

## 研究終了報告書

### 「超核偏極ナノ空間の創出に基づく高感度生体分子観測」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：楊井 伸浩

#### 1. 研究のねらい

核磁気共鳴を用いた分光法(NMR)や画像化法(MRI)は現代の科学や医療において不可欠な測定手法であるが、核スピンの偏極率が低いことため感度が非常に低いという問題がある。感度を向上させる技術として動的核偏極法(DNP)があり、現在最も主流なDNPは1K程度という極低温において高偏極化した熱平衡状態のラジカルの電子スピンから核スピンへとマイクロ波照射により偏極移行を行うものであり、偏極したプローブ分子を熱水に溶かして人へと注射することで超高感度なMRIがん診断が可能となっている。しかし、このような極低温のDNPは装置が高価かつ煩雑となり、広く普及する技術となるのは難しいと考えられる。

一方で光励起三重項の大きな電子スピン偏極を核スピン偏極へと移行する triplet-DNP は、非平衡状態の電子スピン偏極を利用するため室温付近でも核スピンの偏極率を高めることが可能であるため、より安価で汎用的な DNP 技術になると期待される。しかし、これまでの triplet-DNP の核偏極対象は主に芳香族化合物の結晶に限られ、生体分子を高感度化した例はなかった。その原因の一つは、従来 triplet-DNP の偏極源はペンタセンとその誘導体に限られており、ペンタセンは親水性の生体分子に分散せず、凝集により偏極性能を失ってしまうためであった。また、偏極対象は長いスピン—格子緩和時間を有する結晶性の芳香族化合物に限られており、より多様な分子や液体状態の分子を偏極する手法の開発が望まれていた。

そこで本研究では、triplet-DNP の適用範囲を大幅に拡大することを目指し、ペンタセンとは異なる新規偏極源を開発することで、水中や生体分子中に偏極源を分散し、生体分子の triplet-DNP を行うことを目指した。また、多孔性材料のナノ細孔を利用することで、偏極対象に直接偏極源を分散させる従来の方法とは異なり、ナノ細孔中に包摂された偏極源からゲスト分子への偏極移行という新しい手法の開発を試みた。更に、従来は固相に限られていた triplet-DNP を水溶液系に展開するため、水中に分散可能なナノ結晶を開発し、水中における triplet-DNP の実現に挑戦した。

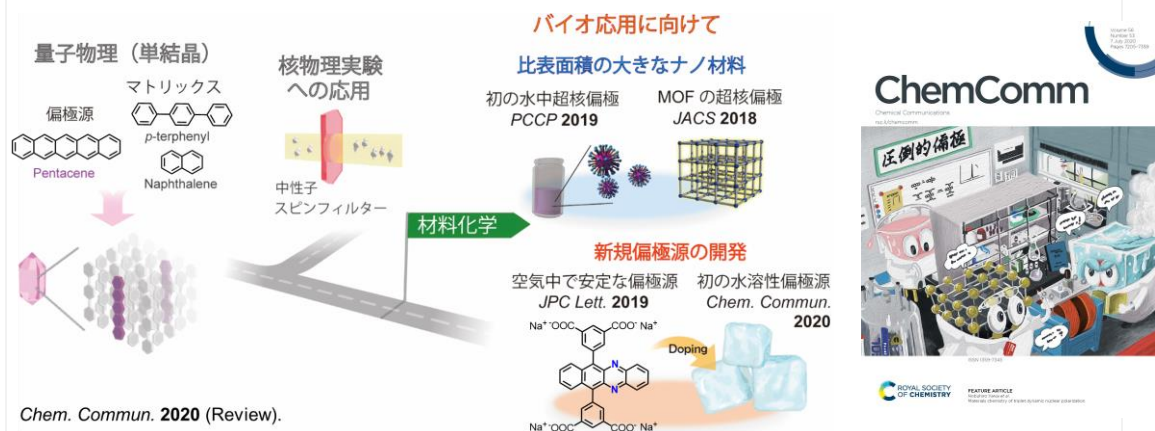
#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

