

研究報告書

「光機能性量子ドットを用いた単一分子神経活動イメージング」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 小阪田 泰子

1. 研究のねらい

X 線や可視光などの“光”を利用したイメージングは、工業的利用や、医療やライフサイエンス分野などに、幅広く応用されている。このイメージングを可能にするには、言うまでもなく、調べたいところを可視化する、つまり、調べたいところを明瞭にするために、コントラストを付けたり、光るようにするが必須となる。特に、後者の“光る”ことを可能にするには、“光る”プローブと“光”との相互作用に着目しプローブを設計する必要がある。これまでに、“光る”プローブとしては、有機色素、蛍光タンパク、そして、ナノ粒子等が用いられてきた。中でも、ナノ粒子は、その特異な電子的・光学的性質から、物理学のおよび生物学的なイメージングへの利用、応用の可能性が注目されてきた。とりわけ、このナノ粒子を利用した生物応用の一つである、生体一分子イメージングは、生体一分子の個々の細胞内でのダイナミクスや、マウスといった実験動物レベルでの分子の可視化のツールとなりうる事が期待されている。しかしながら、これらのナノ粒子を用いたイメージングは、生体適合性などの問題点から、多くが開発途上であり、特に、細胞内や個体での生物学的な現象を自在に可視化し、生物学的機構を明らかにすることは困難であった。

本さきがけ研究では、神経系などの細胞や個体レベルでの自在な単一分子レベルでのターゲットとする生体分子のイメージングを実現し、生物学的知見を得ることを研究のねらいとした。その目標達成のためには、まず調べたい場所で“光る”機能を持つ光機能性ナノ粒子の開発を行うことが必要で、その技術を元に、例えば神経細胞内での軸索輸送などのダイナミクスを個体レベルで観察できる技術開発が進めば、神経細胞内での一分子リアルタイムイメージングへの応用へとつながり、生物学的機構を調べることが可能なツールの一つとなりうると考えた。また、細胞のみならず、マウスなどの個体を対象としたイメージング、および、将来の革新的な医療イメージング技術の開発を目指すために、医療でよく用いられている硬 X 線励起によるイメージングや光操作法の開発を狙い、X 線励起発光に関する研究を開始した。もし、この技術が実現されれば、透過性の高い硬 X 線を照射光源として用いることで、個体のあらゆる部位に存在するターゲット生体分子をラベル化し検出する、あるいは、光操作できるような革新的手法を開発できると考えた。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、1. 光によって発光を自在に制御できる光機能性ナノ粒子の開発を行った。スイッチングの鍵となる分子であるジアルリエテンをドーブした蛍光性ポリマーナノ粒子を合成した。このナノ粒子を用いることで、光照射により、発光が制御でき、固定した細胞レベルでの蛍光スイッチングが可能になった (研究テーマ A)。また、2. 医療でよく用いられている硬 X 線

を励起光源として照射することで発光し、生体適合性の高いナノ粒子を開発した。具体的には、イリジウム錯体をドープしたポリマーナノ粒子やタンパク質により内包された金クラスターが硬X線照射により発光することを明らかにした（研究テーマBC）。これらの研究では、従来、全く知られていなかった生体適合性の高いソフトなナノ粒子からの硬X線励起発光を始めて明らかにし、新たな光イメージング技術のポテンシャルを示した。

