

## 研 究 報 告 書

研究課題名：「単一分子蛍光計測で探るキラリティーの本質」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研 究 者：深港 豪

### 1. 研究のねらい

キラル分子は互いに重なり合うことのない一对の鏡像異性体を有する分子である。これらの異性体間で、薬の効能や味覚・嗅覚といった我々の生命現象に対する作用が全く異なる場合が多く、これらを計測・識別することは古くから重要な課題として認識されている。近年ではキラル計測技術のダウンサイジングが切望されており、顕微鏡下におけるキラル計測技術の開発が活発に行われている。本研究では、キラル計測技術の究極的な到達点ともいえる単一分子レベルでのキラル計測の実現を目指し、単一分子蛍光計測を応用した単一分子キラル計測技術を確立することを目的とした。分子一つ一つのキラル応答を直接計測することにより多数分子の平均化の影響を取り除き、これまでほとんどの議論が分子集団系においてのみ行われてきた分子のキラリティーという化学的性質の本質をとらえることを目指した。

### 2. 研究成果

#### 2-1. 単一分子キラル蛍光計測に向けた蛍光性キラル分子の探索

単一分子レベルでのキラル蛍光計測を可能とするためには、高い蛍光量子収率、大きなモル吸光係数を有し、さらに優れた光耐久性を有する蛍光分子の中で、大きなキラル応答(異方性因子:  $g$  で表わされる)を示す蛍光性キラル分子を用いることが必要不可欠となる。この観点から、高い蛍光量子収率と大きなモル吸光係数を有し、非常に優れた光耐久性を誇るペリレンビスイミド誘導体を基本骨格とする蛍光性キラル分子の開発に取り組んだ。

分子のキラリティーの源は、4 つの単結合の置換基がすべて異なる不斉中心によるものや、励起子相互作用に基づくもの、らせん軸によるものなど、その種類は様々である。キラリティーの種類ごとに分子の  $g$  値のもつ意味が異なっているものと考えられる。その関わりを明らかにすることが分子のキラリティーの化学的な本質を理解する上で重要であると考え、不斉源の異なる種々の分子(図 1 に一例を示す)を合成した。

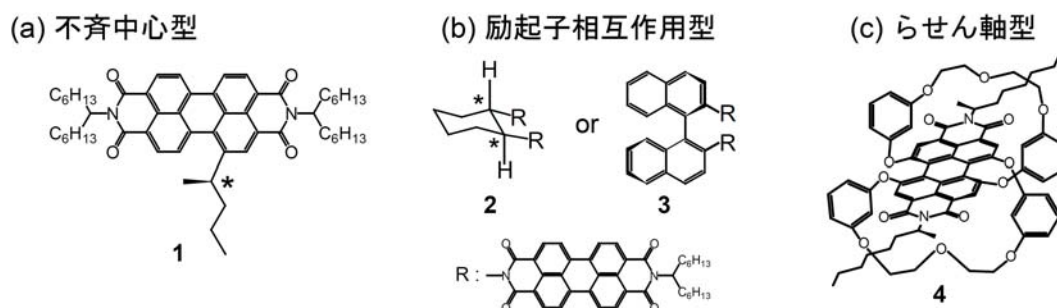


図 1 蛍光性キラル分子 1-4

不斉中心型の蛍光性キラル分子として、図 1 に示す分子 1 を合成した。合成した分子 1 は高い蛍光量子収率( $\Phi_f = 0.81$ )を示し単一分子蛍光計測は問題なく行えたものの、キラル応答は非

常に小さいものであり( $g = \pm 0.00022$ )、単一分子レベルでのキラリ計測に用いることは困難であった。励起子相互作用型の蛍光性キラリ分子として、キラリな空間配置をとるビナフチル基やシクロヘキシル基にペリレンビスイミドを結合させた分子 2 および 3 を合成した。その結果、これらの分子は高い蛍光量子収率を有し( $\Phi_f > 0.9$ )、モル吸光係数も大きく( $\epsilon > 110,000$ )、単一分子蛍光計測に適した分子であった。また、キラリ応答も合成した分子の中では大きく( $g = > \pm 0.002$ )、単一分子レベルでのキラリ計測に用いる分子として有力候補であった。しかしながら、励起子相互作用型のキラリ分子の場合、二つの蛍光ユニットを分子内に有することから分子内でのエネルギー移動の影響を考慮する必要があるだけでなく、分子配向とキラリ応答の相関性を評価する際(2-3項)や理論解析を行う際(2-4項)に、議論を複雑化してしまう問題があった。一方で、ペリレンビスイミド骨格のベイポジションを上側と下側で対角線上にエチレングリコール鎖を結合させペリレンビスイミドの $\pi$ 共役平面をらせん状にねじった分子 4 の場合、蛍光量子収率とモル吸光係数が少し低下したものの( $\Phi_f = 0.73$ ,  $\epsilon = 37600$  in diethylether)、単一分子蛍光計測は十分に可能であり、かつ励起子相互作用型の蛍光性キラリ分子と同程度のキラリ応答( $g = \pm 0.0018$ )を示した。発色団が一つであることから、分子内エネルギー移動等の問題もなく、あらゆる議論を単純化できることから単一分子キラリ計測に最も適した分子であると判断した。

