

磁場効果を利用したバイオイメーキング技術の開発

所属： 神戸大学分子フォトサイエンス研究センター

助成対象者：立川 貴士

共同研究者：

概要

磁場が分子の反応過程に及ぼす影響については、これまで多くの研究がなされてきた。ラジカルイオンが関与する化学反応における磁場効果現象は分子周囲の粘性や極性を反映する特性を持つ。しかし、このような磁場効果の特性を利用して、分子周囲の環境や配向などにおける不均一性をマッピングしたという報告はなされていない。そこで本研究では、光誘起電子移動反応において生成するエキシプレックス錯体からの蛍光が外部磁場に依存することに着目し、磁場応答能を有する連結系分子を合成した。さらに、バイオイメーキングへの応用を目指した蛍光顕微鏡観察手法を開発し、強背景光下での磁場応答発光を観測することに成功した。

abstract

Magnetic field effects (MFEs) on molecular reaction processes are known to be greatly affected by viscosity and polarity around the molecule. However, there is no report that has demonstrated the relationship between MFEs and environmental heterogeneities at the nanometer-scale resolution. In this study, we synthesized electron donor-acceptor type magnetic-field responsive probes for bioimaging applications. We successfully observed the MFEs on their exciplex emission under the fluorescence microscope, even in the presence of high background light.

研究内容

1. 研究背景と目的

生命の仕組みを解明する手段として、蛍光顕微鏡による生体分子および細胞可視化技術は、非常に重要な役割を果たしている。とりわけ、イメージングにおける重要な課題である、低背景光化、多色化、三次元画像化、光の回折限界を超える超解像化を、非破壊的な刺激によって達成することは、ナノバイオイメージング分野のブレイクスルーにつながる。一方、ノーベル化学賞の対象となった超解像イメージング法は、非常に優れた観測手法ではあるが、複数のレーザー光源が必要で、光学系の構築も容易ではない。よって、安易かつ安価なイメージング手法の開発が望まれている。

本研究では、磁場効果と呼ばれる「外部磁場の印加で分子の蛍光が増加する現象」を利用して、新たなイメージング技術の開発を行う。磁場効果は、分子を取り巻く環境（極性や粘性）によりその度合いが異なる特性を持つ。この特性を応用して、生細胞における局所的環境のナノイメージングを目的としている。これを達成するため、外部磁場に応答する蛍光プローブ分子を新規に合成した。また、発光強度を磁場によって変調し、周波数ドメインの抽出による動画の再構築で、背景光を大幅に除去する手法を開発した。

2. 磁場効果の原理

本研究では、磁場効果と呼ばれる「外部磁場の印加で蛍光が増加する現象」を利用する。最終的には、磁場効果の特性を応用して、局所環境における粘性や極性を、光の回折限界を超える（数百ナノメートル）超解像でマッピング可能な新たなナノバイオイメージング手法の開発が目的である。一例として、磁場を印加することでエキシプレックス蛍光が増大する機構について説明する（図1）。ここで、spとはアルキル鎖を用いたスペーサーの略称である。

