

蛍光性ナノクラスター粒子を用いた超高分解能イメージング法の開発

[1] 組織

代表者：井上 康志

(大阪大学大学院生命機能研究科)

対応者：川田 善正

(静岡大学電子工学研究所)

分担者：石飛 秀和

(大阪大学大学院生命機能研究科)

[2] 研究経過

本研究では、研究代表者らのグループが開発した蛍光性ナノクラスターの成果と静岡大学で開発を進めている電子線励起による超高分解能光学顕微鏡の成果を融合し、より高輝度・高感度な高分解能光イメージング法を開発することを目的とする。具体的には、ナノクラスターの合成過程評価、電子線照射によるナノクラスターの発光解析、耐久性、エネルギー変換効率などを検討し、バイオイメージングへ応用する。

数個から 10 数個程度の原子で構成される金属ナノクラスターはバルク金属とは異なり、蛍光を発する。この蛍光性金属ナノナノクラスターは、化学的に安定であり、またそのサイズが有機系蛍光分子と比べ非常に小さいことから、細胞毒性が低く、生体イメージングのための蛍光プローブとして注目を集めている。特に構成する原子数を変化させることで、蛍光波長を制御できる点が優れている。よって、有機蛍光分子、遺伝子発現型蛍光分子 (GFP)、半導体量子ドットに続く、第 4 の蛍光プローブとして認識されつつある。これまで、金や銀などの蛍光性ナノクラスターが報告されているが、研究代表者のグループでは、量子収率が高く、触媒作用も期待できる Pt (白金) ナノクラスターの合成を行っている。これまで、青色蛍光性白金ナノクラスター (蛍光波長：470 nm、励起波長：380 nm) と緑色蛍光性白金ナノクラスター (蛍光波長：520 nm、励起波長：460 nm) の合成に成功している。また実際に癌細胞イメージングに応用し、低細胞毒性であることを確認している。これら蛍光性白金ナノクラスターは室温下でポリアミドアミン(PAMAM) dendrimer を鋳型分子として利用し合成されている。また質量分

析測定の結果から、これらの白金ナノクラスターはそれぞれ 5 個と 8 個の白金原子から構成されていることを明らかにした。生体イメージングには光散乱効率の低い長波長の励起光及び蛍光を用いるほうが望ましい。

本プロジェクトは本年度が初年度であった。生体イメージングに適しているより発光波長の長い (構成原子数が多い) 蛍光性白金ナノクラスターの合成を目指し、合成過程の評価を行った。

ナノクラスターの合成において鋳型分子は、ナノクラスターのサイズを決定する重要な働きを担っている。鋳型分子として用いる PAMAM dendrimer は、内部に均一なナノサイズの空孔と白金イオンと結合可能なアミノ基を持つ。白金イオンは PAMAM dendrimer に取り込まれ、内部でこのアミノ基と金属錯体を形成する。ここに還元剤を加える事で白金イオンが還元され白金ナノクラスターが合成される。つまり PAMAM dendrimer は白金イオンを反応させる分子の反応場として働く。本研究では、白金(II)イオンと PAMAM dendrimer の結合による Ligand to Metal Charge Transfer の吸収を測定することで錯体形成メカニズムの定量評価を行った。また、還元剤であるクエン酸三ナトリウムを用いて白金(II)イオンと PAMAM dendrimer (G4) の金属錯体を還元させることでナノクラスターを合成し、その光学特性を評価した。

以下、研究活動状況の概要を記す。

研究打ち合わせ：随時 (電子メールによる報告、議論)

[3] 成果

(3-1) 研究成果

錯体形成メカニズムから、内包される白金イオンの数が多くなるほどサイズの大きな白金ナノクラスターを合成できることが想定される。錯体形成数は白金(II)イオンと PAMAM dendrimer (G4) の混合比、PAMAM dendrimer に白金イオンを加えてからの反応時間、溶媒の pH に依存する。錯体形成を評価するため、錯体に寄与する結合に注目した。この白金(II)イオンと窒素原子の結合は、253 nm に

吸収を持つ。この吸収は Ligand to Metal Charge Transfer (LMCT) と呼ばれるエネルギーの遷移によるものである。この LMCT の吸収は、Pt-N の結合である錯体形成数に比例する。

①白金(II)イオンと PAMAM デンドリマーの混合比を変化させながら、紫外分光法による吸光度測定を行った。その結果、白金(II)イオンと PAMAM デンドリマー (G4) の混合比が 40:1 までは吸光度は線形的に増加し、最後に飽和することが分かった。混合比が 40:1 の場合、錯体形成数が最大になり、それ以上の混合比では白金(II)イオンが余剰となり、ナノ粒子が発生してしまう事が考えられる。よって以下の実験では 40:1 の混合比で錯体形成評価及び合成を行うこととした。

②白金(II)と PAMAM デンドリマー (G4) の紫外分光法による吸光度の時間変化測定を行った。その結果、混合後 1 週間で 253 nm の吸光度が最大になり、その後安定することが分かった。つまり、混合後 1 週間で錯体形成数が最大になった。