(2) 詳細

研究テーマA「光スイッチング機能を有するナノ粒子の開発」

光によって、発光をスイッチングすることで、調べたいところを可視化するナノ粒子を開発することを目的とした。近年、光スイッチングに基づく超解像度イメージングが報告され、より輝度の高いナノ粒子で光スイッチングを行うことが出来れば、新しいイメージング手法の開発につながる可能性も示唆された。しかしながら、研究開始時には、水に可溶性、そして明瞭にシグナルをオンオフすることの出来る光スイッチング粒子は全く報告されていなかった。そこで、本研究では、水に可溶性で、発光のオンとオフを光で制御できる、発光ナノ粒子の開発を目指した。光スイッチングのスイッチとして働く分子として、ジアルルエテンを用いた。このスイッチング分子を、蛍光性のポリマーナノ粒子の中にドープし、光スイッチング可能なナノ粒子を作製した。作製した溶液に、紫外光の照射で蛍光のオフ、可視光の照射で、蛍光の回復が見られ、蛍光のスイッチングが可能なが分かった。また、固定した細胞の微小管をこの光スイッチングナノ粒子で染色し、光スイッチングを行った。その結果、細胞でも、光スイッチングが繰り返し可能であることが分かった。以上のように、光スイッチング機能を有するナノ粒子を用いることで、細胞レベルで、光で見たい場所を照らすことが、光により制御することが出来る技術が開発できた。本研究は、英国王立化学会雑誌の *Chem. Commun.* に掲載され、バックカバーに研究が紹介された。

研究テーマB「イリジウム錯体をドープしたポリマーナノ粒子での硬X線励起発光の実証」

生体透過性の高い硬X線を励起光源として、自在にナノプローブを光らせ、イメージングに応用することは可能であろうか？もし実現すれば、イメージングのみならず、発生した発光を光反応に利用するといった様々な展開が考えられる。しかしながら、生体で応用できるプローブが硬X線励起で発光するといった研究は報告されていなかった。そこで、硬X線励起で発光

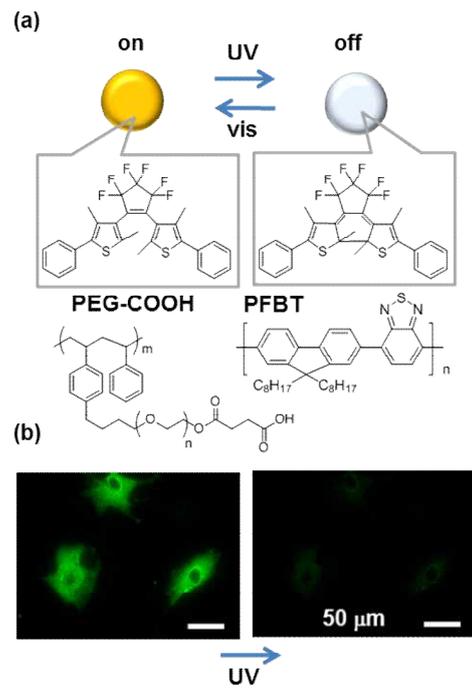


図1. (a) 光スイッチング可能なポリマーナノ粒子。両親媒性の PEG-COOH ポリマーと蛍光性ポリマーPFBT からなるポリマードットに、スイッチング分子ジアルルエテンをドープすることで、蛍光を光で制御可能。(b) 細胞での蛍光スイッチングの一例。

する生体適合性の高いナノ粒子の開発に着手した。硬X線をまず吸収する分子として、電子密度の高い遷移元素錯体である、イリジウム錯体を用いることを考えた。上記のポリマーナノ粒子にイリジウム錯体をドープすることで、発光性のナノ粒子を作製した。このナノ粒子は、従来、イリジウム錯体は、酸素で消光されるため、通常のイメージングには使うことが出来なかったが、ポリマーナノ粒子中にドープすることで、酸素に関係なく光ることが、まず分かった。この光るナノ粒子が、硬X線励起でも光るか、実際に硬X線を照射し、発光を CCD カメラで撮影することにより調べた。その結果、このイリジウムナノ粒子は、硬X線照射により発光することが分かった。ポリマーのみや、イリジウム錯体なしでは、有意な発光が観測されなかったことや、硬X線励起発光スペクトルがイリジウム錯体の発光に帰属されたことから、このナノ粒子により、確かに発光が生成していることが、実証された。本研究は、*Chem. Commun.* の Emerging investigator issue に掲載され、バックカバーに採用された。

