微小物質の静的イメージングのみならず、ホスト媒体中の蛍光分子の拡散挙動等の分子ダイナミクス測定にも応用可能であり、単一分子の並進拡散の場合には、連続取得された蛍光像の重心位置の時間変化から、10 nm 以下の空間精度でその軌跡を得ることができる（図 1）。この手法は多数分子のアンサンブル測定では検出困難な空間位置を特定した拡散定数の決定や異常拡散領域（図 1 の最下図）の検出などから、ホスト環境の不均一構造を高い空間分解能で検出可能であり、架橋等の化学変化や aging など非晶質固体の slow dynamics 等の解明、光レジスト用材料等の高精度ナノメートル微細加工の評価などへの応用も期待されている。しかし直径 200nm 程度の回折限界サイズの複数の蛍光像が重なると localization 解析が不可能となるので、通常は蛍光 ON と OFF 状態をスイッチできる分子を用いて外部スイッチ光により ON - OFF 状態間制御を行い、希薄な蛍光 ON 状態分子濃度（ 10^{-10} M 程度）を保つ必要がある。また単一分子蛍光観測では非常に強い励起光強度（分子あたり数十万回/秒の励起）が必需であり、色素の光劣化も迅速に進行する。これらの結果、1 分子あたりの測定時間はせいぜい数分程度で、モニター可能な空間も限定されるため、長時間、広域空間の詳細な知見を得ることは困難であった。

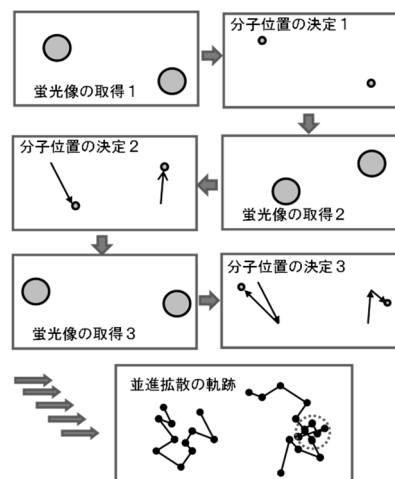


図 1. 単一蛍光分子の拡散挙動の測定法の概念図. 下図の は異常拡散の領域。

2. 研究の目的

分子集合体や高分子固体などの緩和や時間変化には数時間から数日以上にわたり進行するものも多く、これらの過程の詳細な知見の獲得には、高い光耐久性を持ちかつ ON-OFF スwitching 可能な蛍光物質を用いる必要がある。高耐久性有機色素開発は活発に研究が行われ、優れた特性を持つ分子も開発されているが、ON-OFF スwitching 可能で 1 分子として数分から数 10 分以上の計測が可能な例は申請者の知る限り存在しない。一方 10nm 程度の有機ナノ粒子には約 10^4 個以上の分子が存在し、単純に考えれば耐久性は 10^4 以上向上する。更に光吸収確率の増大により照射光強度も 10^4 倍弱くできるので光劣化につながる非線形過程が抑制でき、より高い耐久性が期待できる。そのためここ数年は蛍光スイッチ可能なナノ粒子開発が重要な課題と考えられている。このような背景の中、最近申請者らのグループは、可視域の単一波長照射下でも、粒子全体として蛍光の明滅（ON-OFF）挙動を示す有機ナノ粒子を見出した。本課題ではこの機構を解明すること、また、これに基づく有機ナノ粒子全体の蛍光 ON-OFF スwitching の新手法の開発と応用を行い、超解像追跡計測法の発展を目的とした。

3. 研究の方法

上記の可視域の単一波長照射下でナノ粒子全体の蛍光の ON-OFF 挙動を示す集合体は、開環体 (O, 蛍光 OFF) + $h\nu_1$ (UV) 閉環体 (C, 蛍光 ON) および閉環体 (C, ON) + $h\nu_2$ (可視光) (O, OFF) の環開閉光異性化反応による蛍光スitching 可能なジアリールエテン誘導体のみから構成され、分子レベルの開環反応 (C → O, ON → OFF) 収量は小さい ($\leq 10^{-5}$)。本研究の開始段階までの結果からは、以下のような機構が仮説として考えられた。(1) 開環体の微小な吸収の裾 (Urbach tail) を介した光吸収により開環反応 (O → C) が進行する、(2) ON 状態分子 (C) が隣接し多量体程度の会合体が形成された場合、単量体では蛍光が ON 状態であるにもかかわらず、会合体では著しく弱蛍光性となる、(3) この多量体が励起移動のトラップとなり、粒子全体の蛍光が OFF となる、(4) これらの多量体の中で開環反応が進行し、たとえば C-C-C から C-O-C のように単量体となった場合、励起移動が進行せず粒子全体からの蛍光が ON になることが粒子全体で蛍光が OFF → ON へと変化する。

