

■受領No.1381

近赤外領域における高効率二光子吸収性・蛍光発光性を有する新奇ピレン誘導体の開発

代表研究者

仁子 陽輔

高知大学教育研究部総合科学系複合領域科学部門 助教



1. 研究目的

蛍光イメージングとは、生細胞や生体中に導入した蛍光色素を励起（光照射）・発光させることでその発光点付近を画像化する光学技術であり、高い時空間分解能を有することに特徴がある。中でも、色素分子が示す非線形光学現象「二光子吸収」を利用した二光子蛍光イメージングでは、生体透過性の高い近赤外光での色素励起が可能となるため、生体“深部”の細胞・組織・器官の観察をも実現する。こうした二光子蛍光イメージング技術が進展することで、例えば生体内の免疫細胞などの動態観察が可能となり、様々な炎症性疾患の機構・治療法の解明に繋がると期待される。

本研究課題では、二光子蛍光イメージングによる生体内観察可能深度の飛躍的向上を目的とし、「長波長領域での高効率二光子吸収性と蛍光発光性を両立した新奇蛍光色素開発」を推進する。より具体的には、生体分子（リボフラビンなど）による阻害を限りなく小さくし得る>900nm領域における高効率二光子吸収と>600nm領域における蛍光発光を示す蛍光色素分子の開発を行っていく。

2. 研究内容

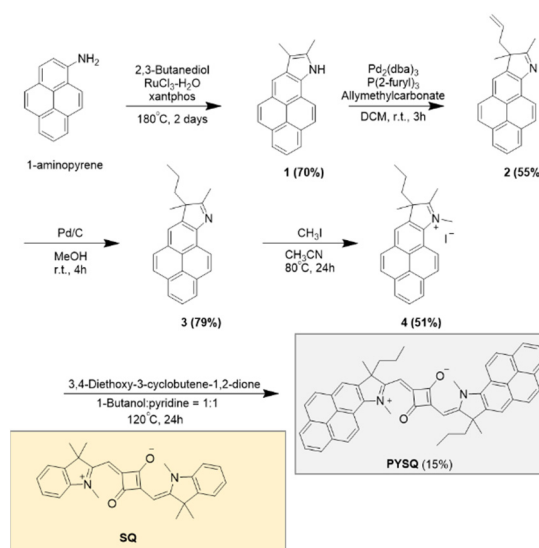
2.1 ピレン-スクアレインハイブリッド型色素

PYSQ の設計と合成

本研究を推進する上で、研究代表者は二種類の蛍光発色団に着目した。一つはピレンであり、その誘導体は比較的長波長領域に二光子吸収性と蛍

光発光性を示す傾向にある。もう一方はポリメチン骨格を有する色素群（シアニン類）であり、二光子吸収波長は短波長でありながらも、強力な二光子吸収性と蛍光発光性を示す。そこで本研究では、上記ピレンとポリメチン骨格、中でも強力な二光子吸収性を有する高輝度性色素であるスクアレイン構造（SQ）をハイブリッドしたPYSQを設計した（Scheme1）。

まず、1-アミノピレンを原料としたインドール誘導体1の合成を行った。続いて、同インドール構造からインドレニン誘導体2を合成し、続く水素添加によって3を得た。同化合物をメチル化して4を得た後、四角酸エステルとの縮合によって目的物PYSQを得た。



Scheme1. PYSQ の合成

2.2 PYSQ の光物性

培養細胞のイメージングに多用される SQ と比較しつつ、PYSQ の有機溶媒中における種々の光物性を測定した (Figure1)。SQ は遠赤領域 (~650nm) に一光子吸収と蛍光を示すのに対し、PYSQ は大幅にレッドシフトした近赤外領域 (>700nm) に一光子吸収と蛍光発光性を示した。また、PYSQ の輝度 (モル吸光係数 × 蛍光量子収率) は $125,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (1,4-ジオキサソ中) を超え、SQ と同等かそれ以上の値となったことから、PYSQ 非常に高輝度な近赤外蛍光色素であると言える。

