

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24685021

研究課題名(和文)光スイッチング型RESOLFT超解像蛍光顕微鏡のための蛍光スイッチング分子の開発

研究課題名(英文)Development of fluorescent photoswitchable molecules toward RESOLFT super-resolution fluorescence microscope

研究代表者

深港 豪 (Fukaminato, Tsuyoshi)

熊本大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：80380583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,000,000円

研究成果の概要(和文)：光スイッチング型RESOLFT超解像蛍光イメージングのための最適な蛍光スイッチング分子を開発するために、本研究では、優れた光反応性と高い繰り返し耐久性を有するジアリールエテンに、(1)可視光に対する光応答性を付与し、(2)水溶液環境下においても高効率な蛍光スイッチングを示す蛍光スイッチングシステムの開発を目的とした。

本研究において、可視光に対して光反応性を示す分子を開発するための一般的な分子設計指針を明らかとすることができた。また、ナノ粒子化することにより、水溶液中での安定な蛍光スイッチングを達成できるだけでなく、高効率な非線形蛍光スイッチングシステムを構築できることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We tried to develop the suitable fluorescent photoswitchable molecules, which have photoreactivity for visible-light and show the stable fluorescence photoswitching even in the aqueous conditions, toward RESOLFT super-resolution fluorescence microscope in this study. In this study, we successfully prepared a visible-light reactive diarylethene (DAE) derivative by introducing an aromatic dye at the reactive carbon atom of the DAE unit, optimizing orbital level of each component, and controlling the mutual orientation of the aromatic dye and the DAE unit. In addition, we successfully prepared a highly efficient fluorescent photoswitchable nanoparticle (NP). Such NPs show the non-linear fluorescence photoswitching behavior at very low photoreaction conversion yield. This "giant amplification of fluorescence photoswitching" represent an extremely promising and challenging step toward the application for RESOLFT super-resolution fluorescence microscope.

研究分野：光化学

キーワード：蛍光 フォトクロミズム 超解像蛍光イメージング ジアリールエテン

1. 研究開始当初の背景

光学顕微鏡は微細な構造を非破壊・非接触に観測することができる簡便な手法として、様々な研究分野で広く用いられている。通常の光学顕微鏡は光の「回折限界」と呼ばれる壁に阻まれ、従来は用いる光の波長の半分程度の空間分解能しか得ることができない。しかしながら、1994年に Stefan W. Hell 博士らにより、「光応答の飽和を利用することで光の回折限界は超えられる」という概念が提唱され (S. W. Hell et al., *Opt. Lett.*, 1994, 19, 780)、近年その概念が実証された。それ以降、光の回折限界を超える空間分解能を有する超解像蛍光顕微鏡技術が次々と登場してきており、ここ数年で急速な発展を遂げている最もアクティビティの高い研究分野のひとつである。事実(本研究課題遂行中に)この超解像蛍光顕微鏡技術に対して、2014年度の「ノーベル化学賞」が与えられたことから、本研究分野の重要性を容易に伺うことができる。研究開始当時の時点において既に、超解像を達成するための基本的な原理は確立されつつあり、研究のストリームとしては、空間分解能の向上だけでなく、時間分解能の向上、複数の分子種の同時観測や生体機能の可視化などを可能とする「新たな蛍光分子の開発」に研究の焦点が移行してきていた。その中でも特に、発光点外辺の消光を誘導放出により行うのではなく、蛍光スイッチング分子の可逆的な光異性化反応の飽和現象を用いる“光スイッチング型 RESOLFT 顕微鏡”という手法に注目が集まってきており、それを可能とする理想的な蛍光スイッチング分子の開発が切望されていた。

2. 研究の目的

光スイッチング型 RESOLFT 顕微鏡のための蛍光スイッチング分子に要求される特性として、高い蛍光量子収率、繰り返し耐久性、および優れた光反応転換率(蛍光消光比)などが挙げられる。加えて、理想的な空間分解能を達成するには、蛍光励起と蛍光スイッチングを独立の波長の光で行えること(この機能を非破壊読み出し機能という)も必要とされる。しかしながら、ほとんどの蛍光スイッチング分子は、蛍光分子を励起する波長の光により蛍光のスイッチング(光反応)も同時に引き起こす。また、ほとんどの蛍光スイッチング分子が水に溶解しにくく、蛍光スイッチングを誘起するために紫外光の照射を必要とするなど、超解像蛍光顕微鏡技術の最も大きな応用分野である生化学実験への応用を目指す上で大きな弊害となっていた。