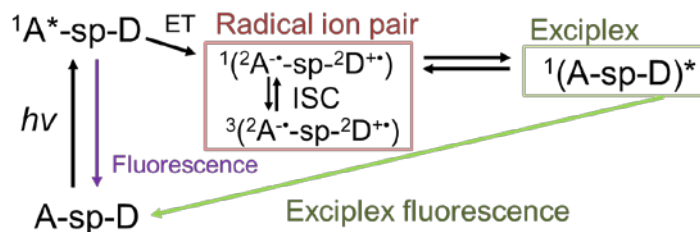


図1. 磁場効果の反応スキーム

光照射によって励起されたアクセプター分子 (A) は、輻射及び無輻射による失活か、分子内で電子移動 (ET) を生じる。生成された一重項ラジカルイオンペア $^1(^2A^{\cdot-}-sp-^2D^{+\cdot})$ は、ラジカル間距離が遠い場合、三重項ラジカルイオンペア $^3(^2A^{\cdot-}-sp-^2D^{+\cdot})$ と項間交差 (ISC) する。ラジカル間距離が非常に近接している場合、一重項エキシプレックス $^1(A-sp-D)^*$ と平衡状態にある。磁場を印加することで $^3(^2A^{\cdot-}-sp-^2D^{+\cdot})$ のエネルギー準位がゼーマン分裂するため、非印加時に比べて ISC は阻害される。つまり、 $^1(^2A^{\cdot-}-sp-^2D^{+\cdot})$ は磁場非印加時に比べて、印加時で存在割合が大きくなる。 $^1(^2A^{\cdot-}-sp-^2D^{+\cdot})$ は $^1(A-sp-D)^*$ と平衡にあるため、結果としてエキシプレックス蛍光も増加する。エキシプレックスとは、ドナー分子 (D) とアクセプター分子 (A) が近接することで、摂動による軌道が生じ、その軌道に電子が移動することで安定化して生じる錯体のことである (図 2)。この錯体からの蛍光は、通常の蛍光より長波長に生じる。

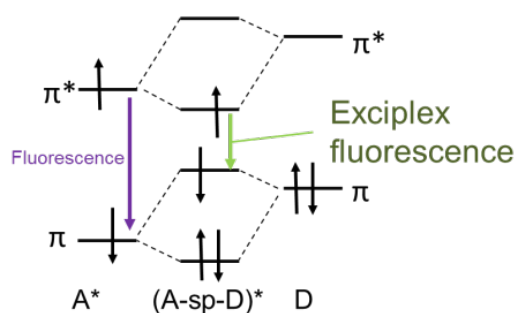


図 2. エキシプレックスの概略

3. 結果と考察

3.1. 磁場応答性を有する蛍光プローブ分子の合成と物性評価

蛍光イメージングへの応用を目指し、以下の条件を満たす磁場応答性連結系分子を合成した。

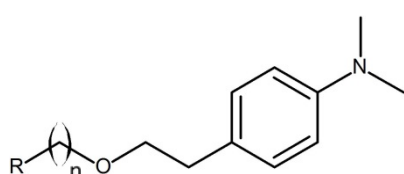
- ① 可視光励起を可能にするため、アクセプター分子が可視域に吸収を有する。
- ② 二分子系で強いエキシプレックス発光を生じる。
- ③ 二分子系で磁場効果が生じる。

ドナーとアクセプター分子が近距離にいる場合、交換相互作用により一重項と三重項間

にエネルギー差が生じてしまう。よって、生成された RIP が交換相互作用の影響を及ぼさない距離 R まで遠ざかることが可能な長さのスペーサーを用いる。この時、交換相互作用 $2J$ は、下記の式で表される。

$$|2J(r)| = |2J_0| \exp(-\alpha r)$$

ここで、 r はラジカル間距離である。Phenanthrene と DMA (*N,N*-dimethylaniline) における $2J$ の値は、先行研究 [1] より 12 Å で 3 G 程度になる。合成した分子の構造と磁場効果、エキシプレックス蛍光強度を以下に示す。



| R | MFE ($\epsilon = 20.7$) | F_{ex}/F_{fl} |
|------------------------|---------------------------|-----------------|
| Perylene (n = 10) | 0 | >0.01 |
| Perylene (n=6) | 0 | >0.01 |
| Anthracene (n=10) | 17.5 | 0.05 |
| Methylantracene (n=10) | 18.1 | 0.06 |

図3. 合成した連結系分子と磁場応答特性

ここで、 MFE (Magnetic field effect) は、 $\{F_{ex}(B) - F_{ex}(0)\}/F_{ex}(0)$ で表される。 $F_{ex}(B)$ は磁場存在下でのエキシプレックス蛍光強度、 $F_{ex}(0)$ は磁場を印可していないときのエキシプレックス蛍光強度である。 F_{fl} はアクセプター分子の発光強度を示す。

Methylantracene と DMA の連結系分子では、上記条件の①と②を十分に満たすが、③は二分子系の発光強度に比べると大きな減少が見られた。これは、methylantracene の蛍光寿命が 5.8 ns と短寿命のため、DMA との電子移動が十分に行われなかったことに起因すると考えられる。

