

# 研究終了報告書

## 「磁場応答光プローブを用いた磁場による断層選択光イメージング」

研究期間：2017年10月～2021年3月

(新型コロナウイルス感染症の影響を受け2021年9月まで延長)

研究者：萬井 知康

### 1. 研究のねらい

本研究では、低磁場により発光の制御が可能な分子プローブを開発し、そのプローブを用いた新イメージング技術の創出を目指す。磁場強度に影響を受ける分子スピンシステム(ラジカル対)を経由する反応系を光プローブの光物理過程に取り入れることで、分子発光を磁場により制御できる磁場応答光プローブの開発が可能である。モデル分子における磁場による発光性制御の確立と新規分子を利用したイメージング法の原理実証実験の達成を目指す。この研究の将来的な目標は、開発する磁場応答光プローブを基にした新たな生体光イメージング技術を生命科学の基盤技術の一つにすることである。期待される磁場応答光プローブを基にしたイメージング技術では、傾斜磁場をかけることで特定範囲にのみ有効な磁場を与え、その範囲にある分子の発光のみをオン(またはオフ)にできる。つまり、分子発光の空間的制御による分解能の向上が可能となり、回折限界を超えるような空間分解能を持った3次元光トモグラフィーや、磁場を利用した超解像顕微鏡技術など、生命科学の基盤技術開発が期待できる。これらの応用を可能にするには、常温・溶液中で可視光から近赤外で光励起・発光し、適切な磁場効果を持つ光プローブ分子が必要である。しかしながら、そのような分子はまだない。分子発光における磁場効果は知られているが、生体イメージングに関連のある常温・溶液中における分子発光の磁場効果の研究は進んでいない。本研究では、ラジカル対内のスピン状態が磁場により変化するという量子性に着目し、2つのねらいの達成を目指した。まず、イメージング技術の基礎となる、磁場効果を示す発光を持つ分子の合理的設計と磁場効果の最適化をねらい1とした。量子化学・合成・分光による分子特性の理解を通して、磁場効果を示す発光を示す単一分子システムの開発を行った。生体イメージングでの使用を念頭に置き、可視光から近赤外領域で励起可能で、発光に磁場効果を持つ分子システムの合理的設計の指針確立を目指した。次に、ねらい1により合成した分子を利用し、磁場による発光の空間的制御の原理実証実験をねらい2とした。特定の磁場をかけた箇所にある分子からの発光のみが断層選択的に測定できることを実証し、断層選択光イメージングが可能であることを示し、技術応用への道筋をつけることを課題とした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

比較的低い磁場強度(1テスラ未満、常温の熱エネルギーより数桁小さい)に影響を受けるスピンシステム(ラジカル対)を経由する反応系をプローブの光物理過程に取り入れることで、分子発光の磁場制御を目指した。ラジカル対内の項間交差(RP-ISC)が磁場により変化するという量子性を利用し(図1)、分子発光を磁場で制御する。分子を光誘起後に生成される一重項励起状態からの電子移動によりスピン選択的に形成される一重項ラジカル対(図1

中の  $^1(D^{\bullet+}-A^{\bullet-})$  )に関連する2つの発光に着目した。一つは、研究開始当初の焦点である一重項ラジカル対が基底状態への放射減衰 (Charge-Transfer (CT) 発光)。もう一つは、一重項ラジカル対が初期一重項励起状態に再結合して起きる遅延蛍光である。可視光から近赤外で光励起でき、この2種類のどちらかの発光を持ち、常温・溶液中において適切な磁場効果を持つようなプローブ分子の開発を目指した。研究期間の間に、モデル分子における磁場による発光性制御の確立 (テーマ A) と、新規分子を利用したイメージング法の原理実証 (テーマ B) の達成を目指した。

テーマ A において、RP-ISC が目標の磁場強度に影響を受けるためには、ラジカル対の距離がある程度離れている必要がある。一方で長距離ラジカル対 (電荷分離状態) が電荷再結合する場合、通常は発光を伴わない。本研究ではインテンシティボローイングという量子効果を利用し、長距離ラジカル対の電荷再結合において CT 発光が起きる