これらの過程を検討するために、

(1) 溶液中の定常吸収・蛍光スペクトルに対する濃度効果、温度効果かと会合数の決定、(2) ナノ粒子のアンサンブル系の時間分解蛍光測定による励起移動の解明、(3) 単一粒子からの発

光挙動に対する励起光強度(ON-OFF 時間間隔の測定)から、粒子の粒子全体の一波長蛍光 ON-OFF 機構を明らかにする。

4 . 研究成果

(1) 溶液中の定常吸収・蛍光スペクトルに対する濃度効果、温度効果かと会合数の決定

置換基の異なる蛍光 ON-OFF スイッチ可能な 3 種のジアリールエテン誘導体を用い、メチルシクロヘキサン - イソペンタン混合溶液中で、室温から 77 K までの定常吸収、蛍光スペクトルに対する濃度変化、温度変化を測定した。その結果、温度の低下とともに、閉環体 (C) の吸収、蛍光スペクトルが長波長にシフトする挙動が観測された。これらのスペクトル変化を解析した結果、室温では主に単量体として存在するが、230 K 程度から 2 量体が主成分となり、更に温度が低下すると (あるいは濃度が高くなると) 3 量体が生成することが判明した。これらの、2 量体や 3 量体、あるいは結晶系のスペクトルを基に Kasha の励起子理論からから見積もると、ナノ粒子の微弱な発光は主に 3 - 4 量体に対応する会合体が起因していることが判明した。

置換基を変えた 3 種類の分子の会合挙動からは、分子の長軸の長い系では会合の平衡定数が大きい結果が得られた。長波長へのスペクトルシフトが観測されることから、J-タイプの会合体生成が考えられるが、このような置換基を含む相互作用が会合体生成に重要な役割を果たしていると考えられる結果が得られた。

(2) ナノ粒子のアンサンブル系の時間分解蛍光測定による励起移動の解明

組成 (O と C) ナノ粒子を水に分散させた条件で、主に C の励起に対応する可視光を励起光として時間分解蛍光スペクトルを測定した。その結果、C の組成が非常に小さい (0.5%) 場合には、モノマーの C からの蛍光が観測され、そのスペクトルは時間とともに変化せず、減衰挙動もほぼ単一指数関数で再現できた。一方 10% 程度 C を含むナノ粒子では、励起直後はモノマーの C からの発光が観測されるが 100 ps からナノ秒の時間領域で、蛍光スペクトルは長波長にシフトした。これは、主に多量体への励起移動が効率的に進行していることを支持する。

更に、閉環体 (O) からなるナノ粒子に対して UV 高を照射し、C の組成の増大 (C の吸収) と蛍光の変化を測定した結果、閉環体組成が 8% 程度までは、C (モノマー) の蛍光は増加するが、その後は C の増加とともに蛍光は減少した。これは、C の増加とともに会合体が増加すること、効率的な励起移動とトラップによる消光が進行することを示す。

(3) 単一粒子からの発光挙動に対する励起光強度 (ON-OFF 時間間隔の測定)

単一ナノ粒子からの発光時間 (On-time) に対して、可視 532 nm の励起光強度依存性を測定した結果、5.9 秒 (励起光強度 1.1 mW) 、 2.6 秒 (励起光強度 4.3 mW) 、 2.4 秒 (励起光強度 8.1 mW) と励起光強度の増加とともに短くなった。単純に、単一分子の光励起による開環反応 (C → O) が ON-time を決めているのであれば、この ON-time は励起光強度の逆数に比例する (開環反応収率が一定の場合) が、単一ナノ粒子では、このような挙動は観測できなかったのは、励起光強度の増大とともに Urbach tail の励起による会合体生成、また、会合体の消失などの複合した過程が ON-time を決定していることによると考えられる。これらの効果を考慮した解析から、励起光強度が弱いときは、主に会合体生成 (による励起移動による消光) 強い場合には、発光 C 状態 (モノマー) の開環反応の進行が On-time を決定していると考えられる結果が得られた。