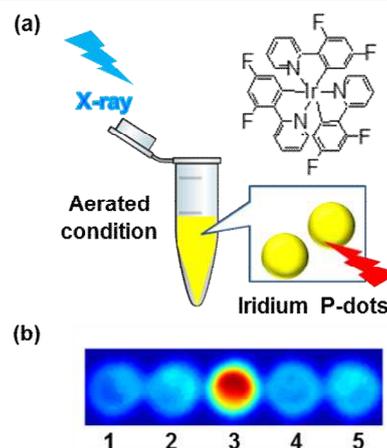


図2. (a)硬X線励起により発光するポリマーナノ粒子。酸素存在下でも、硬X線照射によりイリジウム錯体由来の発光が観測される。(b)イメージングの一例。3のイリジウム錯体をドープしたポリマードットで発光が見られた。

研究テーマC「タンパク質により内包された金クラスターでの硬X線励起発光」

次に、硬X線を吸収し発光する分子の候補として、金属クラスターに着目した。特に、生体適合性の高い生体分子により内包された金属クラスターが、硬X線励起発光を示すのではないかと考えた。可視光励起で発光することが知られている一本鎖DNA-Ag_x、リゾチーム-Au₈ およびウシ血清由来アルブミン(BSA)-Au₂₅ において、硬X線励起で発光が見られるかどうかを、硬X線照射により調べた。興味深いことに、一本鎖DNA-Ag_x、リゾチーム-Au₈ では目立った発光は確認されなかった。一方、BSA-Au₂₅ では、明瞭なコントラストが確認されたことから、硬X線励起により、発光することが分かった。このことは、硬X線励起発光は、これまで光源に用いられてきた紫外線や可視光励起とは、全く異なった発光の挙動を示唆するものである。本研究は、*Chem. Commun.* に掲載され、Inside front cover に採用された。

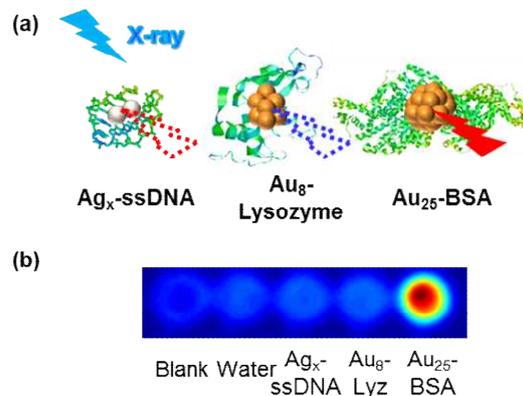


図3. (a)金属クラスターでの硬X線励起発光。(b)硬X線励起により、BSA-Au₂₅ 由来の発光が見られた。

3. 今後の展開

本研究では、光とナノ粒子の相互作用を基盤とし、蛍光スイッチングによるイメージングや硬X線励起発光によるイメージングを実証した。前者の光スイッチングナノ粒子を神経などのリアルタイムイメージングに応用するには、粒子サイズのコントロールや局所的な光照射および観察方法を工夫する必要がある。これらの改良により、時空間的に発光を制御することで、細胞や個体でのタンパク質の輸送機構などをトラッキングするイメージング研究への展開が期待される。後者のX線励起による発光は、本研究で、見出したソフトなナノ粒子でのX線励起発光の機構解明を行い、より発光効率の高いナノ粒子開発への指針を得ることでさらに高感度化が可能である。また、発光波長をより長波長化することで、より生体イメージングに適したナノ粒子開発を行うとともに、検出感度の向上などを行うことで、革新的なX線イメージング法の実現に一步近づくことが出来ると考える。また、発光を経た光反応による活性酸素種の発生やアンケーシングへの利用といった様々な応用にも展開が期待される。今後、様々な光を使い尽くすことで、光とナノ材料の相互作用を基盤とした一分子レベルでの神経などの生体分子をターゲットとした光による細胞、個体イメージング法や操作法の開発へとつなげていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究では、将来の単一分子レベルでの生体分子の自在な神経イメージングの実現を狙った、新規光機能性ナノ粒子の開発を行った。当初目的とした光スイッチング可能なナノ粒子の開発し、また、ソフトなナノ粒子からの硬X線励起発光を始めて見出した。後者のX線発光に関する研究は、さきがけ研究開始当初にねらいとして設定した、光スイッチングを可能にするナノ粒子の開発の過程で、積極的に光を存分に利用する研究を考えた結果、硬X線の光としての利用に関する研究に発展した。このソフトなナノ粒子でのX線励起発光の発見は、研究開始当初には全く予想していなかった大きな副産物で、プラスに評価できる。しかしながら、当初の目的である、神経などの生体イメージングは、様々な手法を試みたが、さきがけ期間中に実現するには至らなかったが、これまでの経験を元に、更なるプローブや観察方法などの改良により、近い将来の実現に向け、引き続き取り組んでいきたい。今後も、様々な“光”を巧みに使い尽くすことで、ナノ材料や生体関連物質を含めた物質材料、生命機能と、“光”との相互作用を基盤にし、光機能性材料の開発に加え、神経のダイナミクスを自在に調べる、あるいは操ることの出来る革新的なイメージング手法や光操作法の開発を達成し、生物学的機構解明に関する研究や応用研究に展開したい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

