

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K13949

研究課題名(和文) 超耐光性有機蛍光色素ライブラリーの創製

研究課題名(英文) Development of super-photostable fluorescent dye library

研究代表者

山口 茂弘 (Yamaguchi, Shigehiro)

名古屋大学・物質科学国際研究センター(WPI)・教授

研究者番号：60260618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：有機蛍光色素を用いたバイオイメージングの発展の鍵の一つは、蛍光色素の「耐光性」の向上にあり、本研究では、耐光性に優れた色素群の開発に取り組んだ。ラダー型有機リン 電子系を基本骨格とする蛍光色素を開発し、構造を強固にする架橋部位の耐光性に寄与する影響を明らかにした。合成に成功した色素を実際に超解像STED顕微鏡観察に用い、細胞小器官の繰り返しSTED観察が可能なことを示した。

研究成果の概要(英文)：In the current fluorescence imaging in biology, one of the key issues from the materials side is to improve photostability of organic fluorescent dyes. We have achieved the synthesis of highly photostable fluorescent molecules with ladder-type phosphorus-containing skeletons and elucidated the impact of the bridging moiety that makes the pi-skeleton rigid. With the photostable dye in hand, we have achieved the repeated observation of subcellular structures by super-resolution stimulated emission depletion (STED) microscopy.

研究分野：合成化学

キーワード： 共役化合物 蛍光イメージング 耐光性 リン 有機蛍光色素

1. 研究開始当初の背景

有機蛍光色素を用いたより精緻で高度な非侵襲バイオイメージングの実現は、生物学分野の基礎研究の発展だけでなく、先端的な医療や診断システムの開発にもつながる。この発展の障壁の一つとなってきたのが有機分子の“robustness”の問題である。その一例は、2014年ノーベル化学賞の対象となった超解像 STED (stimulated emission depletion) イメージングにも見ることができる。この顕微鏡技術は、従来の蛍光顕微鏡の限界をはるかに上回る空間分解能を可能にし、バイオイメージング分野にブレークスルーをもたらした。しかし、励起光とそれをドーナツ状に取り囲んだ STED 光という 2 種類の強いレーザーの照射を必要とするために、有機蛍光色素の褪色が激しく、繰り返し測定が困難など、実践的応用の観点でこの技術の本来の有用性を十分に引き出せていないのが現状である。現在最も広く用いられている耐光性に秀でているといわれている蛍光色素ですらその耐光性は十分ではない。蛍光色素に求められる種々の要素の中でも、この耐光性は STED イメージング技術を汎用的な手法として実用レベルに押し上げる上での最大のボトルネックとなっているが、有効な分子設計指針は未だ確立されていない。

2. 研究の目的

この問題に対して我々はこれまで、1) 電子求引性の典型元素置換基の導入による電子構造修飾と、2) ラダー型平面固定による構造強化の 2 つの分子設計をもとに取り組んできた。その一つとして、電子求引性の P=O 二重結合を導入した共役骨格をラダー型に平面固定化した化合物が、極めて高い耐光性をもつことを見いだした。本研究ではこの予備的成果を突破口に、構造-物性相関の解明をもとにした耐光性発現の鍵になる構造的要素の追究と、STED イメージングを格段に進歩させる有機蛍光色素ライブラリーの創出を目的とした。

バイオイメージングのための蛍光プローブの開発は、もちろんこれまで広範に研究されているが、その大半はローダミンやフルオロセインなどの代表的な基本骨格の修飾に焦点をあてたものである。これに対し、まったく新たな有機リン骨格で超耐光性という難関の物性の実現を目指す点が本研究のユニークさである。分子骨格を最適化し、抗体認識部位の導入などの官能基化を施し、すぐに実践的に使える形まで造り込むことにより、生物学者が数ある蛍光プローブの中でも第一に選択するような世界スタンダードな有機色素ライブラリーの開発できれば、今後の生物学研究の発展に極めて大きな貢献が為せるはずである。そのための基盤となる知見の集積に取り組んだ。

3. 研究の方法

我々が既に合成に成功している超耐光性とも形容できる特性をもつ化合物は、電子求引性の P=O 二重結合を含むベンゾホスホール *P*-オキシドを電子受容性部位に用い、電子供与性のトリフェニルアミン骨格を導入した骨格をもつ。これまでに、この骨格が、環境の極性に応答する蛍光プローブとして有用であることを脂肪細胞の分化過程の可視化により実証してきた[1,2]。さらにこの構造を、炭素架橋部位を用いてラダー型に平面固定化することにより、ほぼ完璧な耐光性を獲得できることを発見した[3]。合成した C-Naphox は、耐光性に優れているといわれる Atto 488 が 35%まで分解する強い光照射条件下においても、99%の初期蛍光強度を維持でき、実際の STED イメージングにおいても、50 回の繰り返し観察後も 83%以上の蛍光強度を保持できるという結果であった。そこで本研究では、この予備的成果を糸口に、耐光性色素骨格の構造-物性相関に解明を行うとともに、より生物学的応用が可能な形への造り込みを行った。

