

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21710109

研究課題名 (和文) 蛍光標識化水溶性フラーレンナノ粒子を用いた生体組織内動的挙動の
解明研究課題名 (英文) Study on Dynamic Behavior of Water-Soluble Fullerene Nanoparticle
having a Fluorescent Tag for Bioimaging

研究代表者

小久保 研 (KOKUBO KEN)

大阪大学・工学研究科・講師

研究者番号：20304008

研究成果の概要 (和文)：

水酸化フラーレンに蛍光標識部位としてピレンを導入することに成功し、リンカーの長さによってエキシマー蛍光の発現や蛍光寿命に違いが見られることを見出した。また、可視領域に強い蛍光を示すフルオレセイン部位の導入にも成功した。さらに、蛍光消光実験により、ピレンに比べてフルオレセイン部位のほうが、フラーレン核へのエネルギー移動による蛍光消光が1/2.5に抑制されることを明らかにし、実際に蛍光量子収率が約2倍向上した。

研究成果の概要 (英文)：

We succeeded in synthesizing fullerenols having pyrene moieties as a fluorescent tag and found that the excimer emission and the fluorescent lifetime were varied by changing the linker length. We also synthesized a fullereneol having a fluorescein moiety which shows much stronger fluorescence in visible region. The fluorescent quenching experiments revealed that the fluorescent quenching by energy transfer from fluorophore to fullerene nucleus was retarded by 2.5 times for fluorescein as compared with that for pyrene fluorophore. The fluorescent quantum yield of fluorescein tagged fullereneol was thus improved ca. 2 times higher than that of pyrene tagged fullereneol.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,600,000 | 780,000 | 3,380,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノ粒子・ナノチューブ

1. 研究開始当初の背景

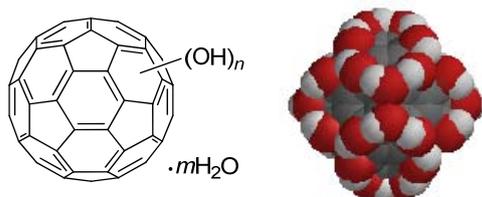
(1) 球状炭素分子フラーレンは、1985年のC₆₀の発見以来、多くの魅力的な性質に関して基礎から応用にいたるまで、国内外共に精力的に研究がなされてきた。しかし、フラ

ーレン類は炭素のみからなる物質のため、トルエンなどのいくつかの有機溶媒には可溶であるものの、水には全くと言ってよいほど溶解しない。そこで、これらに水溶性を付与するため、水溶性ポリマーやシクロデキスト

リンにより包接し、 C_{60} の構造を壊すことなく水溶化する方法が開発されてきた。

(2) もう一つの手法としては、フラーレンの炭素-炭素二重結合へ直接親水性の官能基を導入する化学修飾法が知られている。例えば、これまでに L. Y. Chiang らは、水酸基を 1 2 個導入した水酸化フラーレンの合成法を開発している。しかし、水酸基の導入数が 1 2 個程度では中性の水にはほとんど溶解しない。一方、北澤らは水酸基を 22 ~ 26 個導入する別の合成法を開発している。この方法で得られる水酸化フラーレンは水によく溶解するが、試薬として水酸化ナトリウムを用いるため、残留するナトリウム塩を完全に除去するプロセスは工業的には困難である。

(3) これら既存の水酸化フラーレン合成法に対し、申請者のグループでは、安価な過酸化水素水を基軸として、世界で初めて水酸基を 30 個以上(総炭素数 60 の半分以上) 有する高水溶性の水酸化フラーレンの合成法を開発した(下図、*ACS Nano* **2008**, *2*, 327)。



$C_{60}(OH)_{36-40}$ ($m = 8-9$)

さらに、物理的・化学的性質についても調査を行ったところ、この水酸化フラーレンが水溶液中で、ほぼ分子サイズに相当するおよそ 1 ナノメートルの粒径分布を示すことを動的光散乱法、走査型プローブ顕微鏡、Induced Grating 法により確認した (*Nano Research* **2011**, *4*, 204)。

