

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月20日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23655113

研究課題名（和文） 蛍光円二色性の和周波選択的検出

研究課題名（英文） A study for the sum-frequency-selected-detection of circular polarized luminescence

研究代表者

荒木 保幸 (ARAKI YASUYUKI)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：80361179

研究成果の概要（和文）：キラル物質の蛍光円二色性（circular polarized luminescence, CPL）に関して、本研究では CPL の新規検出法として、蛍光和周波検出法を応用することを試みた。まず、本研究で用いる CPL を示すキラルなペリレンジイミド 2 量体を新規に合成した。この試料を用いた和周波選択的な CPL の測定原理について、今後の研究展開のための基礎的な知見を得ることができ、また、これに付随して、フォトンカウンティング法を用いた CPL の新たな測定手法についても知見を得る事ができた。今回の研究成果をもとに、CPL 測定について新たな視点からの研究の発展が可能となった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to establish a new detection method of circular polarized luminescence (CPL), and the application of fluorescence sum frequency detection method. At first, a newly synthesized chiral perylene diimide dimer indicating the CPL for the purpose of this study. We have performed a sum frequency selective CPL detection and obtained the basic knowledge for the study future development. Moreover, using the photon counting method with a streak scope, we were able to get the CPL spectra and their decays simultaneously. Based on the research results of this time, it has become possible to development of research from a new perspective about the CPL measurement.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・機能物質科学

キーワード：蛍光円二色性

1. 研究開始当初の背景

光学活性な化合物が吸収スペクトルに対応した円二色性 (Circular dichroism, CD) を、蛍光スペクトルに対応した蛍光円二色性 (circular polarized luminescence, CPL) を示すことが知られている。CD は、キラリティが本質的な生体分子の検出同定法として広く用いられているが、CPL に関しては測定手法の煩雑さ、市販されている機械が高価であるなど、その有用性に対して、広く普及するとは言えない。しかしながら、昨今、GFP

に代表されるような蛍光タンパク質など、本質的に CPL を発する生体分子が細胞内現象のマーカーとして広く使われるようになり、蛍光検出を基盤とした CPL 検出法は、複雑なタンパク質間相互作用の検出とその理解に多大な貢献をするものと考えられる。本申請では、CPL の新規検出法として、蛍光和周波検出法を応用し、それを生体機能分子検出とその理解へ応用することを試みる。

2. 研究の目的

生体関連物質は、生体内で極微量存在するも

が多く、生体内、試験管内どちらの実験においても、極少量の試料を取り扱うことが要求されることがある。その場合、生体関連物質のキラリティを検出するには、より高感度な蛍光測定ベースの蛍光円二色性 (CPL) を検出することが有利であろう。蛍光ベースの検出は現在、単一分子レベルまでの高感度化を達成することができるため、CPL を単一分子レベルで捉えることも原理的には夢ではなく、実際、そのような先駆的研究例[1]が報告されている。この例は、CPL を発するヘリセン類縁体を顕微鏡下、単一分子レベルで測定し、単一分子での CPL が非常に大きい左右円偏光差を発生している事を報告している。

しかしながら、この先駆的研究例には、致命的な欠点がある可能性があるとの反論も上がっている。この反論によると、顕微鏡下での CPL は、顕微鏡内部のミラーおよびレンズで左右円偏光差が完全に消失してしまい、おそらく、先の研究例にみられた大きな左右円偏光差は、機器の偏光特性由来のアーティファクトであるというものであった。現在、どちらが正しいのか、明確な回答は得られていないが、国内学会では、後者を支持する研究例、つまり顕微鏡下での偏光測定には、ときには信号を遥かに凌駕するアーティファクトがつきまとうという報告例がある。ここで、本質的な問題は、円偏光を円偏光としてそのまま透過、反射することは実験的に困難さをともなうという認識をすることによって、円偏光した光を光検出器に導入するまでに、左右円偏光差の情報を他の物理量へ変換してしまえば良いという着想が生まれた。CPL のもつ左右円偏光成分の偏りを、蛍光和周波分光法の手法をもって、和周波の強度差へと変換しうることを実証する。また、その実証の後、単一分子レベルの極微量サンプルへの適応可能性を探る。本申請は、生体関連物質の研究に必然的な「キラリティ」と「蛍光」を結びつける CPL 検出法を 21 世紀における新規な装置、手法により新たに見直すことによって、さらに使い勝手がよく、アーティファクトフリーな手法へと導くものである。また、本申請は、主に高速分光法の手段である蛍光和周波発生技術を利用した CPL 検出法であり、物理化学的なインパクトも期待される。すなわち、本手法は、物理、生物、そして化学を含めた融合領域の普遍的ツールとして認知されると考えられる。