次に、PYSQ と SQ のジオキサソ溶媒中における光安定性の比較を行った (Figure2)。両色素において、同じ吸光度となる波長で一定時間光励起しながら蛍光強度をモニタリングしたところ、SQ の蛍光強度は3時間後には20%弱ほど低下したのに対し、PYSQ は10%程度の低下にとどまった。したがって、PYSQ は SQ よりも高い光安定性を有していることがわかる。

最後に、PYSQ および SQ の二光子吸収スペクトルの測定を行った (Figure3)。PYSQ は、1300nm 付近において SQ の4倍に相当する4000GM (GM : 二光子吸収の効率を表す単位。汎用色素のローダミンBが200GM) という巨大な二光子吸収断面積を示した。さらに特筆すべき点として、PYSQ は1000nm 付近においても1000~2000GM という大きな値を示したことが挙げられる。二光子蛍光イメージングにおいて、1300nm という波長は生体中の水分子に吸収される (= 阻害される) 上、励起光源が殆ど存在しないために実際には利用性が低いという欠点がある。他方、1000nm 付近には高出力で駆動する「超短パルスファイバーレーザー」と呼ばれる安価かつ可搬性に優れた光源が存在するため、同領域に二光子吸収性があるというのは利用上極めて大きな利点となる。したがって、PYSQ はファイバーレーザーで二光子励起が可能な高輝度近赤外蛍光色素であると言える。

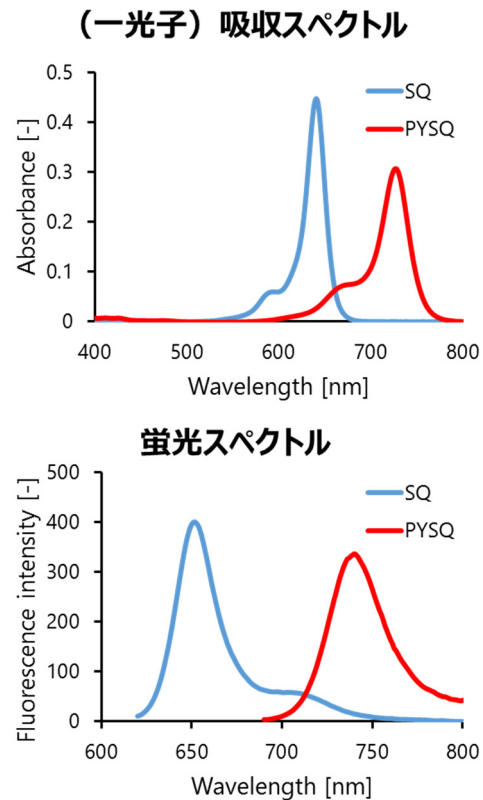


Figure1. SQ および PYSQ の (上) 一光子吸収 (下) 蛍光スペクトル (測定溶媒: 1, 4-dioxane)

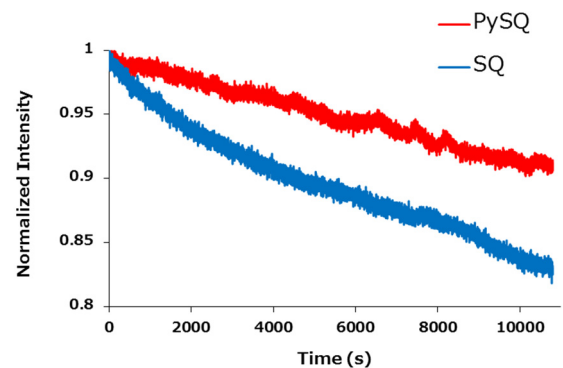


Figure2. SQ および PYSQ の光安定性試験 (測定溶媒: 1, 4-dioxane)

こうした PYSQ の特性は、基本的にはピレンという剛直かつ広い π 電子共役系を有する分子を SQ に適用したことで得られたものである。他方これまで、クロスカップリング反応によって SQ とピレンをビニル基、あるいはエチニル基で連結し