光励起三重項状態の非平衡な電子スピン偏極を利用する triplet-DNP は室温で超核偏極出来ることが最大の長所であるが、これまで偏極対象は主に固体結晶中の芳香族分子に限られてきた。そこで本研究においては triplet-DNP という量子物理分野に材料化学を導入することで、バイオロジー分野への応用を可能にすることを目指してきた。比表面積の大きなナノ材料を用いることでターゲットとなる生体分子に偏極を移行することが可能になると期待できる。また、空気中で安定な偏極源や水溶性の偏極源を材料化学的手法により開発することで、水や生体分子に偏極源を分散して高核偏極化することも可能になると期待できる。これら

の本さがけ研究のコンセプトを総説として *Chem. Commun.*誌に発表した(図 1)。

図1 量子物理分野である triplet-DNP に材料化学を導入することで、バイオ応用を可能に



*Chem. Commun.* 2020 (Review).

このコンセプトを基に、さがけ研究期間中に以下の研究成果を得た。次項に詳述する。

- 偏極源開発: 従来の triplet-DNP の偏極源は pentacene の一択であったが、空气中で安定な偏極源、水溶性の偏極源、生体親和性の偏極源を初めて開発した。
- 偏極ターゲット拡大: 従来 triplet-DNP の適用は芳香族分子に限られていたが、水分子、生体分子の超核偏極に初めて成功した。
- 固相からの脱却: 従来の triplet-DNP は全て固相で行われていたが、水中での triplet-DNP に初めて成功した。

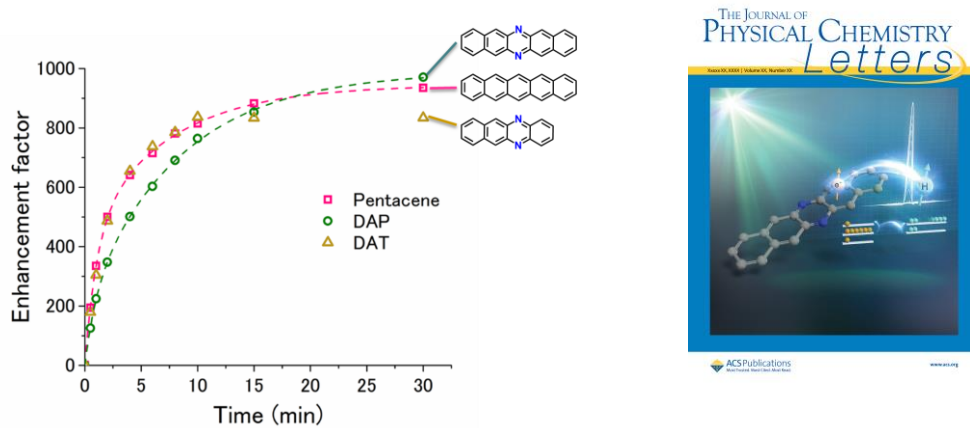
## (2) 詳細

1990年に Wenckebachらにより triplet-DNP を用いた室温での高核偏極化が初めて報告され、その後も北川、根来、香川らにより室温での偏極率の大幅な向上(2014年)や triplet-DNP 後に水中に溶解する dissolution triplet-DNP(2018年)が報告されてきた。一方で、これらの研究において偏極源はペンタセン及びその誘導体に限られてきた。しかし、ペンタセンには空气中、室内光で容易に光酸化されて分解するという、今後の応用を行う上で大きな問題を有していた。また、ペンタセンは疎水性の分子であるため親水性の生体分子や水中に分散することが出来ず、更には有機溶媒への溶解性も極めて悪いためプロセス性に問題があった。