3. 研究の方法

本申請は、これまで有用性がありつつも、測定手法の困難さから広く用いられることが無かった CPL に関して、新規な検出法を提案するものである。基本的には、これまで高速分光法の一つである蛍光和周波検出法 (蛍光アップコンバージョン法) の原理を用い、

和周波発生に用いるゲート光を円偏光とすると、CPL とゲート光との和周波光が、CPL の左右円偏光に応じて強度差を生じ、それを検出することで、CPL を高選択的に検出する手法となっている。CPL の正確な検出をさまたげているのは、CPL を光検出器に導入するまでに必要不可欠な光学素子 (ミラー、レンズ等) が、左右円偏光の偏りを減少させてしまうことに他ならない。本申請で実証されるであろう、円偏光の偏光度を光強度差に変換することは非常に重要で、偏光子を用いた通常の CPL 検出とはことなり、様々なオプティクスから発生する偏光の歪み、つまりアーティファクトを原理的に生じない手法だと考えられる。

次の非線形相互作用を通じた和周波発生機構について、円偏光を加味した場合、どのようになるか概略を示す。[3]

まず、非線形項を考慮した電場の波動方程式は次の様に書く事ができる。

$$\nabla^2 E - \epsilon \mu_0 \frac{\partial^2 E}{\partial t^2} = \epsilon \mu_0 \chi^{(2)} \frac{\partial^2 E}{\partial t^2} \quad (1)$$

ここで、 ϵ は媒質中の誘電率、 μ_0 は媒質の透磁率、 $\chi^{(2)}$ は 2 次の非線形感受率、 E は光の電場である。

この非線形媒質中の z 方向に伝搬する円偏光の相互作用について以下に述べる。

まず、3 つの円偏光を次のように書く。

$$E_i(z, t) = \bar{E}_{ix} \exp(ik_i z - i\omega_i t) + c.c + \bar{E}_{iy} \exp\left(ik_i z - i\omega_i t \pm \frac{\pi}{2}\right) + c.c \quad i = 1, 2 \quad (2-1)$$

$$E_3(z, t) = \bar{E}_{3x} \exp(ik_3 z - i\omega_3 t) + c.c + \bar{E}_{3y} \exp(ik_3 z - i\omega_3 t + \delta) + c.c \quad (2-2)$$

ここで、 E_{ix} , E_{iy} は、電場 i の x 成分、 y 成分を表わす。(2-1) 式は、 x 成分に比較し、 y 成分の位相差が $\pi/2$ の場合、右円偏光、 y 成分の位相差が $-\pi/2$ の場合、左円偏光を表す。式 (2-1, 2-2) の 3 つの円偏光の和

$$E(z, t) = E_1(z, t) + E_2(z, t) + E_3(z, t) \quad (3)$$

を、式 (1) に代入する。 $\omega_3 = \omega_1 + \omega_2$ の条件を満たすような関係があると仮定し、 E_3 , ω_3 についての成分を検討すると、

$$ik_3 \frac{\partial E_3}{\partial z} \propto (-\omega_3^2) \epsilon_0 \mu_0 \chi^{(2)} E_{1x}^* E_{2x} \exp(i(k_3 - k_2 - k_1)z) \exp(\delta) + (-\omega_3^2) \epsilon_0 \mu_0 \chi^{(2)} E_{1y}^* E_{2y} \exp(i(k_3 - k_2 - k_1)z) \exp\left(+\frac{\pi}{2} + \delta\right) \quad (4-1, E1, E2 がともに右円偏光)$$

もしくは、

$$ik_3 \frac{\partial E_3}{\partial z} \propto (-\omega_3^2) \epsilon_0 \mu_0 \chi^{(2)} E_{1x}^* E_{2x} \exp(i(k_3 - k_2 - k_1)z) \exp(\delta) + (-\omega_3^2) \epsilon_0 \mu_0 \chi^{(2)} E_{1y}^* E_{2y} \exp(i(k_3 - k_2 - k_1)z) \exp\left(-\frac{\pi}{2} + \delta\right) \quad (4-2, E1 右円偏光, E2 左円偏光)$$