(4) 近年、ナノテク分野が急速に拡大する中、一部ナノカーボン材料がすでに実用化され始めた現在、このような水溶性のナノカーボン粒子の生体内における動的挙動解析は、安全性、毒性、体内蓄積、代謝、変異等を調べるためにも急務の課題であると思われる。

2. 研究の目的

(1) 蛍光標識を用いた生体組織の可視化技術(バイオイメージング)は、まさに 2008 年の GFP 発見・応用に対するノーベル化学賞に証明されるがごとく、医学・生化学の分野に対して大きな恩恵をもたらした。そこで、上述したナノカーボン分野の現状を踏まえ、本研究では、およそ 1 ナノメートルの粒径をもつ水溶性水酸化フラーレンナノカーボン粒子に蛍光色素を結合させ、生体組織観察が可能な新規蛍光標識化水溶性ナノ粒子の開

発を行う。

(2) 生体現象を生きたまま、かつ高感度に直接可視化できる蛍光イメージングは、いまや生命科学研究に不可欠な技術である。全反射蛍光顕微鏡を用いることで、一分子の蛍光色素を観察することも可能となり、生体分子の運動や相互作用を解析することができる。この技術を応用すれば、種々細胞に対する水溶性フラーレンの生理活性や毒性を直接観察できるのみならず、生体内のどの部位に蓄積され、どのように代謝されるかを追跡することができるかと期待される。実際、予備的研究において、この水溶性水酸化フラーレンには脂質過酸化ラジカルによる自動酸化を抑制する働き(抗酸化能)や、いくつかの菌種に対して抗菌活性がすでに確認されており、今後ライフサイエンス分野への応用が見込まれる。

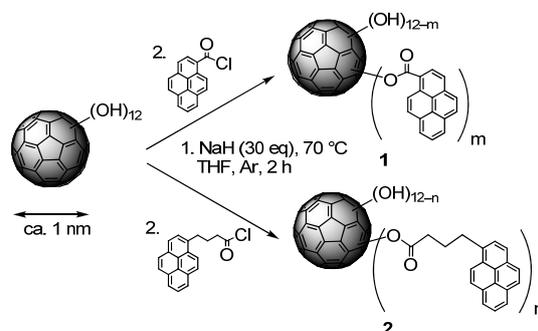
(3) また、このような発光特性を有するナノ粒子は、バイオイメージングのみならず、各種センシング技術にも応用できることが期待される。従来のバイオテクノロジー分野におけるセンサー検出分子は 1 nm 以下の低分子量有機化合物が主流であったが、近年は数十 nm の粒径をもつ金や半導体ナノ粒子も用いられている。これらは DNA やタンパク質のセンシングや FRET を利用するバイオセンサーに応用され得るが、有毒な重金属を含まない新たなナノ粒子の開発がより望まれる。本研究により、安全かつこれまでに開拓されていない 1 ~ 数ナノメートル(シングルナノ)領域における水溶性蛍光ナノ粒子を得ることができる。

3. 研究の方法

平成 21 年度

<LEVEL 1> 蛍光ナノ粒子の合成

まずは出発物質として、有機溶媒に可溶で官能基を導入しやすい、水酸化フラーレン $C_{60}(OH)_{12}$ を選択する。これと安価で汎用的な蛍光官能基として知られるピレンのアシル誘導体を、過剰の NaH 存在下、アルゴン雰囲気、THF 中で反応させ、生成物 **1**, **2** を得る (Scheme 1)。



Scheme 1

<LEVEL 2> 蛍光ナノ粒子の分子構造の決定

得られた水酸化フラーレン **1**, **2** について、蛍光スペクトルにより蛍光部位が付与したことを確認する。また、元素分析、赤外分光分析、NMR、質量分析、熱重量分析 TGA を用いた水分測定等により平均分子構造の決定、すなわち、水酸基とピレンエステル基数の決定を行う。反応がうまく進行しない場合は、反応条件の最適化を行う。