4. 研究成果

(1) 超耐光性に及ぼす構造的要因の解明：ケイ素架橋ベンゾホスホール色素の開発

上述の通りこれまでに、架橋構造により平面固定化したアミノ置換ベンゾ[*b*]ホスホール-*P*-オキシド誘導体 C-Naphox が、既存の蛍光色素と比較して圧倒的に高い耐光性をもつことを見出し、従来の色素では実現困難な STED 顕微鏡での繰り返し観察が可能となることを示している。この並外れた耐光性を実現するための分子設計指針についてさらなる知見を得るとともに、励起および発光波長のさらなるチューニングを行うことを目的とし、架橋部位に異なるかさ高さの置換基をもつ炭素およびケイ素架橋ベンゾホスホールオキシドを合成し、架橋部位が光学特性や耐光性に及ぼす効果について検討した。

ケイ素架橋体の合成は、アリアルアセチレン前駆体の分子内 *trans*-ハロホスフィン化反応と続くケイ素置換基の導入、そして Rh 触媒を用いた C-H/Si-H カップリング反応によって達成した。また、炭素架橋体で、架橋部位にメチル基を導入した化合物に関しても、これまでの合成法を修飾することにより初めて合成した。

得られた一連の化合物の物性を評価した結果、ケイ素架橋ベンゾホスホールオキシドでは、ケイ素の電子的効果により、約 30 nm 長波長側に吸収および蛍光を示すことに加え、架橋部位の置換基のかさ高さが超耐光性の実現に重要であることを明らかにした。すなわち、ケイ素架橋鎖をもつ場合でも、ケイ素上にメチル基を導入した場合には、耐光性が顕著に低下してしまうが、ケイ素上にフェニル基を導入することにより、十分な光安定性が得られるという結果である。

また、一連の炭素架橋体の合成も新たに達成し、ケイ素で見られた構造効果が当てはまることがわかった。すなわち、メチル基を導入した場合には、炭素架橋鎖であっても十分な対抗性は得られず、よりかさ高いフェニル基の導入が必須であるという結果である。

これらの知見は、超耐光性蛍光色素の分子設計に重要な指針を与えるものであり、特に、励起・発光波長の微調整も考慮すると、ケイ素架橋部位を導入するののも一つの有用な方法論になることを示す結果である。

(2) 環境応答性をもたない水溶性超耐光性色素の開発と 3D STED への展開

上述の C-Naphox の開発は、STED イメージングの繰り返し撮像を可能にすることから、3D STED イメージングへの応用が期待できる。しかし、実際の研究現場での応用の観点からは、C-Naphox にはいくつか改善すべき要素がある。一番の問題は、脂溶性の高さで、非特異吸着をおこしてしまう点である。また、蛍光を発する骨格がドナー・アクセプター型であるため、励起状態での分子内電荷移動性の高さ起因して、水中などの極性の高い媒体中では極度に長波長シフトした発光を示すものの、その量子収率は顕著に低下してしまうという問題がある。さらに、抗体修飾などを可能にする官能基がないという点も、この色素の利便性を下げる要因になっている。これらの問題点を克服し、汎用性の高い超耐光性蛍光プローブの開発に取り組んだ。種々の検討の結果、これらの問題点をすべて克服した第二世代の超耐光性ホスホール色素の開発に成功した。

この構造修飾の鍵は、C-Naphox で重要な役割を担っていたアミノ基を除去し、アリール基での 共役骨格の拡張を行ったことである。これにより、電子遷移の性質を分子内電荷移動性から $\pi-\pi^*$ 遷移性に変えることができ、その結果、この化合物は、水中という極性溶媒中においても蛍光量子収率 0.6 程度の強い蛍光を示した。この修飾は、吸収・発光波長の大幅な短波長化を引き起こしてしまうのが問題であったが、ベンゾホスホール骨格を修飾することにより、この問題を克服した。さらに、抗体修飾が可能なカルボキシ基も導入することができた。

得られた化合物を実際に IgG 抗体に導入した色素を用い微小管の染色実験を行ったところ、超解像レベルの解像度で繰り返し撮像が可能であることがわかった。さらに、z-スタック撮像により、3D イメージの構築が可能なることも実験的に示した。また、既存の同波長領域に吸収・発光をもつ色素と併せて用いることにより、色素の耐光性の強弱を利用したマルチカラーイメージングが可能なることも示し、耐光性蛍光色素の新たな利用価値を示した。これらの結果は、この新規蛍光色素が、生物学研究に広く利用される可能性もつことを示す結果といえる。

< 引用文献 >

- E. Yamaguchi, C. Wang, A. Fukazawa, M. Taki, Y. Sato, T. Sasaki, M. Ueda, N. Sasaki, T. Higashiyama, S. Yamaguchi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 4539 (2015).
M. Taki, H. Ogasawara, H. Osaki, A. Fukazawa, Y. Sato, K. Ogasawara, T. Higashiyama, S. Yamaguchi, *Chem. Commun.*, **51**, 11880 (2015).
C. Wang, A. Fukazawa, M. Taki, Y. Sato, T. Higashiyama, S. Yamaguchi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 15213 (2015).