分子群を開発した (第一世代)。ドナーとアクセプターの酸化還元電位、ブリッジ分子の長さなどを調節することで、常温・溶液中でラジカル対の距離が最大 24Å 離れている分子システム (一分子では現在最長) でも CT 発光が起こることを確認した。一方で、第一世代分子群では、常温かつ目標の磁場強度において、発光に顕著な磁場効果は見られなかった。そこで、第一世代の分子群の問題点を克服する形で、新規 D-B-A 分子群 (第二世代) を開発した。それら分子の遅延蛍光において顕著な磁場効果を確認した。さらに、分子中の修飾基と溶媒の極性を変えることで、ラジカル対のエネルギーを変化できる。この変化を利用して、ラジカル対内のスピン状態のエネルギー差を制御できることを示した。つまり、分子プローブの発光に影響を与える磁場強度の制御 (磁場応答性の制御) を実証した。テーマ B においては、第二世代分子の発光の磁場による変化をイメージングできることを示した。

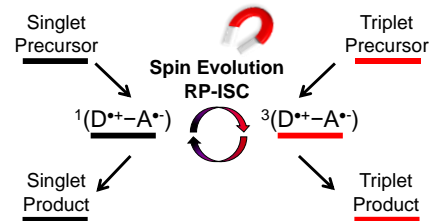


図1. スピン相関ラジカル対を経由するスピン選択的化学反应。图中 D と A は電子ドナーとアクセプター。

新型コロナウイルスの影響を受けて研究期間を6ヶ月間延長し、ゲルを用いての磁場制御とイメージングを達成した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「磁場効果を示す CT 発光を持つ分子の合理的設計と磁場効果の最適化」

このテーマでは、磁場効果を示す発光を示す単一分子システムの合理的設計を行った。生体イメージングでの使用を念頭に置き、可視光から近赤外領域で励起可能で、発光に大きな磁場効果を持つ分子システムの創出を目指している。スピン相関ラジカル対を経由する反応系を光プローブに組み込むことで、分子発光を磁場で制御可能にする。分子発光として、光誘起電子移動後に形成される一重項ラジカル対に関連する2つの発光 (CT 発光と遅延蛍光) に着目した。主に以下3つの大きな成果が得られた。

(A1) 研究の一環として、発光・吸収における磁場効果を測定するための Magnetically Affected Reaction Yield (MARY) 分光分析システムを構築した。ナノ秒過渡吸収分光法と可

変式電磁石(磁場強度可変)を組み合わせ、MARY 分光分析システムを構築した。ドナーアクセプター型分子での励起三重項状態の形成における磁場効果を測定することで、Spin-Orbit Charge-Transfer Intersystem Crossing(SOCT-ISC)という励起三重項状態の形成メカニズムの詳細な原理の解明を行うことができた(代表論文1)。

(A2)長距離 CT 発光を持つ単一分子システムの合理的設計を行った(図2a)。RP-ISC が目標の磁場強度(1テスラ未満)に影響を受けるためには、ラジカル対の距離がある程度離れている必要がある。通常、長距離ラジカル対(電荷分離状態)が電荷再結合する場合は発光を伴わない。本研究ではインテンシティボローイングという量子効果を利用し、一重項励起状態からの振動子強度を譲り受ける形で、長距離ラジカル対の電荷再結合においてもCT 発光が起きる分子群を開発した(第一世代)。可視光領域で励起可能な BODIPY 蛍光基とトリアリルアミン分子を用いた D-B-A 分子(第一世代分子群、図2b)を合成した。ドナーとアクセプターの酸化還元電位、ブリッジ分子の長さなどを調節することで、常温・溶液中でラジカル対の距離が最大 24Å 離れている分子システムでも CT 発光が起こることを確認した(図2c)。これは、現在一分子において確認されている CT 発光の中で最長となる。さらに、電子移動の方向の違いにより蛍光と CT 発光の異方性に大きな違いが出ることを実証した(代表論文2)。この特徴的異方性の違いは蛍光偏光イメージングなどへの応用が可能だと考える。しかしながら、第一世代の分子群における CT 発光と遅延蛍光には、常温・溶液中では磁場効果は確認されなかった(磁場強度は 0-0.6 テスラ)。