そこで本さがけ研究では、triplet-DNP の汎用性拡大においてボトルネックとなっている偏極源の開発に注力した。偏極源の空气中での安定性を向上させるため、電子吸引性の窒素原子を導入したジアザペンタセン、ジアザテトラセンを合成した。DFT 計算により HOMO、LUMO 準位が N 原子の導入により低くなり、酸化に対する耐性が上がっていることが示唆された。ジアザペンタセン、ジアザテトラセンを空气中でテトラヒドロフラン(THF)溶媒中に分散させたところ、ペンタセンやテトラセンと比較して遥かに高い安定性を示した。パラターフェニル結晶中においてジアザペンタセン、ジアザテトラセンはペンタセンとほぼ同程度の偏極率の向上を示し、空气中で安定かつ高性能な偏極源の開発に初めて成功した。物理化学分野の有力誌である *J. Phys. Chem. Lett.*誌に投稿したところ、審査員から “This study is therefore an INCREDIBLY impactful contribution to our field and will be of extreme interest to many

readers of JPCL.” という高い評価を受け、Editor’s choice に選出されるとともに、Supplementary Cover にも選出された(図 2)。

図 2 新規偏極源を導入したパラターフェニル結晶の triplet-DNP による  $^1\text{H}$  核偏極率の向上



ジアザテトラセンを基本骨格として、更にカルボン酸を複数修飾することで水溶性を有する偏極源 DAT-4COOH を初めて開発した。この偏極源と親水性でかさ高いアミンである MEEA とのイオン対形成により、偏極源を氷中へと凝集することなく分散することができ、結晶性の氷の  $^1\text{H}$  核スピンを triplet-DNP により偏極することに初めて成功した。興味深いことに Na イオンが対イオンとなった DAT-4COONa は氷中において凝集したことから、親水性でかさ高い MEEA とのイオン対形成が氷への分散にとって重要であることが示唆された。以上の結果を英国化学会の *Chem. Commun.* 誌に投稿したところ、査読者から高い評価を受け Inside Front Cover としてハイライトされた(図 3)。

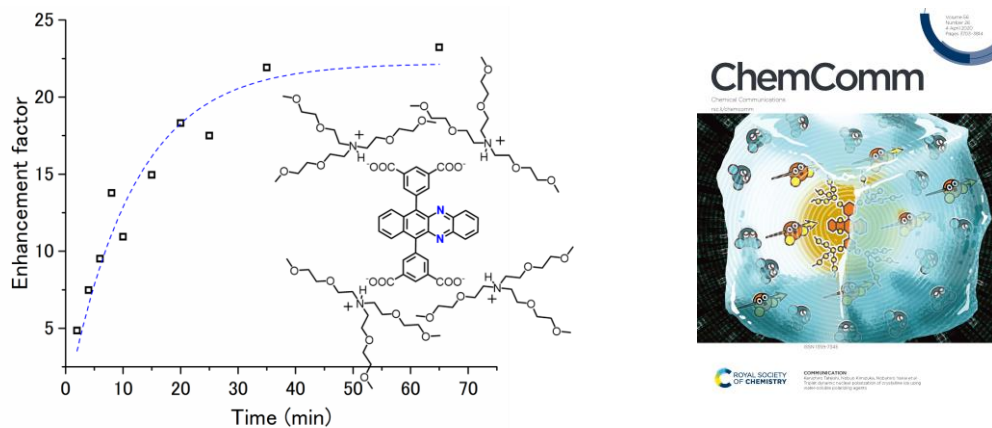


図 3 DAT-4COOH/MEEA を分散した氷に triplet-DNP を行うことで NMR 感度を向上

未だ報告例の無い、生体分子の triplet-DNP に挑戦した。これまで生体分子の triplet-DNP が困難であった主な理由は、偏極源のアセン類が親水性の生体分子への分散性が低く、凝集により偏極性能を失ってしまうためであった。そこで親水性のポルフィリン類を triplet-DNP の偏極源として初めて使い、生体分子マトリックスへと分散させることで、生体分子の triplet-DNP による高偏極化に初めて成功した(図 4, 代表論文 1)。ポルフィリン誘導体が平面性の分子であることから凝集しても偏極性能を失わない事に着目し、アモルファスだけ