となる。ここで、 κ_1, ω_1 を和周波発生用のゲート光、 κ_2, ω_2 をCPL、 κ_3, ω_3 を和周波と考える。式(4-1、4-2)下線部は、E3の強度がゲート光の円偏光に対して強度変調する項であり、ゲート項の偏光と和周波の偏光度に依存して異なっていることが分かる。すなわち、ゲート光の偏光度が分かっていると、蛍光アップコンバージョン法により、CPLの偏光度を、和周波の偏光強度変化から判定できることを意味している。

4. 研究成果

現有設備である、フェムト秒レーザーを用いた、蛍光和周波分光装置の概略を示す。

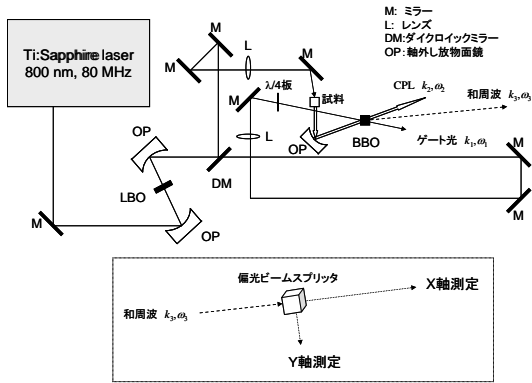


図1 蛍光和周波分光装置の概略

式(4-1、4-2)におけるx軸y軸についてであるが、この軸は、実験系において、仮にx軸をTi:Sapphireレーザーの発振偏光面とし、x軸とレーザーの進行方向(z軸)両方に垂直にy軸をとるものとする。Ti:Sapphireレーザーを円偏光とするには、その発信波長に適した $\lambda/4$ 板を使用し、そのfast axisと、x軸とのなす角度を $\pi/4$ もしくは $-\pi/4$ とする。式(4)が示すところでは、通常の蛍光和周波法の実験レイアウトで、用いるゲート光(κ_1, ω_1)とCPL間で位相整合条件を整えた後に発生する和周波を、x軸、y軸で独立に観測すると、その強度差から、CPLが右円偏光もしくは左円偏光であるかが判断される。構築した蛍光和周波測定セットアップを用いて、(±)-カンファーキノンの蛍光円二色性の和周波選択的検出を試みたところ、ほとんど和周波が発生しないという、研究当初より想定されていた問題に突き当たった。ゲート光を円偏光にする場合は、円偏光に含まれる直線偏光成分が実際のゲート光として作用すると考えられ、そのためゲート光の強度不足が最大の問題点となると予測されていたが、現有設備のfsレーザーでは、その困難を克服することができなかった。また、サンプルとして用いた、(±)-カンファーキノンの示すCPLの異方性が小さく、かつ長時間の積算に伴う、レーザー照射由来のダメージが無視できないことにも起因していると考え、比較的大きなCPLを示し、かつ、耐光性

に優れた標準サンプルの調整が必要不可欠と考えたため、図2のようなペリレンジイミド2量体の設計、合成を行った。図3には、これらが示す吸収及びCDスペクトルを示す。ペリレン由来の吸収スペクトルに明瞭なCDが観測された。また、ペリレンの耐光性をそのまま有しており、24時間以上のレーザー照射にも十分に耐えることができた。

次に、フォトンカウンティング法による内部標準に自身の蛍光を用いることによる新たなCPL測定実験を行った。フォトンカウンティング法は、光量の絶対値を測定することが困難なため、CPLの測定にはそのまま用い