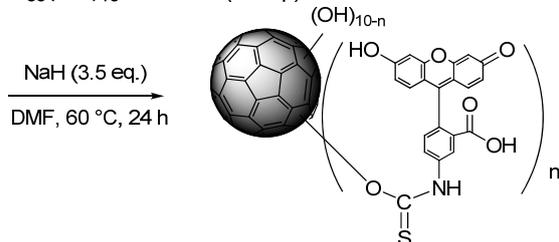
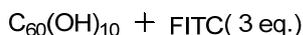
<LEVEL 3> 反応の確認ならびに蛍光特性の観察

得られた水酸化フラーレン **1**, **2** の光物理的性質を調べるために、粒径測定や消光実験、蛍光量子収率測定、蛍光寿命測定を行う。続いて、反応に用いる蛍光標識化試薬の当量、種々反応条件を検討することにより、上記の平均置換基導入数がどのように変化するかを調べ、蛍光強度との相関を調べる。

平成 22 年度

<LEVEL 4> 蛍光量子収率の向上を目指した異なる蛍光部位の導入

さらに高い蛍光量子収率を有する部位を導入するため、フルオレセイン部位を有する水酸化フラーレン **4** を合成する (Scheme 2)。反応には、広く蛍光標識化試薬として用いられている、イソチオシアネート基を有する FITC を用いる。



Scheme 2

<LEVEL 5> 蛍光部位の違いに基づく光物理的性質の考察

水酸化フラーレン **1**, **2** と同様に、フルオレセイン部位を有する水酸化フラーレン **4** について、構造同定、蛍光特性の観察ならびにエネルギー移動効率を調べ、これらの違いに寄与する因子について考察を行う。

4. 研究成果

(1) ピレン蛍光部位を有する水酸化フラーレンナノ粒子の合成

水酸化フラーレン $C_{60}(OH)_{12}$ と対応するピレンの酸塩化物を、過剰の NaH 存在下、アルゴン雰囲気、THF 中、 70°C で反応させ、生成物 **1**, **2** をそれぞれ得た (Scheme 1)。カラムクロマトグラフィーにより精製した。

(2) 蛍光ナノ粒子の分子構造の決定

いずれの生成物 **1**, **2** もピレン骨格に由来する強い蛍光を示したが、**2** では原料である 1-pyrenebutyric acid に見られない新たなブロードなピークが 460 nm 付近に観測された (Figure 1)。

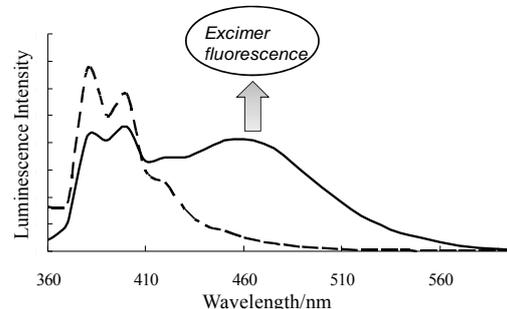


Figure 1. Fluorescence spectra of **2** ($\lambda_{\text{ex}} = 342 \text{ nm}$, solid line) and 1-pyrenebutyric acid ($\lambda_{\text{ex}} = 336 \text{ nm}$, dashed line) in THF.

新たに見られたこの長波長部の吸収は、ピレンなどの多環芳香族平面分子が空間的に近接するとき、励起状態で二量体のような会合体 (エキシマー) を形成するために観測されるエキシマー発光であると同定された。このことから、**2** では 1 分子につき少なくとも 2 つ以上のピレンを近傍に有しており、かつ、**1** に比べてフレキシブルなアルキル鎖リンカーの存在によって、エキシマー形成が可能になったと思われる (Figure 2)。

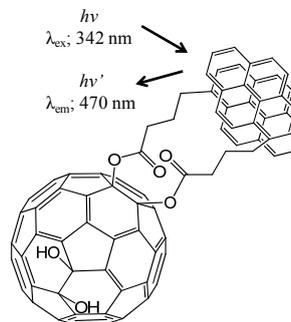


Figure 2. A schematic explanation of excimer emission of **2**.