上記の結果から、可視一波長励起による単一粒子の粒子全体の蛍光 ON-OFF 挙動の機構として、当初予測された

開環体の微小な吸収の裾 (Urbach tail) を介した光吸収により閉環反応 (O → C) が進行

ON 状態分子 (C) が隣接し多量体程度の会合体が形成された場合、単量体では蛍光が ON 状態であるにもかかわらず、会合体では著しく弱蛍光性となる、

この多量体が励起移動のトラップとなり、粒子全体の蛍光が OFF となる、

これらの多量体の中で開環反応が進行し、たとえば C-C-C から C-O-C のように単量体となった場合、励起移動が進行せず粒子全体からの蛍光が ON になることが粒子全体で蛍光が OFF ON へと変化する

の過程で基本的には進行することが明らかとなった。

今後は、各過程を詳細に検討することでこれらの機構を支配する因子 (集合体系の開環・開環反応速度などの分子レベルの特性など) を解明するとともに、実際の超解像測定系への応用を開発する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito Syoji, Hiratsuka Kengo, Takei Satoshi, Nishi Hiroyasu, Kitagawa Daichi, Kobatake Seiya, Miyasaka Hiroshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Spatial distribution of single guest molecules along thickness of thin films of poly(2-hydroxyethyl acrylate)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Photochemical & Photobiological Sciences	6. 最初と最後の頁 175 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43630-021-00147-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Syoji, Funaoka Misato, Hanasaki Itsuo, Takei Satoshi, Morimoto Masakazu, Irie Masahiro, Miyasaka Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Visualization of the microstructure and the position-dependent diffusion coefficient in a blended polymer solid using photo-activation localization microscopy combined with single-molecule tracking based on one-color fluorescence-switching of diarylethene	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Polymer Chemistry	6. 最初と最後の頁 736 ~ 740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1PY01100F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto Kohei, Kitagawa Daichi, Sotome Hikaru, Ito Syoji, Miyasaka Hiroshi, Kobatake Seiya	4. 巻 61
2. 論文標題 Edge to Center Propagation of Photochemical Reaction during Single Crystal to Single Crystal Photomechanical Transformation of 2,5-Distyrylpyrazine Crystals**	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 e202212290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202212290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 武井 佑実, 伊都 将司, 五月女 光, 森本 正和, 入江 正浩, 宮坂 博
2. 発表標題 単一波長可視光照射による蛍光性ジアリールエテンナノ粒子の発光スイッチング
3. 学会等名 2021光化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相川 みちる, 船岡 美里, 伊都 将司, 森本 正和, 入江 正浩, 宮坂 博
2. 発表標題 蛍光性ジアリールエテン誘導体の一長波長蛍光スイッチング特性: 励起条件とホストマトリクス依存性
3. 学会等名 2021光化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroshi Miyasaka
2. 発表標題 Ultrafast Multiphoton Spectroscopy of Higher Excited States
3. 学会等名 28th IUPAC Symposium on Photochemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsukimi Iteya, Syoji Ito, Hikaru Sotome, Daichi Kitagawa, Seiya Kobatake, Hiroshi Miyasaka
2. 発表標題 Single-Particle Emission of Perylenediimide Nanoparticles
3. 学会等名 28th IUPAC Symposium on Photochemistry (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirotaka Kageyama, Syoji Ito, Hikaru Sotome, Daichi Kitagawa, Michel Sliwa, Hiroshi Miyasaka
2. 発表標題 Super-Resolved Measurement of Excitation Energy Transfer
3. 学会等名 28th IUPAC Symposium on Photochemistry (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hikaru Sotome, Daichi Kitagawa, Shota Hamatani, Seiya Kobatake, Hiroshi Miyasaka
2. 発表標題 Photocyclization Reaction Dynamics of Inverse Diarylethenes
3. 学会等名 28th IUPAC Symposium on Photochemistry (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi Miyasaka
2. 発表標題 Photochemical Processes in Higher Excited States Produced by Multiphoton Absorption and Multiple Excitation in the Condensed Phase
3. 学会等名 VII Iberian Photochemistry Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 射手矢 つきみ, 蔭山 浩崇, Ali Eftekhari, Aude Bouchet, Michel Sliwa, 濱谷 将太, 北川 大地, 小島 誠也, 五月女 光, 伊都 将司, 宮坂 博
2. 発表標題 ペリレンジイミド誘導体の単一ナノ粒子発光挙動
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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			
フランス	Lille University			