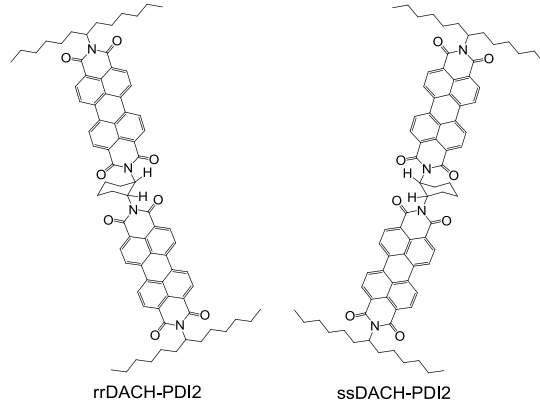


図2 ペリレンジイミド2量体

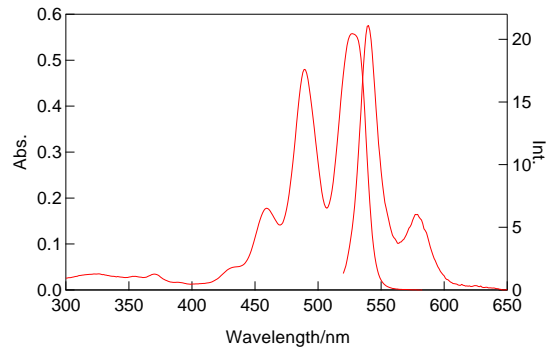


図3 rrDACH-PDI2の吸収及び蛍光スペクトル

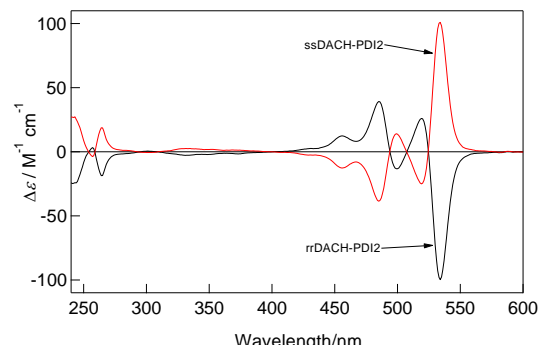


図4 rrDACH-PDI2, ssDACH-PDI2のCDスペクトル

る事ができない。今回、ペリレンの発光の長波長、具体的には、660nm-680nmのエリアで、右円偏光蛍光(I_R)、左円偏光蛍光(I_L)を規格

化することにより、それ以外での波長領域での CPL を次式

$$\Delta I = I_L - I_R \quad (5-1)$$

またその異方性因子を

$$g_{em} = (I_L - I_R) / (I_L + I_R) \quad (5-2)$$

により計算する。

右円偏光蛍光、左円偏光蛍光成分の測定には、サンプル直後に $\lambda/4$ 板を挿入し、その直後に直線偏光子を挿入することで、左右円偏光成分を直線偏光の強度として観測した。

結果、図5に示すCPLスペクトルが観測できた。また、今回用いた計測器は蛍光寿命測

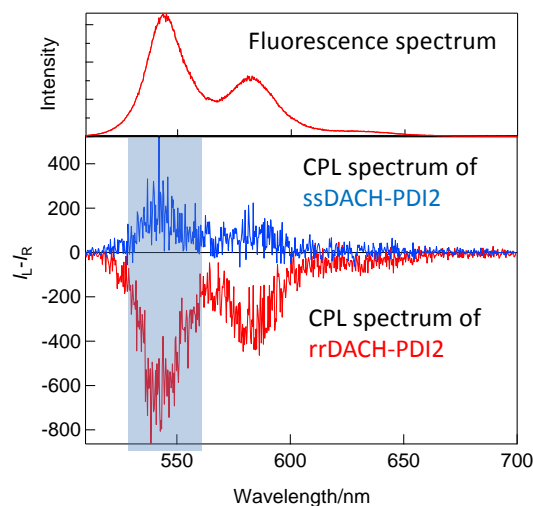


図5 rrDACH-PDI2, ssDACH-PDI2 のCPL スペクトル

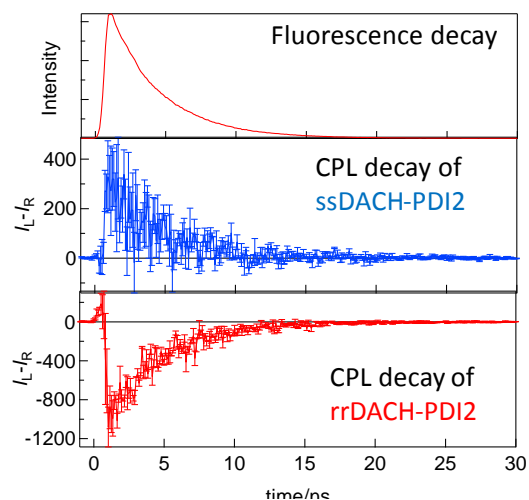


図6 rrDACH-PDI2, ssDACH-PDI2 のCPLの時間変化

定にも対応しているため、今回の測定をもとにCPLの時間変化をも検討することが可能となった。

CPLの時間変化を図6に示す。CPLの時間変化は、蛍光減衰と測定誤差の範囲で一致しており、このことは、今回測定したペリレンジイミド2量体が光励起状態で一つのコンフォメーションを取り続けていることを示し