そこで、本研究では“光スイッチング型

RESOLFT 顕微鏡”のもつポテンシャルを最大限に引き出すことが可能な、水溶液中で安定な蛍光スイッチング特性と高い繰り返し耐久性を示し、かつ非破壊読み出し機能を有する蛍光スイッチング分子を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

上述の目的を達成するために、本研究では、優れた光反応性と高い繰り返し耐久性を有するジアリールエテンに、(1)可視光に対する光応答性を付与し、(2)水溶液環境下においても高効率な蛍光スイッチング挙動と非破壊蛍光読み出し特性を示す蛍光スイッチングシステムを設計・合成することに集中的に取り組んだ。開発した分子の分子物性を詳細に調べることにより、可視光に対して光反応性を示すスイッチング分子を開発するための一般的な分子設計指針を明らかとする。また、単純に水溶性の置換基を分子に導入するだけでなく、ナノ粒子化などの手法を用いて、水溶液中での安定な蛍光スイッチングを達成することを試みた。

4. 研究成果

(1) 可視光で可逆的なフォトクロミック反応を示すスイッチングユニット(ジアリールエテン)に対する分子設計指針の解明: 可視光のみで可逆的なフォトクロミック反応を示す分子を設計するための最も簡便なアプローチとして、両異性体の吸収波長を可視域までシフトさせることが考えられる。そのためには分子骨格の共役系を拡張することが望ましいものの、ジアリールエテンの分子骨格の外側に共役長を拡大していくと、その光反応性が著しく損なわれる問題があった。この原因は、共役長が外側に拡張することにより、反応に関与するジアリールエテンのヘキサトリエン骨格上に電子が存在しにくくなるためだと考えられている。

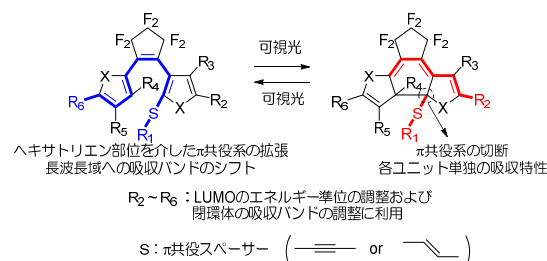


図1 可視光のみでフォトクロミック反応を示すジアリールエテンのための分子設計

そこで、本研究では、ジアリールエテンの反応点炭素に可視域に吸収を有する蛍光色素を共役系が繋がる形で導入することで、ヘキサトリエン骨格上に電子を局在させたまま、ジアリールエテン開環体の共役長を拡張させることを試みた(図1)。いくつかの分子

を合成した結果、可視光で可逆的なフォトクロミック反応を示す分子と、いかなる波長の光を照射しても全くフォトクロミック反応を示さない分子が存在することが明らかとなった。分子軌道計算を用いた理論解析を行った結果、ジアリールエテンユニットと蛍光色素の LUMO レベルを同程度に近づけることで両ユニット間に強い相互作用が生じ、分子軌道がジアリールエテンのヘキサトリエン部位と蛍光色素の両方に局在化することが明らかとなった。また、ジアリールエテンユニットと蛍光色素の分子の配向を直交させることで、閉環体の状態における蛍光色素とジアリールエテンユニット間のエネルギー移動を回避することができ、可逆的なフォトクロミック反応を達成できることが明らかとなった。これらの知見に基づき、最終的に可視光のみで両異性化反応ともに高い光反応転換率 (> 90%) を示す蛍光性ジアリールエテン 1 (図 2) を開発することに成功した。本研究で明らかとなった分子設計指針は、一般性の高いものであるため、より長波長側の光 (例えば、近赤外光) で可逆的なフォトクロミックを示す分子を開発することも可能になると期待される。(T. Fukaminato, et al., J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 17145-17154)