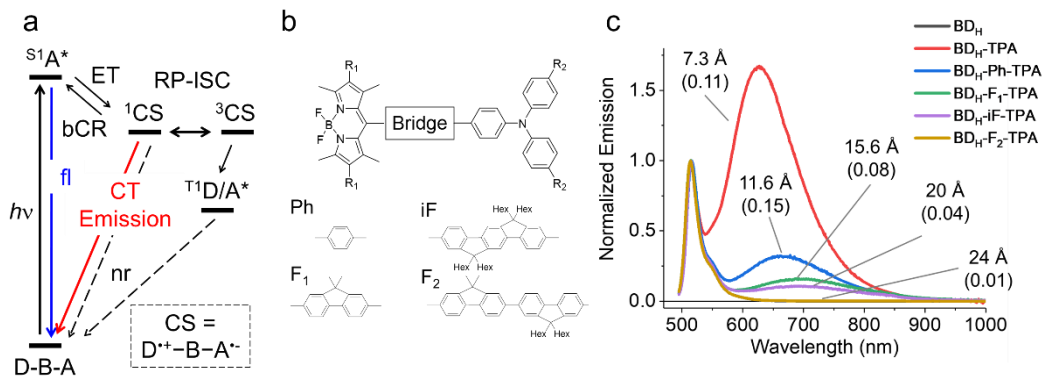


図2. (a)電荷分離再結合で起きる CT 発光のエネルギー図。(b)BODIPY とトリアリルアミンからなる D-B-A 分子の基本分子構造。Ph、F<sub>1</sub>、iF、F<sub>2</sub>はブリッジ分子。(c) D-B-A 分子の CT 発光(常温、クロロフォルム溶液中)。図中の距離はドナーとアクセプターの距離。

(A3)第一世代分子群においては、発光における磁場効果が見られなかった理由として、1)ラジカル対の寿命が短かく(10 ナノ秒以下)スピンミキシングが起きない、2)磁場の強度が足りないと考えられる。想定する応用を考えると、磁場の強度を上げることは良いとは考えられない。そこで、分子合成的にある程度制御が可能なラジカル対の寿命を長くするために、新しい D-B-A 分子群(第二世代)を開発した(図3a)。第二世代の分子群は、常温においては長距離 CT 発光を確認できなかった。しかし、長寿命の遅延蛍光(数十ナノ秒)を示した。そして、その遅延蛍光において顕著な磁場効果を確認した(図3b)。発光と過渡吸収両方の MARY 分光分析システム(上記 A1)を用いて、発光と三重項励起状態における磁場効果の特性を解明した。これらの分子群では、長距離電子移動で形成したラジカル対における磁場

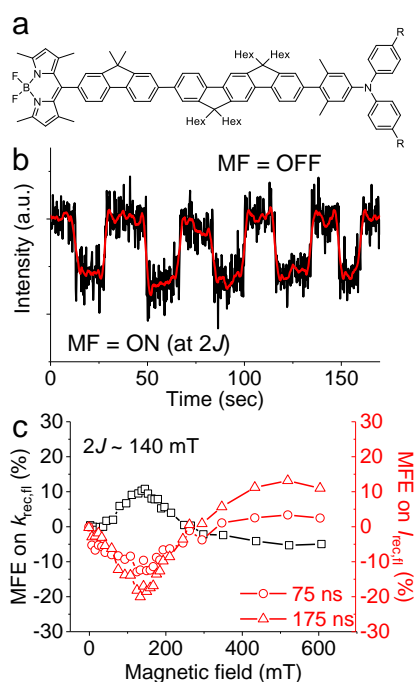


図3. (a)第二世代の D-B-A 分子。R=OMe、Me、H。(b)遅延蛍光における磁場効果。(c)遅延蛍光の減衰速度と強度の MARY スペクトラム。トルエンとアニソール混合溶液。

レゾナンスではコヒーレントな超微細相互作用によるスピンミキシングが変わる。分子中の修飾基(図3a中 R)と溶媒の極性を変えることにより、ラジカル対のエネルギー(電子移動に伴うギブスエネルギー変化、 $\Delta G_{CS}$ )を化学的に変化することができる。この変化を利用して、 $2J$ の値をコントロールすること

ができることを示した(図4)。つまり、プローブの発光に影響を与える磁場強度の制御(磁場応答性の制御)を実証することができた。これにより、Anderson(Phys. Rev., 1959, 115, 2-13)が提示したラジカル対のエネルギーと  $2J$  の関係を、初めて実験的かつ定量的に示すこともできた(代表論文3)。任意の磁場強度に反応を持つような磁場応答光プローブの開発が可能であることを示している。

#### 研究テーマB「モデル分子を利用した磁場効果による断層選択光イメージング実験」

このテーマでは、テーマ A で合成した分子を利用して、磁場による発光の空間的制御、特に磁場による断層選択の原理実証実験を目指す。本研究期間においては、上記の第二世代分子を用いて、発光が磁場により変化できることをイメージングできた。