また、Figure 3 に示す赤外吸収スペクトルにおいて、ピレンカルボン酸、酸塩化物、生成物 **1** の $\text{C}=\text{O}$ 伸縮のピークの位置は、それぞれ 1676 , 1752 , 1702 cm^{-1} であり、**1** がエステル基を有すること、その他の不純物を含んでいないことを支持した。また、**1** には 3400 cm^{-1} 付近にブロードな吸収が見られたことから、エステル基と共存して水酸基も有することが示唆された。元素分析の結果、生成物 **1**, **2** とともに、3 つの水酸基がピレンエステル部位に置き換わった平均構造 (**2**: $C_{60}(OH)_9(OCOC_3H_6Py)_3 \cdot 5H_2O$) であると同定された。出発原料の水酸化フラーレンと同様に、分子内に二次結合水を含んでいることは、熱重量分析 (TGA) から支持された。

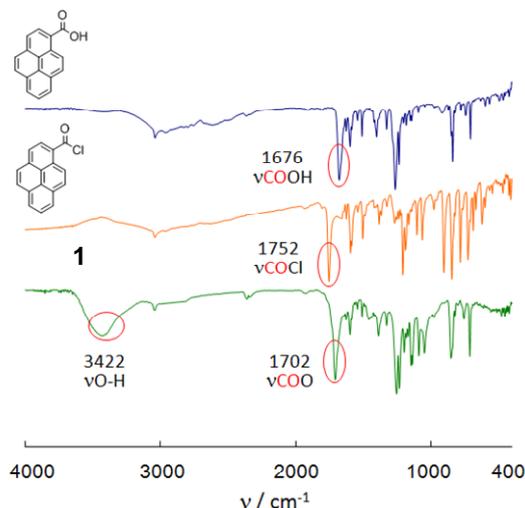


Figure 3. IR spectra of 1-pyrenebutyric acid, 1-pyrenebutyryl chloride, and fullereneol **1**.

(3) 反応の確認ならびに蛍光特性の観察

動的光散乱法 DLS を用いた **2** の溶液の粒径分布測定を Figure 4 に示す。平均粒径は 1.53 nm であり、比較的狭い粒径分布を示した。フラーレンの直径がおよそ 1 nm であることから、蛍光水酸化フラーレン **2** がほぼ単一分子として分散していることがわかった。無修飾の水酸化フラーレンでも単分子分散することから、蛍光標識化によっても分子の性質が保たれていることが期待される。この結果と、上述したエキシマー蛍光が非常に低濃度 (0.60 μM) でも観測されたことから、分子間でのエキシマー蛍光ではなく、分子内エキシマー蛍光であると考えられる。

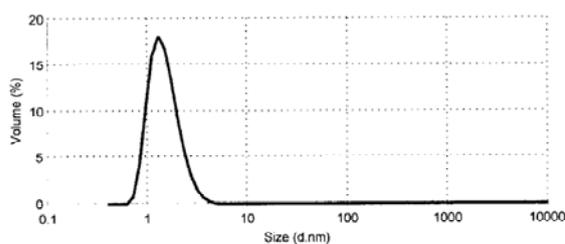


Figure 4. Dynamic light scattering (DSL) chart of **2** (0.10 mM) in THF. Size distribution by volume.