く結晶性の生体分子マトリックス中においても偏極性能を保持していることを実証した。実際に凝集したポルフィリン誘導体を偏極源として用い、結晶性の生体分子であるエリスリトールの高核偏極化に成功した。本研究の意義は、初の生体分子の triplet-DNP であることに加え、初の生体適合性の偏極源としてポルフィリン類を提案したことにあると考えられる。

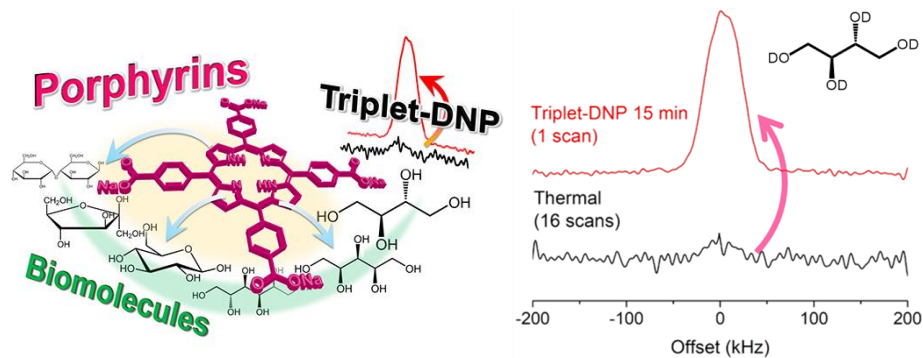


図 4 ポルフィリン誘導体を偏極源に用い、生体分子の triplet-DNP に初めて成功

従来 triplet-DNP は固相に限られてきたが、水中に分散したナノ結晶を調製することで、水中における triplet-DNP を初めて達成した。これはナノ結晶を triplet-DNP により核偏極した初めての例でもある。シンプルな湿式ボールミル法によりナノ結晶を合成できることが分かった。励起三重項は水中に溶存する酸素分子によって容易に消光されてしまうため、ナノ結晶化することによる消光が懸念されたが、パラターフェニルの密な結晶構造により三重項が酸素消光から守られることが分かった。得られたナノ結晶の水分散液に triplet-DNP のプロセスを行ったところ、NMR のシグナル強度が熱平衡状態と比較して約 360 倍増強され、水中においても triplet-DNP が可能であることを初めて実証できた。これらの結果を *Phys. Chem. Chem. Phys.* 誌に投稿したところ高い評価を受け、Inside Front Cover に採用され、2019 PCCP HOT Article の一つに選ばれた(図 5, 代表論文 2)。