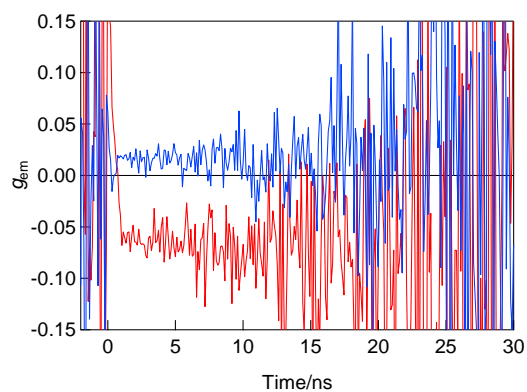


図7 g_{em} の時間変化

ている。

次に、異方性因子 (g_{em}) の時間変化について検討した (図7)。 g_{em} は、時間変化を示さず観測時間内で一定値を取ることが明らかとなり、このことは、ペリレンジイミド2量体の光励起状態でのコンフォメーション変化に乏しいことを直接的に表していると考えている。

以上、本研究では、キラルなクロモフォアからのCPL検出に向けて、蛍光和周波測定および光子カウンティング法で得られたCPL測定法について知見を得る事ができたとともに、耐光性に優れ、構造安定性を有する、CPL測定の実証実験に適したキラルなペリレンジイミド2量体の合成に成功した。

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3件)

1. Murakami, M.; Araki, Y.; Sakamoto, S.; Hamada, Y.; Wada, T.,

Remarkable Enhancement of Sensitivity with the Second Generation of Elliptically Polarization-detected Circular Dichroism Spectroscopy, *Chem. Lett.* **2013**, *42*, 261-262.

<http://dx.doi.org/10.1246/cl.2013.261>

査読有

2. Kuramochi, Y.; Satake, A.; Sandanayaka, A. S. D.; Araki, Y.; Ito, O.; Kobuke, Y.

Fullerene- and Pyromellitimide-Appended Tripodal Ligands Embedded in Light-Harvesting Porphyrin Macrorings

Inorg. Chem., **2011**, *50*, 10249-10258.

DOI: 10.1021/ic201250q

査読有

3. Fukuzumi, S.; Saito, K.; Ohkubo, K.; Khoury, T.; Kashiwagi, Y.; Absalom, M. A.; Gadde, S.; D'Souza, F.; Araki, Y.

Ito, O. ; Crossley, M. J.
Multiple photosynthetic reaction centres
composed of supramolecular assemblies of
zinc porphyrin dendrimers with a fullerene
acceptor
Chem. Commun., **2011**, *47*, 7980-7982.
DOI: 10.1039/C1CC11725D
査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. 荒木保幸, 村上 慎, 坂本清志, 和田健彦
内部標準を用いたキラルなペリレンジイミ
ドの蛍光円二色性測定とその時間分解測定
への応用

日本化学会第 9 3 春季年会
2013 年 03 月 22 日～2013 年 03 月 25 日
滋賀県草津市

2. Y.Araki, M.Murakami, R.Uematsu,
Y.Hamada, S.Sakamoto, T.Wada

Photophysical and Photochemical Behavior
of Chiral Peryleneimide Dimer Studied
by Time-resolved Circular Polarized
Spectroscopy

7th Asian Photochemistry Conference 2012
2012 年 11 月 12 日～2012 年 11 月 15 日
Osaka, Japan

3. 荒木保幸, 村上 慎, 濱田芳生, 上松亮平,
坂本清志, 和田健彦

キラルなペリレンジイミド二量体の光励起
挙動

2012 年光化学討論会
2012 年 09 月 12 日～2012 年 09 月 14 日
東京

4. Araki, Y.; Murakami, M.; Hamada, Y.;
Sakamoto, S.; Wada, T.

Ellipticity-change-detected CD apparatus
toward the application to the DNA/RNA
conformational change

The 38th International Symposium on Nucleic
Acid Chemistry
Nov. 9~11, 2011
Sapporo, Japan

5. 荒木保幸・村上慎・濱田芳生・坂本清志・
和田健彦

円二色性の高感度検出へ向けた楕円率変化
検出型円二色性測定法

2011 年光化学討論会
平成 23 年 9 月 6 日 (火) ～8 日 (木)
宮崎

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 保幸 (ARAKI YASUYUKI)
東北大学・多元物質科学研究所・助教
研究者番号：80361179

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：