## 2-2. 単一分子レベルでのキラリ計測に向けた測定光学系の構築

分子のキラリティーを計測する際には、光の持つ偏光特性が有効に利用できる。吸収現象においてキラリな分子は、右円偏光と左円偏光の吸収のしやすさに偏りを持つ円二色性(Circular Dichroism: CD)という性質を有しており、これらの偏り度合いを測定することで  $g$  値が求められ、分子のキラリティーを評価することが可能となる。この性質を基に、単一分子計測が可能な感度の高い蛍光特性を用いて、CD を測定する蛍光検出型円二色性(FDCCD)測定を顕微鏡下で行える光学系の構築を行った。

顕微鏡下におけるキラリ計測では、測定試料や光学部品から生じる偽のシグナル(アーティファクト)の寄与を含む危険性が高く、得られるキラリ応答が真に分子のキラリティーに由来するものではない場合がある。従って、考えうるすべてのアーティファクトの影響を除去(もしくは可能な限り低減)した測定光学系の構築を検討した。種々の検討を重ねた結果、図 2 に示す単一分子 FDCCD 計測用の光学系を構築した。試料を励起するレーザー光を倒立型蛍光顕微鏡の上側に配置し、 $\lambda/2$  と  $\lambda/4$  板に通して 1 : 1.03 程度の偏光比の円偏光を調整した。光学部品による偏光特性の乱れを回避するために、円偏光作製後、分子を励起するまでのパスには光学部品

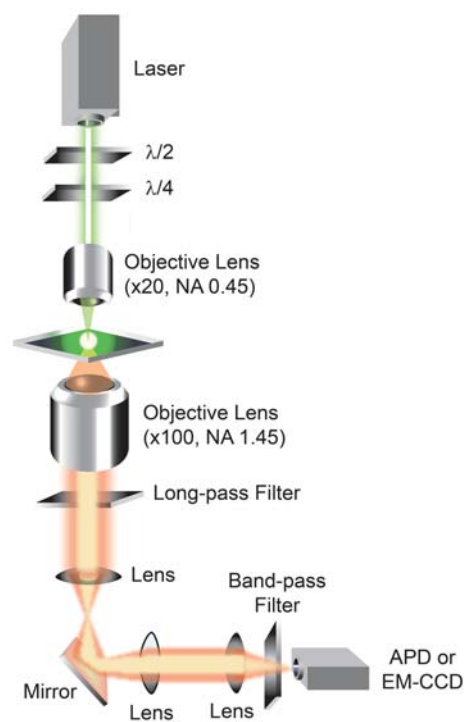


図 2 単一分子 FDCCD 測定光学系

を入れず、集光レンズによる偏光面の回転を回避するために比較的小さな開口数の対物レンズで集光して試料を照射した。試料からの蛍光は、反対側の高い開口数の対物レンズで集光し、適切なフィルターを通したのちアバランシェフォトダイオード(APD)やEM-CCDカメラで検出した。 $\lambda/4$ 板を $90^\circ$ ずつ回転させ右円偏光と左円偏光を切り替えながら試料を励起し、その蛍光強度の差から分子一つ一つの $g$ 値を求め、そのキラリティーを評価した。測定に用いる試料として、光学分割した鏡像異性体をそれぞれ別々に Zeonex や PMMA 高分子媒体に非常に希薄な濃度で分散させ、分子一つ一つが孤立した状態にあるフィルムを作製した。この際、試料媒体による複屈折などの影響をなくすために、試料の厚みは 100 nm 以下になるように厳密に調整した。

### 2-3. 単一分子 FDCD 計測

2-2項で示した測定光学系と試料を用いて、単一分子レベルでの FDCD 計測を行った。 $\lambda/4$ 板を一定時間ごとに $90^\circ$ ずつ回転させ右円偏光と左円偏光を切り替えながら試料を励起し、分子一つ一つの蛍光強度を計測した。その結果、キラル部位を持たない蛍光分子(ローダミン 101)の場合、右円偏光、左円偏光を切り替えながら測定しても、蛍光強度に大きな変化はなく、ある瞬間に一段階で光退色する単一分子に特有の挙動が観測された(図 3a)。一方、キラル分子 4 の場合、右円偏光、左円偏光の切り替えに応答して蛍光強度が変化する分子が確認され、この変化量から $g$ 値を求めると、興味深いことに分子集団系の $g$ 値よりもかなり大きな値を示す分子が見出された(図 3b)。