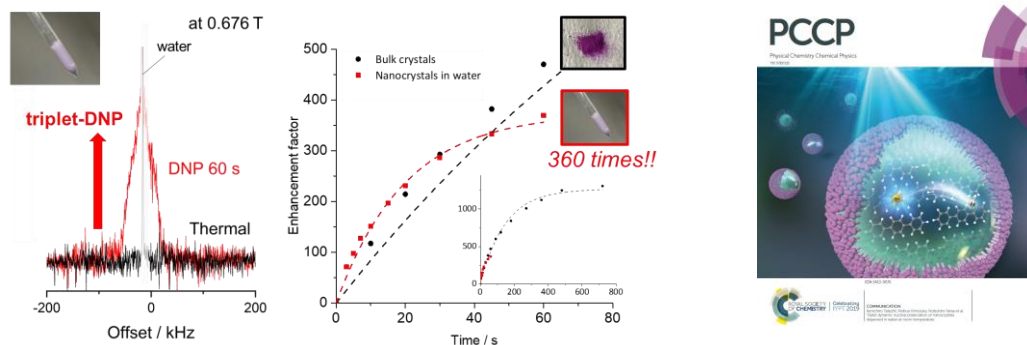


図 5 水中に分散したナノ結晶の triplet-DNP

ナノ多孔性材料である metal-organic framework (MOF) を用いたナノ偏極空間の構築にも取り組んできた。MOF からゲスト分子への偏極移行を起こすため、ホスト-ゲスト間で十分に強い相互作用を持たせる必要があると考えられる。そこで、骨格構造を柔軟に変化させることで様々なゲスト分子と強く相互作用することで知られる MIL-53 を用いた。ターゲット分子としては観測に有利な  $^{19}\text{F}$  核を有する抗がん剤であるフルオロウラシルを選択した。従来はフルオ



ロウラシルの運動性を抑えるために 100 K 程度の低温ガラス中において DNP が行われてきたが、MIL-53 は細孔構造を変化させてフルオロウラシルと強く相互作用することで、室温程度でも triplet-DNP により高感度化することに成功した(図 6)。これは MOF 中のゲスト分子を triplet-DNP により高核偏極化することに成功した初めての例でもある。Angew. Chem. Int. Ed. 誌に報告し、プレスリリースを行った(代表論文 3)。

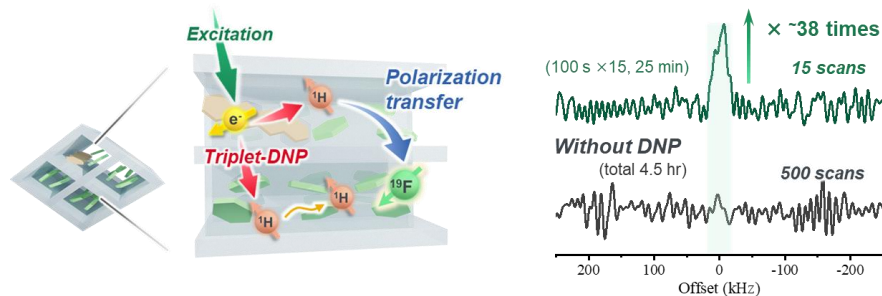


図 6 MOF 中に強く捕捉したゲスト薬物(フルオロウラシル)の triplet-DNP

### 3. 今後の展開

本研究では量子物理の分野で研究が行われてきた triplet-DNP に材料化学を導入することで、新規な水溶性偏極源や生体適合性偏極源を開発し、バイオロジー分野に応用する上で重要な水分子や生体分子、薬物分子の高核偏極化に成功してきた。今後 MRI や NMR の室温超高感度化により医療診断や生命現象解明において有用な技術にするためには、偏極率の向上が重要であると考えられる。また、水やピルビン酸、CO<sub>2</sub>などの重要分子の高核偏極化も重要な課題である。例えば水を室温で高感度化出来れば、連続的にNMRへと導入することでプロトン交換を介してタンパク室などの生体分子を高偏極化し、NMR感度を連続的に向上させようと期待される。これは創薬における薬物とタンパク質の相互作用解析や、生命科学における生細胞中でのタンパク質の構造評価において真に求められる技術であり、新規偏極源分子や超核偏極ナノ空間の開発により実現を目指していきたい。

### 4. 自己評価

本さきがけ研究において、従来は量子物理分野において芳香族分子結晶にターゲットが限られてきた triplet-DNP に材料化学を導入することで、バイオロジー分野に応用可能な量子技術の開発を目指してきた。化学者として新規な偏極源を開発し、それにより水分子や生体分子、薬物分子といった生命現象に関わる分子に triplet-DNP を適用することに初めて成功し、将来的な実応用に向けた重要なステップを踏むことが出来たと考えている。また、従来は固相において高核偏極化した後に水などに溶解させて観測することが一般的であったが、本さきがけ研究において水中に分散可能なナノ結晶を開発することで水中における triplet-DNP に初めて成功し、今後の連続的な超核偏極水生成という大きな目標に向けて重要なステップを達成したと考えられる。