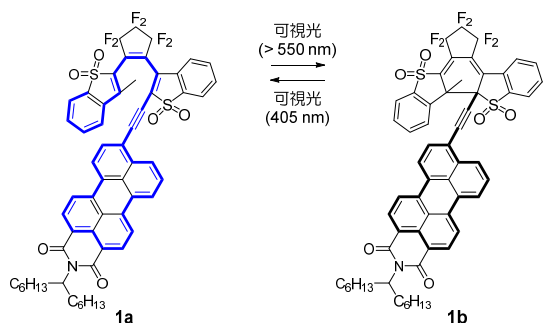


図 2 可視光のみで可逆的なフォトクロミズムを示す蛍光性ジアリールエテン 1

(2) 水溶液環境下において効率良い蛍光スイッチングを示す分子システムの開発: 水溶液中での高効率な蛍光スイッチングを達成するために、従来よく用いられる水溶性置換基を分子内に導入して水溶性を付加するアプローチではなく、非水溶性であることを積極的に利用し、水溶液中で安定なナノ粒子を形成するような新しい蛍光スイッチング分子の開発に取り組んだ。ナノ粒子は通常の蛍光少分子と比較して、耐久性がより高いことや、検出できる光子数が多いなどの利点を持つだけでなく、100 ナノメートルオーダーサイズの粒子は生細胞への取り込みが容易に起こることが明らかとなっており、生化学的な応用を目指す上で非常に有利である。しかしながら、ナノ粒子などの固体状態においても優れた蛍光特性を維持したまま、効率よく蛍光スイッチングを達成できるような分子は、ほとんど報告されていなかった。

その背景の中、我々は会合状態においても

高い蛍光特性を示すベンゾチアゾール色素を導入した蛍光性ジアリールエテン誘導体 2 (図 3) が、水溶液中に分散されたナノ粒子の状態において非常に高効率な蛍光スイッチング特性を示すことを見出した。

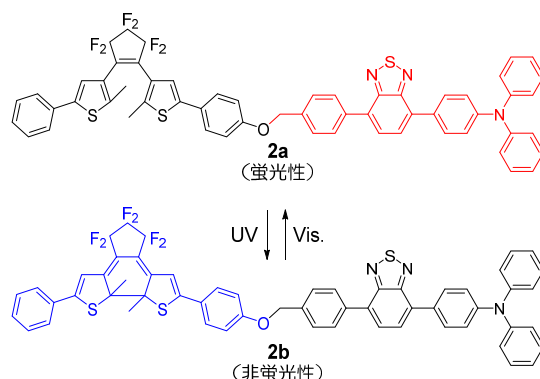


図 3 蛍光性フォトクロミックナノ粒子 2

分子 2 は紫外光 - 可視光照射に伴い、THF 溶液中において可逆的なフォトクロミズムを示し、開環体 (2a) の状態で強い蛍光性 ($\phi_f = 0.67$) を有していた。一方、閉環体 (2b) の状態は非蛍光性であり、分子 2 は溶液中において、分子内エネルギー移動機構により 2b の生成量に比例して線形的に蛍光が消光する蛍光スイッチング挙動を示すことが認められた (図 4、)。続いて、ナノ粒子状態におけるフォトクロミック特性および蛍光特性を調べた結果、ナノ粒子の状態においても高い蛍光性を保持しており ($\phi_f = 0.65$)、フォトクロミズムに伴い可逆的に蛍光強度が変化することが認められた。しかしながら、溶液状態の時とは異なり、わずか数%の 2b が生成しただけで、系全体の蛍光が完全に消光する非線形蛍光スイッチング挙動を示すことが明らかとなった (図 4、)。

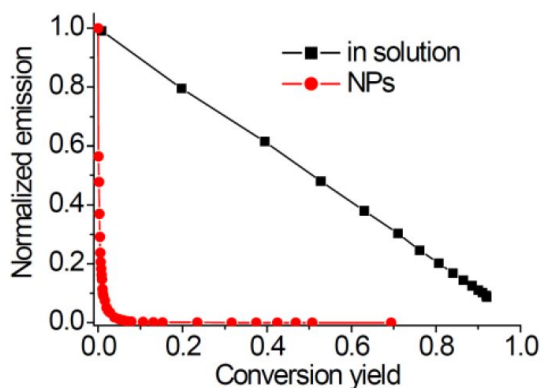


図 4 溶液状態 () およびナノ粒子状態 () におけるフォトクロミズムに伴う蛍光スイッチング挙動

蛍光寿命測定や理論解析により、多数の分子が近接して存在するナノ粒子内において、ひとつの蛍光性分子 (2a) がクエンチャーである非蛍光性分子 (2b) へと変化すると、その周囲にある多数 (約 400 個) の 2a 分子が