に呼応して起きるスピンの変化(一重項と三重項状態のスピンミキシング)を、再結合して起きる遅延蛍光を通して試みていることになる。現在の段階では定常状態の発光量の変化は少ない(1-2%程度)が、発光量が比較的大きい(発光の量子収率、40-80%)ため、はっきりとした磁場効果が確認できる。また、遅延蛍光の減衰速度( $k_{rec,fl}$ )と遅延蛍光の強度における磁場効果は最大 20-50%程度とある程度大きな変化が観測できた。さらに、MARY スペクトルにおいて、極大値となる磁場の強度を確認できた(図3c)。この強度はラジカル対の一重項と三重項のエネルギー差に当たる( $2J$ 、図1中のラジカル対内の一重項と三重項のエネルギー差)。これらの特徴をもった遅延蛍光における磁場効果はこれまでに報告されておらず、新しい形の磁場効果の報告である。さらに、観測された磁場効果がラジカル対内の項間交差(図1a中 RP-ISC)のメカニズムの変化によるものと推察できた。磁場がない状態では非コヒーレントなスピン緩和によりスピンミキシングが起こり、 $2J$

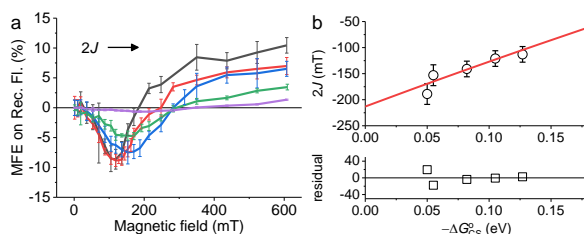


図4.  $\Delta G_{CS}$  が異なると遅延蛍光における磁場効果が異なる。(a)実験結果。(b)Anderson の式を用いた解析結果。

また、ゲル化する N,N'-bis(octadecyl)-L-boc-glutamic diamide (LBG)を用いての、ゲル中における磁場制御とイメージングを達成した。

### 3. 今後の展開

#### 3. 1. 研究展開

今回の研究により、常温・溶液中において、ラジカル対のスピン状態を外部磁場により制御することで、単一分子中の遅延蛍光における磁場効果を実証した。さらに、応答磁場強度を化学的にコントロールすることもできることを示した。RP-ISC のメカニズムが、磁場がない状態では非コヒーレントなスピン緩和が主なもので、レゾナンスの状態ではコヒーレントな超微細相互作用によるものにより、磁場効果が見られることも分かった。これにより、磁場応答光プローブの合理的設計の指針を建てられたと考えられる。一方で、現在の応答磁場強度の反応性は鈍い(バンド幅が大きい)。これは、非コヒーレントなスピン緩和の影響が大きいためと考えられる。このスピン緩和は、分子そのものの構造(付随するエネルギー状態)の不均一性や、環境の不均一性に影響される。これらの不均一性が少ないほど、スピン緩和は抑えることができると考えられる。将来的な生体におけるイメージング応用には、大きな磁場効果と高い応答磁場強度の反応性が求められる。したがって、さらなるプローブの開発では、非コヒーレントなスピン緩和を抑える方法に関する知見を深め、イメージングに実用可能な分子群の開発に繋げたい。

また、生体イメージングへの応用においては、現在の段階における分子をイメージングに応用する場合、振動や回転を制限できるように、膜タンパク質など大きな対象物に共有結合できるような応用に向いていると考えられる。また、時間分解発光において、大きな磁場効果を示す。そのため、長寿命蛍光の特性を生かした時間分解ゲート技術を断層選択イメージング(もしくは顕微鏡)に利用するような手法が考えられる。その場合、自家蛍光などのバックグラウンドを抑えられるため、蛍光強度が弱くてもある程度のコントラストを得られると考えられる。

#### 3. 2. 社会実装

化学反応における磁場効果の研究の歴史は長く、特に最近では渡り鳥の磁場感知における研究が注目されている。一方で、分子発光における磁場効果とその応用(特に生命科学分野)に関しての研究はあまり進んでいない。本さがけ研究を通して、確固とした理論に基づく分子設計の指針を示すことができたと考えられる。これらの結果を基に、当該分野への関心が増えることで、研究が進むことが期待される。それにより、実際の生体におけるイメージングを可能にするような分子の開発と、それに伴うイメージング技術の開発が進むと考えられる。