将来的には独自に開発する材料をベースとして、日々の研究や診断において用いられる NMR や MRI に併設可能な高感度化前処理装置を開発することで、当たり前のように超核偏極技術が用いられる未来を実現したい。MRI は国内だけでも 7,000 台程度もあり、NMR も

世界中の大学や企業などの生命科学研究において日々用いられているが、感度の低さから得られる情報は限定的である。これらの装置を室温で高感度化出来るようになれば、極めて大きなイノベーションとなることが期待される。

## 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: 7件

1. Tomoyuki Hamachi, Koki Nishimura, Hironori Kouno, Yusuke Kawashima, Kenichiro Tateishi\*, Tomohiro Uesaka, Nobuo Kimizuka,\* Nobuhiro Yanai\*, "Porphyrins as Versatile, Aggregation-Tolerant, and Biocompatible Polarizing Agents for Triplet Dynamic Nuclear Polarization of Biomolecules", *J. Phys. Chem. Lett.* 2021, *12*, 2645–2650.

水溶性のポルフィリン誘導体を偏極源として用い、生体分子(erythritol- $d_4$ )の triplet-DNP に初めて成功した。これは生体適合性の triplet-DNP 偏極源としても初めての例である。ポルフィリン誘導体が凝集しても偏極性能を失わない凝集耐性を有する偏極源であるという興味深い知見も得られ、生体分子結晶中において凝集したポルフィリン誘導体を用いた triplet-DNP に成功した。

2. Koki Nishimura, Hironori Kouno, Kenichiro Tateishi,\* Tomohiro Uesaka, Keiko Ideta, Nobuo Kimizuka,\* Nobuhiro Yanai\*, "Triplet dynamic nuclear polarization of nanocrystals dispersed in water at room temperature", *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2019, *21*, 16408–16412.

湿式ボールミル法によりペンタセンをドーブしたパラターフェニル結晶をナノサイズ化し、水中に分散可能なナノ結晶を合成した。パラターフェニルの密な結晶構造により、ナノ結晶中においてもペンタセンの偏極状態は酸素消光を受けることなく安定であった。水中に分散したナノ結晶の triplet-DNP を行うことで、これまで固相に限られてきた triplet-DNP を水中で行うことに初めて成功した。

3. Saiya Fujiwara, Naoto Matsumoto, Koki Nishimura, Nobuo Kimizuka, Kenichiro Tateishi, Tomohiro Uesaka, Nobuhiro Yanai\*, "Triplet Dynamic Nuclear Polarization of Guest Molecules through Induced Fit in a Flexible Metal-Organic Framework", *Angew. Chem. Int. Ed.* 2022, *61*, e202115792.

多孔性金属錯体(MOF)の細孔構造が観測したい分子に対して柔軟にフィットする性質に着目し、室温でナノ多孔性材料から観測したいゲスト分子に核偏極を移すことに初めて成功した。MOF の細孔中において室温であるにも関わらずフルオロウラシルの動きを固定することが出来た。triplet-DNP によって  $^1\text{H}$  核スピンを偏極した後、フルオロウラシルの  $^{19}\text{F}$  核へと核偏極を移行したところ、約 30 倍の  $^{19}\text{F}$  核 NMR 信号の増感を達成した。

### (2) 特許出願

研究期間全出願件数: 2件(特許公開前のもも含む)

### (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)

- プレスリリース「硬くて柔らかいナノ多孔性材料が実現する室温核偏極 ～医療で用いられる MRI の高感度化を目指した技術を開発～」(2021 年 12 月)
- The APA (Asian and Oceanian Photochemistry Association) Prize for Young Scientists (2021 年 11 月)
- 光化学協会 奨励賞(2021 年 9 月)
- 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞(2021 年 4 月)
- 文科省 NISTEP ナイスステップな研究者(2019 年 12 月)
- Nobuhiro Yanai, “Making Triplet Dynamic Nuclear Polarization More Accessible and Feasible”, 60th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference (ENC 2019), California, USA (2019 年 4 月)