たハイブリッド色素が開発された例がある (K. D. Belfield et al. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 7829)。しかし、今回のPYSQはそれらのハイブリッド色素よりもさらに30~40nmほど長波長領域で光吸収・蛍光性を示すことから、今回の分子設計で特に重要であったのはSQのインドール部分をピレン骨格へと拡張した点にあり、この設計が最も効果的にSQ誘導体における π 電子共役系を拡張させるのだと考えられる。

2.3 まとめ

ピレンを基盤としたスクアライン誘導体を合成することにより、汎用蛍光団であるSQよりも高輝度かつ安定で、さらに生体透過性の高い近赤外領域に蛍光性を有する新奇色素 PYSQを開発することができた。また、PYSQは当初の目標としていた900nmより長波長、特にファイバーレーザー励起が可能な1000nm付近において強力な二光子吸収性があることが判明した。

他方、PYSQを生体二光子蛍光イメージングへと応用するには未だ大きな壁が存在する。PYSQは生体透過性の高い近赤外領域での蛍光発光を可能とするものの、同領域の蛍光を効率的に検出する光電子増倍管を備えた二光子蛍光顕微鏡は殆ど存在しないのである。したがって、今後は顕微鏡作成を可能とする研究者との共同関係を強化していき、PYSQを活用した生体超深部観察に取り組んでいきたいと考えている。

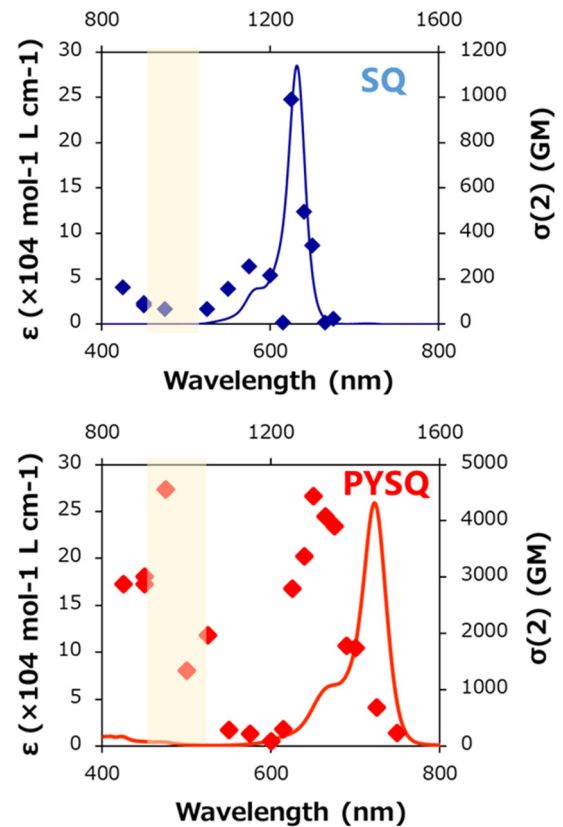


Figure3. SQ および PYSQ の二光子吸収スペクトル (測定溶媒：1, 4-dioxane)

3. 発表 (研究成果の発表)

1. 磯江真綺, 大西省三, 鈴木康孝, 川俣純, 金野大助, 波多野慎悟, 渡辺茂, 仁子陽輔, 高効率二光子吸収性・近赤外発光性を両立したスクアライン型ピレン誘導体の開発, 高知化学シンポジウム2019, 高知工科大学 永国寺キャンパス, 高知 (2019/10/12)
2. 特願 2019-153789, 仁子陽輔, 波多野慎悟, 渡辺茂, 磯江真綺, “ピレン蛍光色素”, 国立大学法人高知大学, 2019年8月26日出願

4. 謝辞

本研究の遂行にあたり、二光子吸収断面積測定や二光子蛍光イメージングは、山口大学大学院創成科学研究科の鈴木康孝准教授・川俣純教授のご協力を得て行われました。また、未だ実験途中ではあるものの、マウスを用いた二光子蛍光イメージングにおいて愛媛大学医学系研究科の今村健志教授・川上良介准教授にご助力いただきました。最後に、筆者の研究室は設立して間もなく、あらゆる設備に不足がある中、日立財団のご支援により数多くの実験を行うことができましたこと、深く感謝申し上げます。