

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23655009

研究課題名(和文)レドックス応答蛍光プローブを用いた生体触媒活性のナノイメージング

研究課題名(英文)Nanoscale imaging of biocatalytic activity with redox-responsive fluorescent probes

研究代表者

立川 貴士(Tachikawa, Takashi)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：20432437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：生体酵素や無機ナノ粒子のようなナノサイズの触媒は、化学合成やエネルギー生成において多くの応用可能性を秘めている。本研究では、たった一つの触媒上における分子の吸着挙動や界面反応の観測に応用できる水溶性蛍光プローブを開発した。水溶性を高めるためのスルホン酸と反応部位であるジニトロフェニル基を持つ還元応答型蛍光プローブを用いて、単一触媒ナノ粒子上での光誘起電子移動反応の単一分子蛍光観察に成功した。さらに、カテコールを修飾したBODIPY蛍光色素を用いて、金属酸化物表面における吸着サイトの位置を光の回折限界を超える空間分解能で特定した。

研究成果の概要(英文)：Nano-sized catalysts such as enzymes and inorganic nanoparticles have both potential and demonstrated applications for use in (bio)chemical synthesis and energy production. In this study, we developed new fluorescence probes for molecular adsorption and interfacial electron transfer reactions on individual nanocatalysts. The synthesized BODIPY-based fluorescence probes, which have one or two sulfonate groups and a dinitrophenyl group as a redox reaction site, were used to investigate the photoinduced electron transfer reactions over catalysts at the single-particle, single-molecule levels. We also applied single-molecule-based super-resolution fluorescence microscopy with catechol-modified BODIPY to identify the locations of effective adsorption sites on metal oxide surfaces.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：蛍光イメージング 単一分子 触媒

### 1. 研究開始当初の背景

生体触媒として機能する微生物酵素を用いた化学反応は、反応条件が室温付近で温和であること、基質特異性が厳密なため反応生成物が選択的に得られること、反応の立体特異性があること、などの利点を持つことから、近年、環境負荷の低い触媒として様々な応用が期待されている。一方、酵素の活性部位構造や立体構造、触媒反応機構を明らかにするため、X線結晶解析法や分子分光法などによって、これまで多くの基礎的研究が為されてきた。例えば、2006年、Xieらは、生細胞中での酵素活性の単一分子蛍光観察に初めて成功した。しかしながら、これまで検討されてきた酵素の種類は非常に限られており、また、生体内で触媒活性を示す酵素の空間分布を数百ナノメートル以下の空間分解能で明らかにした例は報告されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、生体酵素触媒への応用展開を目指した単一分子および単一ナノ粒子レベルでの触媒反応観測法の確立を目的とした。特に、光の回折限界を超える超解像蛍光イメージング法を用いて、触媒活性サイトの空間分布をその場観測を行う。

### 3. 研究の方法

以前に我々は、単一分子観察に適応可能な還元応答型蛍光プローブである3,4-dinitrophenyl-BODIPY (DN-BODIPY)を開発した(図1)。DN-BODIPYは2つのニトロ基の強い電子吸引性により、BODIPYフルオロフォアからの蛍光が分子内電子移動によって消光されているため、蛍光を示さない。一方、DN-BODIPYの還元生成物であるHN-BODIPYでは、ニトロ基の1つが電子供与基であるヒドロキシルアミノ基になることで電子的効果が打ち消されるため、BODIPYフルオロフォアは強い蛍光を示すようになる。そのため、DN-BODIPYは代表的な光触媒であるTiO<sub>2</sub>へのUV照射によって生成した電子によって還元され、強蛍光性のHN-BODIPYを与える。

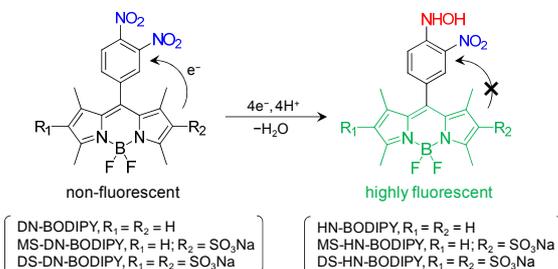


図1. 水溶性 DN-BODIPY の還元反応スキーム

酸素雰囲気下で実験を行うことにより、TiO<sub>2</sub>へのUV照射によって生成した電子が酸素に捕捉されることがなく、また同時に生成する正孔は添加したメタノールによって捕捉されるので、効率的にDN-BODIPYの還元反応が起こる。還元生成物であるHN-BODIPYか