次に、蛍光特性観察の一つとして消光実験を行った。1-pyrenebutyric acid の THF 溶液に、消光剤として C₆₀ を一定量ずつ加えて蛍光スペクトルを測定し、縦軸に 400 nm での発光強度比、横軸に消光剤当量をとって Stern-Volmer プロットを行なった (Figure 5)。その結果、切片 **1** を通る良好な直線関係が得られたことから、ピレン部位から C₆₀ へのエネルギー移動が起こっていることがわかった。一方、消光剤に C₆₀(OH)₁₂ を用いた場合は、C₆₀ に比べてそのエネルギー移動効率は 1/2.5 に抑制されていると見積もられた。

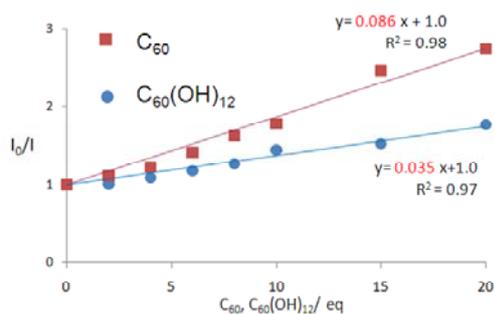


Figure 5. Stern-Volmer plots for 1-pyrenebutyric acid (1.5 μM) with C₆₀ (square) in benzene and with C₆₀(OH)₁₂ (circle) in THF at 400 nm.

続いて **1**, **2** の蛍光寿命を測定したところ、**1** に比べて **2** のほうがわずかに寿命は長かった (Figure 6)。これは、エネルギー移動の起こりやすさが、フェルスターの関係式 ($k_T = \{9000 (\ln 10) \kappa^2 J / 128 \pi^5 n^4 N_A r^6\} k_f$, k_T : エネルギー移動速度定数, n : 溶媒の屈折率, N_A : アボガドロ数, k_f : ドナー化合物の蛍光速度定数) より、距離の 6 乗に反比例するという関係に由来するものと考えられる。

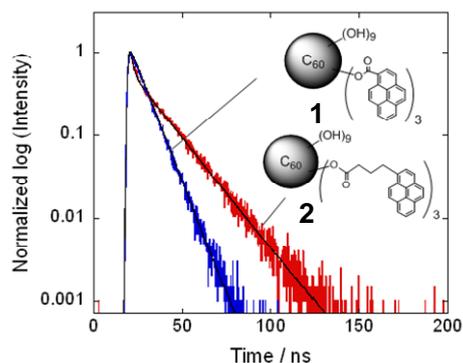


Figure 6. Fluorescence decay of **1** ($\lambda_{ex} = 340$ nm, $\lambda_{em} = 386$ nm) and **2** ($\lambda_{ex} = 342$ nm, $\lambda_{em} = 460$ nm).

蛍光寿命測定の結果を Table 1 にまとめた。1-pyrenebutyric acid と比較して **1**, **2** の蛍光寿命は短くなっていることが分かった。さらに、**1**, **2** の発光が 2 成分見られたこと、その 2 成分目の蛍光寿命が 1~2 ns という

Table 1. Emission lifetimes of 1-pyrenebutyric acid, fullerenols **1**, and **2**.^a

| compound | λ_{ex} (nm) | λ_{em} (nm) | τ_1 (ns) | τ_2 (ns) |
|----------------------|------------------------|------------------------|------------------|------------------|
| 1-pyrenebutyric acid | 336 | 377 | 22.5 | □ |
| 1 | 340 | 386 | 7.82 | 1.06 |
| 2 monomer | 342 | 377 | 18.4 | 3.59 |
| 2 excimer | 342 | 460 | 16.2 | 1.56 |

^aMeasured in THF.

短さであったことから、ピレン部位からフラレン核へエネルギー移動が起こった結果現れた、フラレン核からの蛍光が観測されたものと考えられる。以上より、生成物 **1**、**2** は蛍光を有するものの、ピレン部位からフラレン核への分子内エネルギー移動は起こっていることが示唆された。

最後に、水溶性の蛍光ナノ粒子をつくる目的で、得られた生成物 **2** を水溶化させるため、さらに水酸基を増やすよう過酸化水素水と反応させたところ、目的とする蛍光を有する水溶性水酸化フラレン **3** が得られた。現段階では、得られたサンプルの量が少なく、詳細な構造同定には至っていない。