ナノ粒子を利用した生体イメージングは、生体分子の細胞内でのダイナミクスや動物レベルでの分子の可視化のツールとして期待されており、多くの関連研究が行われている。しかしながら、将来の革新的光イメージング技術の開発に向けて、さらに新しい特性をもった光機能性ナノ粒子の開発が必要である。

小阪田研究者は、光スイッチ可能な量子ドットを開発し、光ナノ加工技術と一分子計測法と組み合わせ、光による in vivo でのリアルタイム単一分子イメージングを可能にし、神経のネットワークを光により解き明かすことを目指した。そのために、光によって発光を自在に制御できる光

機能性ナノ粒子として、スイッチングの鍵となる分子であるジアリルエテンをドーブした蛍光性ポリマーナノ粒子を合成した。このナノ粒子を用いることで、光照射により、発光が制御でき、培養した細胞レベルでの蛍光スイッチングが可能になった。また、硬X線を照射することで発光する生体適合性の高いナノ粒子として、イリジウム錯体をドーブしたポリマーナノ粒子やタンパク質により内包された金クラスターを開発した。

試行錯誤の末、目的を達成するための技術要素をいくつか開発した段階である。このさきがけ研究で、従来、全く知られていなかった生体適合性の高いソフトなナノ粒子からの硬X線励起発光現象を見いだしたことにより、新たな光イメージング技術のポテンシャルを示した。生体深部に照射できるX線により、発光させるシンチレーションとして機能させるのみならず、ガスメディエーターを放出させるなどの様々な応用が期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Osakada, Y.; Hanson, L.; Cui, B., "Diarylethene doped biocompatible polymer dots for fluorescence switching.", Chem. Commun. 2012, 48, 3285–3287. (バックカバー)
2. Osakada, Y.; Prax, G.; Hanson, L.; Solomon, P.E.; Xing, L.; Cui, B., "X-ray excitable luminescent polymer dots doped with an iridium(III) complex.", Chem. Commun. 2013, 49, 4319–4321. (バックカバー, emerging investigator issue)
3. Osakada, Y.; Prax, G.; Sun, C.; Sakamoto, M.; Ahmad, M.; Volotskova, O.; Ong, Q.; Teranishi, T.; Harada, Y.; Xing, L.; Cui, B. Hard X-ray-induced optical luminescence via biomolecule-directed metal clusters. Chem. Commun. 2014, 50, 3549–3551. (インサイドフロントカバー)

(2) 特許出願

該当なし。

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Yasuko Osakada, "Synthesis of photoswitchable polymer dot and its application", 2011 光化学討論会、2011年9月6日、宮崎(口頭発表)
2. Yasuko Osakada, "X-ray excited luminescent polymer dots doped with iridium(III) complex", International conference on photochemistry 2013, Leuven, Belgium, 2013年7月23日、(口頭発表)
3. 小阪田泰子「X線照射によって発光するナノプローブ」2013年光化学討論会、シンポジウム4、輝く若手研究者たち～分子光化学の進化を目指して～2013年9月13日、愛媛大(招待講演)