らの蛍光を観測することによって、光触媒還元反応の進行を知ることができる。一方、DN-BODIPYは水への溶解度が非常に低いため、TiO<sub>2</sub>光触媒反応の研究への利用を考えた場合、水溶性の向上とTiO<sub>2</sub>活性の検出感度の向上が課題であった。本研究では、これらの課題をスルホン化によって克服することに成功した。

DN-BODIPYの合成は既報に従って行った。新規化合物であるDS-DN-BODIPYおよびMS-DN-BODIPYの合成は既報に従って行った。合成した化合物の構造は、NMRスペクトルおよび質量分析スペクトルによって決定した。

また、金属酸化物結晶における分子吸着サイトの空間分布を調べるため、蛍光プローブであるカテコール修飾BODIPY (CA-BODIPY)を既報に従って合成した。CA-BODIPYはTiO<sub>2</sub>などの金属酸化物に化学吸着することで、カテコール部位の電子状態が変化し、分子内電子移動による蛍光消光が抑制され、強い蛍光を発するようになる。したがって、吸着したCA-BODIPYの単一分子蛍光を空間解析することで、分子吸着サイトを光の回折限界を超える空間分解能で決定することができる。期待される。

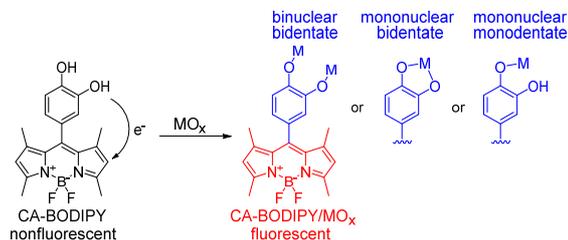


図2. 金属酸化物結晶へのCA-BODIPYの吸着様式と蛍光状態の変化

### 4. 研究成果

基質である蛍光プローブと生成物の吸収および蛍光スペクトルを測定した。MS-DN-BODIPYとDS-DN-BODIPYは、MeOH-pH 2 H<sub>2</sub>O (9:1)混合溶媒中、それぞれ508 nmと513 nmに吸収ピークを示すが、これらが還元反応によってMS-HN-BODIPYとDS-HN-BODIPYに変化すると、吸収ピーク位置はそれぞれ502 nmと504 nmに短波長シフトすることが明らかとなった。蛍光スペクトルも同様に、還元反応前のMS-DN-BODIPYとDS-DN-BODIPYでは、それぞれ527 nmと530 nmであったピーク位置が、還元後はそれぞれ515 nmと522 nmに短波長シフトした。

DS-DN-BODIPYとMS-DN-BODIPYがそれぞれDS-HN-BODIPYとMS-HN-BODIPYに還元されると、蛍光寿命と蛍光量子収率が顕著な増加を示すことがわかった。また、MeOH-pH 2 H<sub>2</sub>O (9:1)混合溶媒中におけるDS-HN-BODIPYとMS-HN-BODIPYの蛍光寿命は、HN-BODIPYよりも若干短いことがわかった。DN-BODIPYとHN-BODIPYに関しては、水への溶解度が50 nM以下と低く、測定することができなかった。

DS-DN-BODIPYの存在下、TiO<sub>2</sub>にUV光を照

射することで約 520 nm に極大を有する蛍光スペクトルが観測された。蛍光強度が最大値の半分の値を取るまでに要した UV 照射時間は、DS-DN-BODIPY が約 20 秒、MS-DN-BODIPY が約 60 秒、DN-BODIPY が約 600 秒であり、スルホ基の導入によって反応速度が著しく増加した。DS-DN-BODIPY でより顕著な反応速度の増大がみられたことから、水溶性 DN-BODIPY はスルホ基の負電荷によって正電荷を帯びた  $\text{TiO}_2$  表面に吸着していることが示唆された。