(4) 蛍光量子収率の向上を目指した異なる蛍光部位の導入

ピレンの導入によって蛍光標識化フラレンナノ粒子の合成に成功したものの、ピレン部位からフラレン核へのエネルギー移動が起こったことにより、十分な蛍光の発現には至らなかった。これは、水酸化フラレンの吸収スペクトルがピレンの蛍光スペクトルと重なることから推測される。そこで、水酸化フラレンの吸収スペクトルと重ならない、より長波長に蛍光を示す蛍光標識化試薬として、5-isothiocyanate fluorescein (FITC) を選択した。ピレンが疎水性であるのに比べ、FITC は高い水溶性を示し、また塩基性条件でフルオレセイン骨格に基づく強い緑色の蛍光を放つ。蛍光波長が可視領域にあるので観察しやすく、蛍光プローブとして利用しやすいと考えられる。

反応は、 $C_{60}(OH)_{10}$ に過剰の NaH を加え、DMF 中、Ar 雰囲気下、50 °C で 3 時間攪拌した。そこに FITC (3 当量) を加え、さらに 24 時間攪拌した。反応後、溶媒を減圧下で留去し、遠心分離機を用いてメタノール洗浄を繰り返した。さらに、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて反応混合物を THF で展開し、未反応や分解 FITC 成分を除去した後、展開溶媒 THF/H₂O = 1/1 で溶出させ、蛍光標識化水酸化フラレン **4** を得た (Scheme 2)。

この生成物の IR スペクトルでは、水酸化フラレンのピークとフルオレセインのピークの両方が混在していた (Figure 7)。また、反応前の FITC に見られた NCS 基のピークが生成物では完全に消失していることが確認できた。蛍光測定では FITC とほぼ同じ波長の蛍光を放ったことからフルオレセイン部位の導入が確認できた。¹H NMR を測定したところ、フルオレセイン由来と思われる芳香族ピークも確認された。なお、HPLC により未反応の FITC が除去できていることを確認している。元素分析の結果から、導入されたフルオレセイン部位の数をフラレン核に対し 1 つと決定した。また、UV スペクトルにおいて、

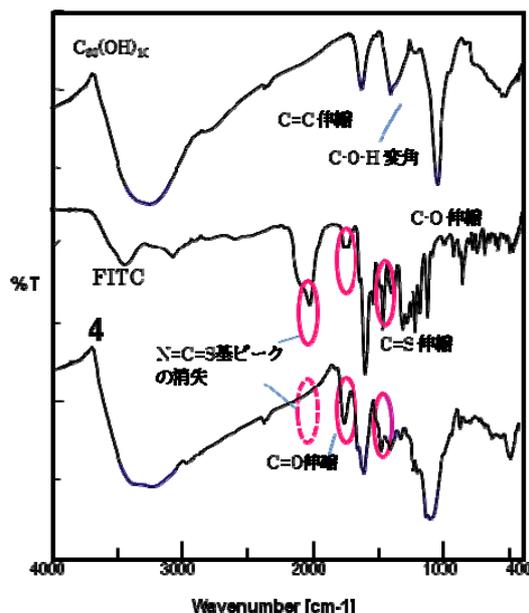


Figure 7. IR spectra of $C_{60}(OH)_{10}$, FITC, and fullereneol **4**.

$C_{60}(OH)_{10}$ 由来の吸収と共に 460 nm に FITC に特徴的な吸収が見られ、その吸収強度を FITC と比較すると、導入されたフルオレセイン部位の数を 0.9 と見積もることができ、元素分析の結果を支持した。

(5) 蛍光部位の違いに基づく光物理的性質の考察

ピレンと FITC では、フラレンや水酸化フラレンに対し、どの程度エネルギー移動能に違いがあるかを調べるため、消光実験を行った。まず、水酸化フラレンはフラレンに比べて消光能がおおよそ 1/3.5 に低下することがわかった。これは水酸化されることで、フラレンの共役が減少して HOMO-LUMO 間のエネルギーギャップが上昇するためだと考えられる。次に、ピレンに比べると FITC の方が 1/2.5 消光されにくいということがわかった。これは、上述したように蛍光-吸収スペクトルの重なりが小さくなり、エネルギー移動が抑えられたためだと考えられる。