らの蛍光が長距離分子間エネルギー移動により効率良く **2b** に移動し、非線形的に蛍光が消光されることが明らかとなった。この特性は可逆的な蛍光スイッチングを達成するために必要なフォトン数を大幅に減らせることを意味しており、システムとしての安定性の向上にも繋がるものと期待される(J. Su et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 3362-3366: “Hot Paper” および “inside back cover” に採択)。また、単一粒子レベルでも、同様の高効率な非線形蛍光スイッチング挙動、高い繰り返し耐久性、および(擬似的な)非破壊蛍光読み出し機能が確認された。

以上の成果は、本研究の目的である(1)可視光に対する光応答性、および(2)水溶液環境下においても高効率な蛍光スイッチング挙動と非破壊蛍光読み出し特性を示す蛍光スイッチングシステムとして一定の要件をそれぞれ満足しうるような分子を設計・合成できたことを意味している。現在、実際にこれらの分子を用いた超解像蛍光イメージングの研究が進行しており、その有用性が近く証明されるものと期待される。

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)

J. Su, T. Fukaminato, J.-P. Placiat, T. Onodera, R. Suzuki, H. Oikawa, A. Brosseau, F. Brisset, R. Pansu, K. Nakatani, R. Métivier, “Giant Amplification of Photoswitching by a Few Photons in Fluorescent Photochromic Organic Nanoparticles”, *Angewandte Chemie International Edition*, 査読有, Vol. 55, No. 11, 2016, pp.3662-3666

Doi: 10.1002/anie.201601640

M. Wakabayashi, S. Yokojima, T. Fukaminato, K. Shiino, M. Irie, S. Nakamura, “Anisotropic Elliptical Dichroism and Influence of Imperfection of Circular Polarization upon Anisotropic Circular Dichroism”, *Journal of Chemical Physics*, 査読有, Vol. 142, No. 15, 2015, pp.154102

Doi: 10.1063/1.4917174

T. Fukaminato, T. Hirose, K. Matsuda, M. Irie, “Molecular design strategy toward diarylethenes that photoswitch with visible light”, *Journal of the American Chemical Society*, 査読有, Vol. 136, No. 49, 2014, pp.17145-17154

DOI: 10.1021/ja5090749

M. Wakabayashi, S. Yokojima, T. Fukaminato, K.-I. Shiino, M. Irie, S. Nakamura, “Anisotropic dissymmetry

factor, g: Theoretical investigation on single molecule chiroptical spectroscopy”, *Journal of Physical Chemistry A*, 査読有, Vol. 118, No. 27, 2014, pp.5046-5057

Doi: 10.1021/jp409559t

K. R. S. Kumar, T. Kamei, T. Fukaminato, N. Tamaoki, “Complete ON/OFF photoswitching of the motility of a nanobiomolecular machine”, *ACS Nano*, 査読有, Vol. 8, No. 5, 2014, pp.4157-4165

Doi: 10.1021/nn5010342

M. Irie, T. Fukaminato, K. Matsuda, S. Kobatake, “Photochromism of diarylethene molecules and crystals: Memories, switches, and actuators”, *Chemical Reviews*, 査読有, Vol. 114, No. 24, 2014, pp.12174-12277

DOI: 10.1021/cr500249p

深港 豪, 亀井 敬, 玉置 信之, “生体分子機械のスマートコントロール: アゾベンゼンの光異性化によるモータータンパク質機能の光制御”, 査読無, *光化学*, Vol. 45, No. 2, 2014, pp.80-83

T. Fukaminato, E. Tateyama, T. Tamaoki, “Fluorescence photoswitching based on a photochromic pK_a change in aqueous solutions”, *Chemical Communications*, 査読有, Vol. 48, No. 88, 2012, pp.10874-10876

DOI: 10.1039/c2cc35889a

T. Kamei, T. Fukaminato, T. Tamaoki, “A photochromic ATP analogue driving a motor protein with reversible light-controlled motility: controlling velocity and binding manner of a kinesin-microtubule system in an *in vitro* motility assay”, *Chemical Communications*, 査読有, Vol. 48, No. 61, 2012, pp.7625-7627

DOI: 10.1039/c2cc33552b

[学会発表](計34件)

1. 石田沙奈恵、深港豪、金善南、緒方智成、栗原清二、「蛍光性フォトクロミックナノ粒子を用いた多色蛍光スイッチング」、日本化学会第96春季年会、2016年3月24-27日、同志社大学京田辺キャンパス、京都
2. 高島諒哉、深港豪、金善南、緒方智成、栗原清二、新留琢郎、「光応答性微小管重合阻害剤の合成」、日本化学会第96春季年会、2016年3月24-27日、同志社大学京田辺キャンパス、京都
3. 橋本拓磨、深港豪、金善南、緒方智成、栗原清二、「アゾベンゼン高分子液晶中における協同的光配向を利用した蛍光スイッチング」、日本化学会第96春季年会、