DS-DN-BODIPY を含むアルゴン飽和メタノール水溶液中、単一  $\text{TiO}_2$  粒子への UV 照射により、 $\text{TiO}_2$  上で非常に強い蛍光が観測された。コントロール実験および蛍光寿命・スペクトル測定から、この蛍光は還元生成物である DS-HN-BODIPY に由来することがわかった。UV 照射下における蛍光強度は、DS-DN-BODIPY > MS-DN-BODIPY >> DN-BODIPY であり、バルク系の実験結果ともよく一致する。特に、DS-DN-BODIPY では 10 nM という非常に低い濃度でも  $\text{TiO}_2$  ナノ粒子の活性を単一粒子レベルで観測することができた。DN-BODIPY では単一  $\text{TiO}_2$  粒子の活性を観測するために 1  $\mu\text{M}$  以上の濃度が必要であったことから、DS-DN-BODIPY は DN-BODIPY と比べて、単一分子観察における検出感度が 2 桁以上増加したことがわかる。蛍光強度の DS-DN-BODIPY 濃度依存性を Langmuir 吸着モデルに基づいて解析すると、見かけの会合定数は粒子によって異なり、 $10^6 \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$  であることがわかった。

10 nM の DS-DN-BODIPY を含むアルゴン飽和メタノール水溶液中、単一  $\text{TiO}_2$  粒子への光照射によって観測された蛍光強度は非常に大きく揺らいであり、確率的に生じる個々の蛍光バーストが DS-HN-BODIPY 1 分子に対応している (図 3A)。単一分子蛍光輝点を二次元ガウス関数によってフィッティングすることで、約 10 nm の空間分解能で反応サイトを特定することができた。単一の  $\text{TiO}_2$  ナノ粒子で観測された蛍光輝点位置の空間分布を図 2B に示す。同一ナノ粒子について得られた電界放射型走査電子顕微鏡 (FESEM) 像との比較から、 $\text{TiO}_2$  では粒子全体でほぼ均一に反応が起こることがわかる。一方、Au/ $\text{TiO}_2$  ナノ粒

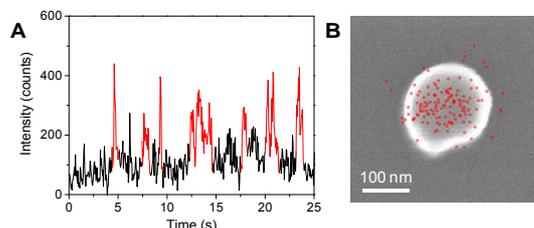


図 3. (A) DS-DN-BODIPY について観測された蛍光強度のトラジェクトリー．赤色は DS-HN-BODIPY の生成による蛍光バーストを示している．(B) 単一の  $\text{TiO}_2$  ナノ粒子で観測された蛍光輝点の空間分布．背景は蛍光観察を行ったナノ粒子の FESEM 像．赤点は反応活性サイトの位置を示している．

子では、反応サイトが Au ナノ粒子近傍に局在化していることがわかった。さらに、溶媒効果や DS-DN-BODIPY 濃度依存性の実験から、還元反応は  $\text{TiO}_2$  上で起こっていることが示唆された。以上の結果は、Au ナノ粒子の有する表面プラズモンが  $\text{TiO}_2$  光触媒反応を促進することを裏付けるものであり、反応機構の解明や高機能光触媒の設計開発に大きく貢献すると期待される。

CA-BODIPY を含む水溶液中、マイクロメートルサイズの  $\text{TiO}_2$  結晶に 488 nm のレーザー光を照射することで、表面吸着した CA-BODIPY からの単一分子蛍光を観測した。蛍光輝点の位置を解析した結果、 $\{001\}$  面や  $\{100\}$  面と比べ、 $\{101\}$  面には多くの吸着サイトが存在していることがわかった。一般には、表面エネルギーの高い  $\{001\}$  面が最も吸着能が高いと予想されるため、実験結果を単純には説明できない。その要因として、溶媒である水分子の吸着様式の違いが考えられる。分光実験および理論計算による研究から、 $\{001\}$  面では水分子は解離的に吸着し、 $\{101\}$  面では分子的に吸着することが指摘されている。したがって、水分子との競争的吸着を考慮すると、CA-BODIPY は  $\{101\}$  面により吸着しやすいものと推測される。実際に、アセトニトリルのような非プロトン性溶媒中では、CA-BODIPY は  $\{101\}$  面と比べ、より  $\{001\}$  面に吸着しやすいことがわかった。この結果は、基質分子の吸着が溶媒分子の種類に大きく影響を受けることを示しており、各結晶面における反応性を議論する際には、反応環境の違いを十分に考慮する必要がある。