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1件)

- R. A. Adler, C. Wang, A. Fukazawa, S. Yamaguchi, “Tuning the Photophysical Properties of Photostable Benzo[b]phosphole P-Oxide-Based Fluorophores”, *Inorg. Chem.*, ASAP (2017). (査読有)
[DOI: 10.1021/acs.inorgchem.7b00658]

[学会発表](計17件)

- 山口茂弘, “光・電子機能性分子で拓く未来”, The 1st ABiS Symposium (招待講演), 2017年02月19日~2017年02月20日, 自然科学研究機構(愛知県・岡崎市).
山口茂弘, “デザインで拓く発光性有機分子の未来技術”, 豊田工業大学講演会(招待講演), 2016年11月27日, 豊田工業大学(愛知県・名古屋市).
Shigehiro Yamaguchi, “Design and synthesis of useful fluorophore skeletons for bioimaging”, 1st ITbM-IoC Joint Symposium(招待講演)(国際学会), 2016年11月15日~2016年11月16日, Nagoya University(愛知県・名古屋市).
山口茂弘, “光・電子機能性分子で拓く未来”, 第42回反応と合成の進歩シンポジウム(招待講演), 2016年11月07日~2016年11月08日, 静岡市清水文化会館マリナート(静岡県・静岡市).
Shigehiro Yamaguchi, “Phosphorus-Containing Fluorophores for Bio-imaging”, 17th Korea-Japan Joint Symposium of Organometallic and Coordination Chemistry(招待講演)(国際学会), 2016年11月03日~2016年11月05日, 釜山(韓国).
山口茂弘, “電子系の機能追求のための分子デザイン”, 新学術領域「造形科学」, 第3回公開シンポジウム(招待講演), 2016年10月20日~2016年10月21日, 東北大学(宮城県・仙台市).

山口茂弘, “蛍光性 電子系のデザインと物性追求”, 日本学術振興会創造機能化学第 116 委員会, 2016 年 10 月 12 日, 学士会館 (東京都・港区).

山口茂弘, “光る分子が拓く未来”, 国際有機化学財団特別セミナー, 大分高校生講演会, 2016 年 10 月 08 日, ホルトホール大分 (大分県・大分市).

山口茂弘, “蛍光性 電子系のデザインと機能追求”, 第 65 回高分子討論会「融合マテリアル学が切り拓く新機能材料の創成」(招待講演), 2016 年 09 月 14 日 ~ 2016 年 09 月 16 日, 神奈川大学 (神奈川県・横浜市).

山口茂弘, “光・電子機能分子の物性追求により拓く未来”, 近大若手シンポジウム「光による物質・エネルギー変換の最前線」, 2016 年 09 月 09 日, 近畿大学 (大阪府・東大阪市).

深澤愛子, WANG Chenguang, 田邊誼之, 多喜正泰, 佐藤良勝, 東山哲也, 山口茂弘, “ベンゾホスホール P-オキンドを鍵骨格とする超耐光性蛍光色素の開発と超解像蛍光イメージングへの応用”, 第 27 回基礎有機化学討論会, 2016 年 09 月 01 日 ~ 2016 年 09 月 03 日, 広島国際会議場 (広島県・広島市).

S. Yamaguchi, “Phosphorus-containing fluorophores for bio-imaging”, Core-to-core Joint Symposium (招待講演)(国際学会), 2016 年 06 月 29 日, Kingston (カナダ).

山口茂弘, “分子の光が拓く未来”, 第 26 回名古屋大学理学懇話会, 2016 年 06 月 04 日, 名古屋大学 (愛知県・名古屋市).

山口茂弘, “典型元素化学が拓く未来分子材料”, JACI-GSC シンポジウム (招待講演), 2016 年 06 月 02 日, ANA クラウンプラザホテル神戸 (兵庫県・神戸市).

S. Yamaguchi, “Phosphorus-containing fluorophores for bio-imaging”, PreISOR 2016 (招待講演)(国際学会), 2016 年 04 月 21 日, 京都大学 (京都府・京都市).

S. Yamaguchi, “Phosphorus-containing fluorophores for bio-imaging”, Fujihara Seminar (招待講演)(国際学会), 2016 年 04 月 17 日, THE LUIGANS (福岡県・福岡市).

S. Yamaguchi, “Main Group Strategy for Photo- and Electro-Functional Materials”, Sino-German Main Group Chemistry Symposium (招待講演)(国際学会), 2016 年 04 月 10 日 ~ 2016 年 04 月 15 日, 北京 (中国).

{ 図書 } (計 0 件)

{ 産業財産権 }

出願状況 (計 1 件)

名称: ホスホール化合物

発明者: 山口茂弘, 深澤愛子, 多喜正泰, Chenguang Wang

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-168880

出願年月日: 平成 28 年 8 月 31 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

{ その他 }

ホームページ:

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 茂弘 (YAMAGUCHI, Shigehiro)

名古屋大学・物質科学国際研究センター (WPI)・教授

研究者番号: 60260618