③PAMAM デンドリマーは、pH の値によって構造が閉じたり開いたりすることが分かっている。具体的には、塩基性下では閉じた構造、酸性下では開いた構造をとる。よって、PAMAM デンドリマーの構造が開いている時と閉じている時では、白金(II)イオンの取り込まれやすさに違いが出る事が予想される。また白金イオンも pH と塩化物イオンの濃度の違いによって、構造が変化する。そこで pH を変化させ、PAMAM デンドリマー (G4) と白金(II)イオンの構造が変化した際の吸光度の時間変化測定を行った。その結果、塩基性条件下(pH = 11)で最も LMCT の吸収ピークが高くなることが分かった。この結果は、pH による PAMAM の構造変化では説明がつかず、白金(II)イオンの pH による構造変化によるものであることが分かった。塩基性条件下では、カルボキシル基が最も白金(II)イオン錯体中に存在すると考えられるので、錯体形成が最も進行したと考えられる。また、pH の値が酸性に近づくほど錯体形成が起こりにくくなっている。これは、酸性条件下では、白金イオン錯体にカルボキシル基が少なくなることに加え、水溶液中に水素イオンが多くなると PAMAM デンドリマー(G4)のアミノ基と水素イオンが結合してしまうことが原因であると考えられる。

白金(II)イオンを還元し、ナノクラスターを合成し、その発光特性を調べた。上記の実験結果から、錯体形成時間を 1 週間に固定し、白金(II)イオンと PAMAM デンドリマー (G4) の混合比及び pH を変化させながら、励起-発光マトリックスを測定した。

LMCT の吸光度が最も大きくなる条件であった塩基性下(pH = 11)で白金(II)イオンと PAMAM デンドリマーの混合比が 40:1 の場合、最も錯体形成が進行しているため、サイズの大きなクラスターが合成できる可能性があった。しかしながら、蛍光を観察することができなかった。還元後のサンプルの吸収スペクトルから、可視光域に吸収を持っていることが分かった。これは、サイズが大きいナノ粒子ができてしまったため、蛍光ではなくプラズモン共鳴による吸収が生じてしまっているのだと考えられる。錯体が多く形成されていると考えられるサンプルでナノ粒子が合成されてしまった原因として、錯体形成を行う際に、還元剤(クエン酸)を一気に加えて還元してしまった事が考えられる。今後は、還元剤の条件を評価しながら合成を進めていくことが望ましい。

次に酸性条件下(pH = 3)で白金(II)イオンと PAMAM デンドリマー(G4)の混合比が 10:1, 20:1 の場合、青色の蛍光と緑色の蛍光を測定することができた。PAMAM デンドリマー(G4)は青色の蛍光(450 nm)を持つことが知られているため、青色の蛍光には PAMAM デンドリマー(G4)の蛍光が含まれていることが考えられる。しかしながら、PAMAM デンドリマーの量がこの二つのサンプルでは変わらないにもかかわらず青色の蛍光強度が増加しているためこの青色の蛍光の中に白金ナノクラスターが含まれていることが考えられる。緑色の蛍光も白金ナノクラスターの可能性があるが、これらの蛍光が白金ナノクラスターであるかどうかを確かめるためには HPLC で単離、精製した後に質量分析により質量を特定する必要がある。

(3-2) 波及効果と発展性など

本電子線励起光ナノイメージング法では、使用する蛍光材料の輝度、耐久性、チャージアップ、電子の透過性などが課題となっている。研究代表者らが開発した金属ナノクラスターは、電子線に対する耐性が大きく、電子の透過性が低いため試料に電子線が与えるダメージも軽減でき、伝導性を有することからチャージアップの問題も解決できるものと予想する。研究代表者らが開発した金属ナノクラスターを、静岡大学の研究グループが開発している電子線励起光ナノイメージング法に応用することにより、これまでの課題を克服するブレイクスルーになるものと期待している。

さらに本研究で開発する金属ナノクラスターは、耐食性の少ない蛍光試薬として様々なバイオイメージングへの応用が期待できるものであり、その波及

効果は大きいと考える。

[4] 成果資料

(1) X. Huang, K. Aoki, H. Ishitobi, and Y. Inouye, "Facile preparation of fluorescent platinum nanoclusters with different emission wavelengths using hyperbranched PEI as the stabilizing agent," Japan Taiwan Bilateral Conference on Biomedical and Plasmonic Imaging (Taipei, Taiwan, Feb. 25-26, 2014).

(1) (招待講演) Y. Inouye, "Nano-metal for nano-biosensing and biomedical imaging," Japan Taiwan Bilateral Conference on Biomedical and Plasmonic Imaging (Taipei, Taiwan, Feb. 25-26, 2014).

(3) Aoki, X. Huang, H. Ishitobi, and Y. Inouye, "Photoluminescent platinum nanoclusters," UV-DUV Plasmonics and Nanophotonics Workshop (UPN2013) (Osaka, Japan, Oct. 28-29, 2013).

(4) T. Tokuyama, K. Aoki, X. Huang, H. Ishitobi, and Y. Inouye, "Photoluminescent Platinum Nanoclusters," 応用物理学会関西支部 平成 25 年度第 3 回講演会(大阪大学フォトンクスセンター、2014 年 2 月 28 日)

出張報告

なし