ナノメートルサイズの  $\text{TiO}_2$  結晶における分子吸着でも、マイクロ結晶と同様の結晶面依存性が観測されるのであろうか。本研究では、この課題に取り組むため、バルク結晶、マイクロ結晶、ナノ結晶における分子吸着挙動を CA-BODIPY を用いて調べた。

図 4 に  $\text{TiO}_2$  ナノロッドにおいて観測された吸着サイトの空間分布を示す。マイクロ結晶と異なり、 $\{101\}$  面と  $\{100\}$  面で吸着サイトの数に有意な差はみられなかった。これは、熱力学的に安定な結晶面固有の表面構造より、

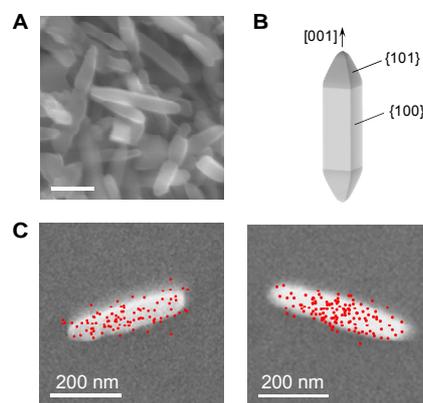


図 4. (A)  $\text{TiO}_2$  ナノロッドの FESEM 像 (A) と結晶構造 (B) . (C) 吸着サイトの空間分布 . C の背景は FESEM 像である .

むしろ酸素空隙のような格子欠陥が分子吸着に重要な役割を果たしていることを示唆している。ナノ結晶で観測された CA-BODIPY の吸着頻度は  $4 \sim 5 \text{ molecules } \mu\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  とマイクロ結晶 ( $0.02 \sim 0.1 \text{ molecules } \mu\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) より非常に大きい。また、清浄なルチル(110)面では、分子の吸着が非常に起こりにくく、吸着頻度は  $< 10^{-3} \text{ molecules } \mu\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  であった。以上の結果は、サイズの異なる結晶において反応効率の結晶面依存性を比較する場合、結晶表面の微視的な構造に留意しなければならないことを明確に示している。

#### 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9件)

T. Tachikawa, T. Ohsaka, Z. Bian, T. Majima, Single-Molecule Fluorescence Detection of Effective Adsorption Sites at the Metal Oxide-Solution Interface, *J. Phys. Chem. C*, **117**(21), 11219-11228 (2013). 査読有

DOI: 10.1021/jp402144h

T. Tachikawa, T. Yonezawa, T. Majima, Super-Resolution Mapping of Reactive Sites on Titania-Based Nanoparticles with Water-Soluble Fluorogenic Probes, *ACS Nano*, **7**(1), 263-275 (2013). 査読有

DOI: 10.1021/nn303964v

T. Tachikawa, T. Majima, Photocatalytic oxidation surfaces on anatase  $\text{TiO}_2$  crystal revealed by single-particle chemiluminescence imaging, *Chem. Commun.*, **48**(27), 3300-3302 (2012). 査読有

DOI: 10.1039/c2cc30597f

[学会発表](計6件)

立川 貴土、単一分子蛍光分光法による Au/ $\text{TiO}_2$ 複合ナノ粒子の光触媒活性評価、光化学討論会2013、2013年9月13日、愛媛大学・城北地区(愛媛県)

立川 貴土・Z. Bian・真嶋 哲朗、 $\text{TiO}_2$ メソ結晶における位置選択的光還元反応、日本化学会第93春季年会、2013年3月25日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県)

立川 貴土、Single-molecule fluorescence imaging of  $\text{TiO}_2$  photocatalytic reactions、日本化学会第93春季年会 アジア国際シンポジウム-光化学ディビジョン-、2013年3月24日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県)

[その他]

ホームページ

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mec/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

立川 貴土 (TACHIKAWA, Takashi)  
大阪大学・産業科学研究所・助教  
研究者番号: 20432437

##### (2)研究分担者

該当なし

##### (3)連携研究者

該当なし