### 4. 自己評価

#### 4. 1. 研究目的の達成状況

磁場によるラジカル対内のスピン状態の制御という真に量子的な現象を光プローブに応用することが本研究の要である。この量子効果を元にした磁場応答光プローブを開発し、それを利用した新たな生体光イメージング技術を創出して、生命科学の基盤技術にすることを目指している。本研究期間中に、磁場応答光プローブの合理的設計と磁場効果の最適化の方

法(モデル分子における磁場による発光性制御の確立)を示すことができた。一方で、磁場効果による断層選択光イメージングは未だ達成できておらず今後の課題であるが、現在の段階でのイメージング応用の可能性を示すことはできたと考える。

#### 4. 2. 研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

概ね研究計画通りに実施できた。可変式電磁石と蛍光分光光度計システムを早い段階で導入できたことで、実験を円滑に進めることができた。また、大学学部生を研究補助者として夏と冬の間に雇用し、集中的に研究を進めた。

#### 4. 3. 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

今回の研究により、大きく3つの新技術シーズを創出できたと考える。1)単一分子における長距離 CT 発光の実現、2)電子移動の方向の違いにより CT 発光の異方性に大きな違いが出ること、3)単一分子を用いて遅延蛍光における磁場効果の実証と、応答磁場強度を化学的に制御できる。これらの知見は新規生体計測技術の開発等のテクノロジーの創出に繋がると考える。

#### 4. 4. その他領域独自の評価項目

分子発光における磁場効果という量子的な現象を、生命科学イメージングに適用可能な形で、光プローブに組み込むことができた。研究期間中には、実際に生命活動・分子挙動を計測できるという段階までには至らなかったが、磁場応答光プローブの合理的設計指針を示すことができ、また実現可能なイメージング技術のあり方と、計測に適している生命現象を見出すことができた。

### 5. 主な研究成果リスト

#### (1)代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:3件

1. Jason T. Buck, Andrew M. Boudreau, André DeCarmine, Reid W. Wilson, James Hampsey, and Tomoyasu Mani.\* Spin-Allowed Transitions Control the Formation of Triplet Excited States in Orthogonal Donor-Acceptor Dyads. *Chem.* 2019, 5, 138-155.

重原子を使わずに $\pi$ 共役有機分子の励起三重項状態を効率的に生成することは難しい。光誘起電子移動後に形成されるスピン相関一重項ラジカル対を直接励起三重項状態に生成する方法がある。本論文では、スピン許容遷移が三重項励起状態の生成を大きく制御していることを明らかにした。一方で、ラジカル対のエネルギーマル状態を化学的に調節することで、スピン禁制遷移の速度を許容遷移よりも速い状態を作り出せることを示した。

2. Jason T. Buck, Reid W. Wilson, and Tomoyasu Mani.\* Intramolecular Long-Range Charge-Transfer Emission in Donor-Bridge-Acceptor Systems. *Journal of Physical Chemistry Letters.* 2019, 10, 3080-3086

通常、長距離ラジカル対(電荷分離状態)が電荷再結合する場合は発光を伴わない。本論文ではインテンシティボローイングという量子効果を利用することで、長距離ラジカル対の電荷再結合において発光が起きる一分子を合理的に設計できることを示した。

3. Jason T. Buck and Tomoyasu Mani.\* Magnetic Control of Recombination Fluorescence and Tunability by Modulation of Radical Pair Energies in Rigid Donor-Bridge-Acceptor

System. *Journal of the American Chemical Society*. 2020, 142, 20691–20700

本論文では、常温・溶液中において、単一分子中のラジカル対のスピ状態を外部磁場を用いて制御することで、遅延蛍光における新たな磁場効果を報告した。さらに、発光に影響を与える磁場強度(応答磁場強度)を化学的に制御できることを示した。これにより、生体イメージングに応用可能な形での、磁場応答光プローブの合理的設計と磁場効果の最適化の方法を示した。

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)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)

主要な招待講演(合計7件)

1. Tomoyasu Mani, Exploiting Charge-Separated States: From Generating Triplets To Molecular Emission, 4th IROAST Symposium (Kumamoto), 01/25/2019
2. Tomoyasu Mani, Exploiting Charge-Separated States: From Generating Triplets To Molecular Emission, Loyola University, 03/21/2019
3. Tomoyasu Mani, Magnetic Control of Recombination Fluorescence and Tunability by Modulation of Radical Pair Energies in Rigid Donor-Bridge-Acceptor System, RIKEN CEMS Topical Meeting, 01/28/2021