- 2016年3月24-27日、同志社大学京田辺キャンパス、京都
4. 渡辺智大、佐々木志乃、石橋千英、深港豪、朝日剛、「蛍光性ジアリールエテン誘導体/ベンゾチアゾール混合ナノ粒子の蛍光挙動」、日本化学会第96春季年会、2016年3月24-27日、同志社大学京田辺キャンパス、京都
 5. S. Yokojima, K. Shinoda, T. Fukaminato, S. Nakamura、「Effect of triplet on cyclization reaction of diarylethene linked to fluorescent dye」、日本化学会第96春季年会、2016年3月24-27日、同志社大学京田辺キャンパス、京都
 6. 大戸貴史、緒方智成、金善南、深港豪、栗原清二、「酸化グラフェンによるナノ構造体の構築」、日本化学会第96春季年会、2016年3月24-27日、同志社大学京田辺キャンパス、京都
 7. T. Fukaminato, J. Su, K. Nakatani, R. Métivier、「Efficient fluorescence photoswitching by few photons in fluorescent photochromic nanoparticles」、Asian International Symposium-Photochemistry-(招待講演)、2016年3月25日、Doshisya University, Kyoto, Japan
 8. T. Fukaminato, H. Takashi, K. Matsuda, M. Irie、「Development of Photochromic Molecules」、2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies、2015年12月15-20日、Hawaii Convention Center、Honolulu, Hawaii
 9. K. Nakatani、R. Métivier、S. Maisonneuve、J. Xie、P. Yu、K. Ouhenia-Ouadahi、J. Su、T. Fukaminato、J.-P. Placial、A. Brosseau、J. Audibert、R. Pansu、「Amplified Photoswitching in Fluorescent Photochromic Molecules and Nanomaterials」、2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies、2015年12月15-20日、Hawaii Convention Center、Honolulu, Hawaii
 10. T. Fukaminato、R. Métivier、K. Nakatani、M. Irie、「Efficient photoswitchable fluorescent molecular nanosystems based on photochromic organic molecules」、The 19th International Symposium on ADVANCED DISPLAY MATERIALS & DEVICES (招待講演)、2015年10月22-25日、The K-Hotel、Gyeongju、Korea
 11. 深港豪、「蛍光性フォトクロミック分子材料の開発と単一分子蛍光スイッチング」、2015年光化学討論会、2016年9月9-11日、大阪市立大学杉本キャンパス、大阪
 12. 佐々木志乃、渡部智大、朝日剛、深港豪、「蛍光性ジアリールエテン誘導体の単一ナノ粒子分光」、2015年光化学討論会、2016年9月9-11日、大阪市立大学杉本キャンパス、大阪
 13. T. Fukaminato、T. Hirose、K. Matsuda、M. Irie、「Molecular Design Strategy toward Diarylethenes That Photoswitch with Visible Light」、27th International Conference on Photochemistry 2015、2015年6月28日-2015年7月3日、ICC JEJU、Jeju Island、Korea
 14. R. Métivier、J. Su、K. Ouhenia、S. Maisonneuve、C. Pavageau、J.-P. Placial、A. Brosseau、R. Pansu、J. Xie、K. Nakatani、P. Yu、T. Fukaminato、「Amplification of Fluorescence Photoswitching in Organic and Hybrid Nanoparticles」、27th International Conference on Photochemistry 2015、2015年6月28日-2015年7月3日、ICC JEJU、Jeju Island、Korea
 15. 深港豪、廣瀬崇至、松田建児、入江正浩、「可視光で可逆的なフォトクロミズムを示すジアリールエテンのための分子設計指針」、日本化学会第95春季年会、2015年3月26-29日、日本大学理工学部船橋キャンパス/薬学部、船橋
 16. 若林政光、横島智、深港豪、中村振一郎、「分子の配向を考慮したときの円二色性と円偏光が不完全であることの影響について」、2014年光化学討論会、2014年10月11-13日、北海道大学、札幌
 17. 深港豪、S. Jia、R. Métivier、中谷圭太郎、「蛍光性ジアリールエテンナノ粒子の非線形蛍光スイッチング」、2014年光化学討論会、2014年10月11-13日、北海道大学、札幌
 18. K. R. S. Kumar、T. Kamei、T. Fukaminato、N. Tamaoki、「Synthesis of azobenzene-peptides and their application as a photoresponsive inhibitor for ON/OFF photoswitching of the motility of a nanobiomolecular machine」、2014年光化学討論会、2014年10月11-13日、北海道大学、札幌
 19. T. Fukaminato、「Photoswitching of biological functions based on the photoisomerization of azobenzene」、Asian International Symposium-Photochemistry-(招待講演)、2014年3月29日、Nagoya University、Japan
 20. 深港豪、J. Su、R. Métivier、中谷圭太郎、「蛍光性ジアリールエテンナノ粒子における非線形蛍光消光現象を利用した蛍光スイッチング」、日本化学会第94春季年会、2014年3月27-30日、名古屋大学東山キャンパス、名古屋
 21. T. Fukaminato、T. Kamei、N. Tamaoki、「Photoswitching of microtubule dynamics based on azobenzene photoisomerization」、International Symposium on Photochromism & 8th