生成物 **4** と FITC では、ほぼ同じ波長の蛍光スペクトルが観察されたが、**4** は FITC に比べると蛍光強度が低下していた。**4** の蛍光量子収率は 0.25 と見積もられ、FITC の 0.91 のおおよそ 1/3.5 となった。ピレンを導入した水酸化フラレン **2** (0.14) に比べるとフルオレセインを導入した **4** は、蛍光量子収率、分子内消光の割合ともに改善が見られた。しかし、Stern-Volmer プロットから予想 (1/2.5) されるよりも消光が大きかった (1/3.5) ことの原因としては、水酸化フラレンとフルオレセインが結合されたことにより、溶液拡散中より分子間距離が近づき、消光が起こり

易くなってしまうためと考えられる。

以上、本研究にて得られた成果を総括すると、以下のとおりとなる。

1. ピレンとフルオレセイン部位を有する蛍光標識水酸化フラーレンナノ粒子の合成にそれぞれ成功した。
2. フラーレンナノ粒子では、ピレンやフルオレセイン部位から、フラーレン部位にいくらか分子内エネルギー移動が起こることがわかった。
3. リンカー部を長くすることで、ピレンのエキシマー発光が発現し、エネルギー移動の効率も抑えることができた。
4. 消光実験より、フルオレセインはピレンよりも消光されにくく、フラーレンに比べて水酸化フラーレンでは、蛍光部位の消光が起こりにくいことが確認された。
5. フルオレセイン部位を有する蛍光標識水酸化フラーレンナノ粒子の蛍光量子収率は 0.25 と合成された粒子の中で最も良かった。

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. Facile and Scalable Synthesis of Highly Hydroxylated Water-Soluble Fullerenol as a Single Nanoparticle
K. Kokubo, S. Shirakawa, N. Kobayashi, H. Aoshima, and T. Oshima 査読有
Nano Research, **2011**, *4*, 204-215.
2. Synthesis and Regiochemistry of [60]Fullereryl 2-Methylmalonate Bisadducts and their Facile Electron-Accepting Properties
K. Kokubo, R. S. Arastoo, T. Oshima, C.-C. Wang, Y. Gao, H.-Lin Wang, H. Geng, and L. Y. Chiang 査読有
J. Org. Chem., **2010**, *75*, 4574-4583.
3. A New Approach to Benzofurane Synthesis: Lewis Acid Mediated Cycloaddition of Benzoquinones with Stilbene Oxides
K. Kokubo, K. Harada, E. Mochizuk, and T. Oshima
Tetrahedron Lett. **2010**, *51*, 955-958.
査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 蛍光標識水酸化フラーレンの合成およびその光物理特性
小久保 研、白川翔吾、伊熊直彦、大島 巧
日本化学会第 91 回春季年会 **2011. 3. 28**, 横浜
2. Synthesis of Fullerenols having

Fluorophore Moiety

K. Kokubo, S. Shirakawa, I. Morita, N. Ikuma, T. Oshima

PACIFICHEM **2010. 12. 17**, Hawaii, USA

3. Near-Infrared Optical Absorbing Nanocarbon Material: [18]Trannulene as [60]Fullereryl 2-Methylmalonate Adducts

K. Kokubo, R. S. Arasto, H. Geng, H.-L. Wang, T. Oshima, L. Y. Chiang

8th Eco-Energy and Materials Science and Engineering Symposium (EMSES), **2010. 8. 21**, Kyoto

4. 非水溶性低度水酸化フラーレンの簡便合成とそのナノ粒子特性

小林 直記、小久保 研、大島 巧

第 38 回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム **2010. 3. 4**, 名古屋市

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/~oshima-lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小久保 研 (KOKUBO KEN)

大阪大学・工学研究科・講師

研究者番号：20304008