3.2. 新規測定手法の開発

開発した連結系分子の蛍光強度は、外部磁場のオンとオフで制御可能である。この特性を応用した磁場効果イメージングの観測結果の一例を説明する。右図のように、磁場応答がある領域(A)と、ない領域(B)にわけ、そこにランダムな背景光(C)を加える。領域 A が外部磁場強度によって蛍光強度の増減を示すのに対し、領域 B, C は磁場に対しての応答性はない。このような環境を実際に作成し、観測した(図 4)。具体的には、永久磁石をステッピングモーターに取り付け、試料付近の外部磁場を 0.25 Hz の周波数で印加した。

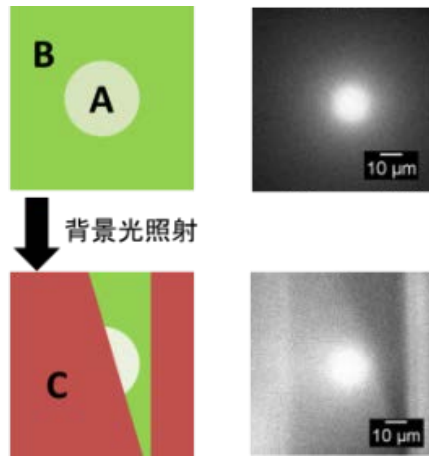


図4. 磁場効果イメージングの検証方法

実験により得られた動画のピクセル毎の強度変化は、領域 A でのみ周波数成分が存在することになる。自作のプログラムを用いた数値計算処理によって目的帯域の強度変化を抽出し、再構築することで領域 C が取り除かれた動画を得ることができた(図 5)。復調作業により得られた蛍光画像を、z 軸と蛍光強度とし surface plot したものが図 6 である。背景光 C を除去し、磁場応答領域 A のみを抽出することに成功した。

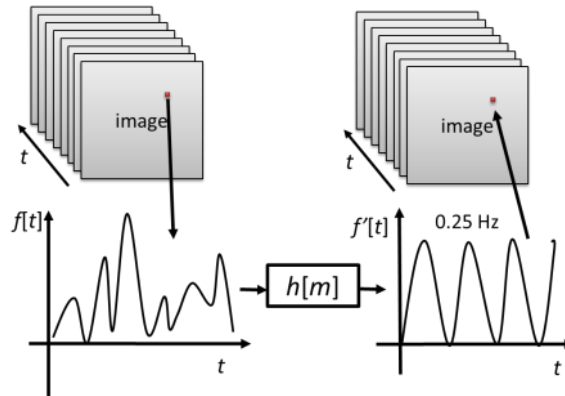


図5. 数値計算処理の概略図

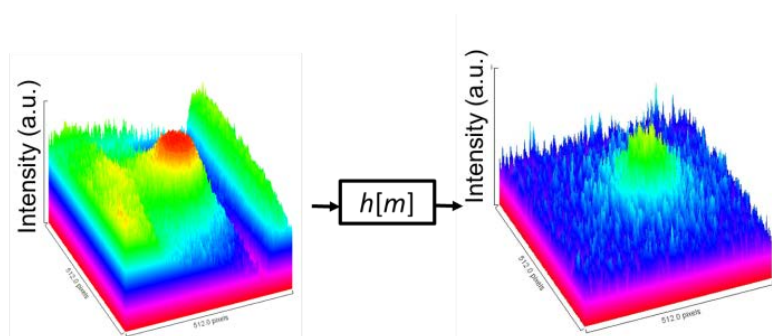


図6. 磁場応答部位の抽出

引用文献

[1] H. Cao, Y. Fujiwara, T. Haino, Y. Fukazawa, C.-H. Tung, Y. Tanimoto, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1996, 69, 2801-2813.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

無し

[口頭発表]

無し

[ポスター発表]

1. 櫻井学, 小堀康博, 立川貴士 「光誘起電子移動反応における磁場効果を利用した新規蛍光顕微鏡観察手法の開発」, 日本化学会第97春季年会(2017) 慶應義塾大学 日吉キャンパス (2017. 3. 16)
2. 櫻井学, 小堀康博, 立川貴士 「光誘起電子移動反応における磁場効果を利用した新規蛍光イメージング法の開発」, 第56回電子スピンサイエンス学会年会(SEST2017) 東京工業大学 大岡山キャンパス (2017. 11. 16)

[その他]

無し