- Phenics International Network Symposium, 2013年9月23-26日、Humboldt University, Berlin, Germany
22. 深港豪、亀井敬、島知弘、岡田康志、玉置信之、「両親媒性アゾベンゼンを用いた微小管機能の光制御」、2014年光化学討論会、2013年9月11-13日、愛媛大学、松山
 23. 深港豪、「光応答性分子材料を用いた微小管ダイナミクスの光制御」、蛋白研セミナー「光の、光による、光のための蛋白質科学」(招待講演)、2013年4月20-21日、大阪大学吹田キャンパス、大阪
 24. T. Fukaminato、「Photoregulation of Bio-activities based on photochromic materials」、2012年12月13日、The 13th RIES-Hokudai International Symposium "律"(招待講演)、Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo、Sapporo
 25. T. Fukaminato, E. Tateyama, N. Tamaoki、「Fluorescence photoswitching based on photochromic pKa changes in aqueous conditions」、2012年12月13日、The 13th RIES-Hokudai International Symposium "律"、Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo、Sapporo
 26. T. Kamei, T. Fukaminato, N. Tamaoki、「Photo-control of motility of a kinesin/microtubule system by photochromic ATP analogues」、2012年12月13日、The 13th RIES-Hokudai International Symposium "律"、Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo、Sapporo
 27. T. Fukaminato、「Photoswitching of fluorescence properties based on photochromic materials」、2012年12月6日、One day symposium du PPSM 2012 (招待講演)、ENS Cachan、France
 28. T. Fukaminato、N. Tamaoki、「Fluorescence photoswitching based on a photochromic pKa change in water」、2012年12月1日、Phenics International Network symposium 2012、Universite de Nantes、France
 29. T. Kamei, T. Fukaminato, N. Tamaoki、「A photochromic ATP analogue driving a motor protein with reversibly light-controlled motility」、2012年11月29日、Phenics International Network symposium 2012、Universite de Nantes、France
 30. J. Su, R. Metivier, J. Piard, K. Nakatani, T. Fukaminato、「Highly efficient fluorescence photoswitching in molecular nanosystems based on diarylethenes」、2012年11月29日、Phenics International Network symposium 2012、Universite de Nantes、France
 31. T. Fukaminato、「Single-molecule fluorescence photoswitching with a non-destructive readout capability」、Groupe Francais de Photochimie, Photophysique et Photosciences (招待講演)、2012年11月23日、Laboratoire de Chimie Physique-Matiere et Rayonnement、France
 32. 深港豪、「光応答性分子材料を用いた分子スイッチおよび生体機能の光制御」、6回日本質量分析学会北海道談話会・研究会(招待講演)、2012年10月16日、北海道大学、札幌
 33. 深港豪、亀井敬、齊藤健太、永井健治、玉置信之、「アゾベンゼンの光異性化による微小管重合 - 脱重合ダイナミクスの光制御」、2012年光化学討論会、2012年9月14日、東京工業大学・大岡山キャンパス、東京都
 34. 深港豪、玉置信之、「フォトクロミズムによるpKa変化を利用した水溶性蛍光スイッチング分子」、2012年光化学討論会、2012年9月12日、東京工業大学・大岡山キャンパス、東京都
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 深港 豪 (FUKAMINATO TSUYOSHI)
- 熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授
- 研究者番号：80380583