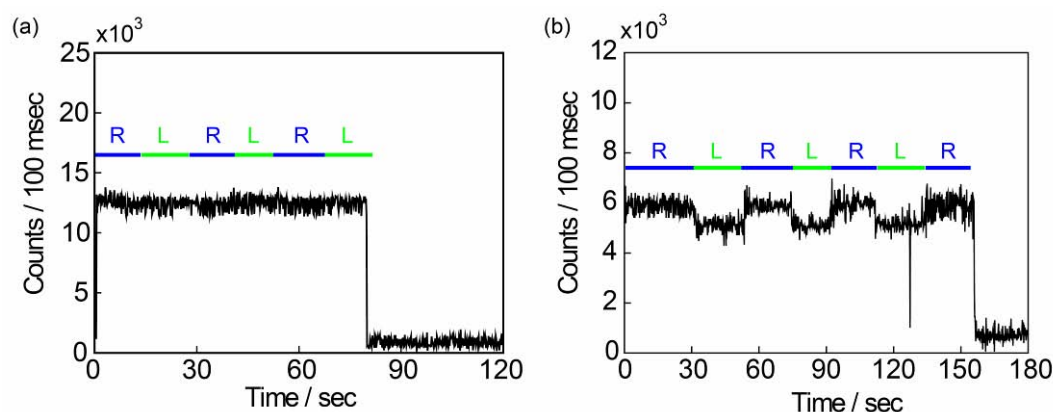


図 3 単一分子 FDCD 計測により得られる、(a)単一アキラル分子(ローダミン 101)および(b)単一の分子 4 の M 体の蛍光強度の変化; R: 右円偏光励起、L: 左円偏光励起

同様の測定を約 700 個のアキラル分子およびそれぞれのキラル異性体に対して行い $g$ 値のヒストグラムを作成した結果、アキラルな分子の場合、ゼロを中心とする幅の狭い分布が確認されたのに対し(図 4、緑のバー)、キラル分子の場合、分子集団系では一つの負の値として観測される $g$ 値が、同じ構造の分子を見ているにも関わらず分子毎に異なる値を示し、幅広い分布を与えることが見出された(図 4、黒および赤のバー)。また、同一の異性体に対して $g$ 値は正の値も負の値も示すことも認められた。また、それぞれの鏡像異性体から得られる分布の形はほぼ鏡像の関係をとっており、得られるヒストグラムが分子のキラリティーに由来するものであることを示唆する結果が得られた。この結果は、分子集団系の $g$ 値は、 $g$ 値が大小および正負と異なる多数の分子の平均値を観測しているために小さなキラル応答として観測されるのであり、分子一つ

一つのキラリティーを直接計測すれば、その分子のキラリティーを評価できることを示唆しているものと考えられる。

分子毎に異なる  $g$  値を示し、幅広いヒストグラムを与える原因に対して様々な検討を重ねた結果、分子を分散させる高分子媒体の種類を変えることで、 $g$  値の分布に顕著な変化が確認された。例えば、Zeonex のようにガラス転移温度:  $T_g$  が高い硬い高分子媒体を用いた場合、 $g$  値の分布は図 4 に示すように幅広いものになるのに対し、ポリ- $n$ -ブチルメタアクリレート(PnBMA)のように  $T_g$  が低い柔らかい高分子媒体を用いた場合には、観測される分布の幅はアキラル分子の時とほとんど変わらなくなり、分子のキラリティーに対する議論はできなくなった。デフォーカスイメージングにより、それぞれの媒体中における分子配向や運動を評価した結果、Zeonex 中ではデフォーカスパターンに変化がなく、分子はその場に固定されていた。一方、PnBMA 中では、デフォーカスパターンが絶えず回転しており、分子はその場で自由に回転していた。従って、分子の配向が分子毎に異なる向きで固定されているような場合には  $g$  値の分布は幅広いものとなり、分子が自由に回転し、その配向が平均化される場合には  $g$  値の分布が狭くなるものと解釈でき、 $g$  値は分子が光に対してどの向きに配向しているかに強く依存することが示唆された。そのことを明らかにする目的で、単一分子 FDCD 計測とデフォーカスイメージングを同一の分子に対して行い、 $g$  値と分子配向の相関性を調べた。 $z$  軸(光の進行方向)に対する分子ダイポールの傾きを  $\theta$  と定義し、 $\theta$  に対する  $g$  値をプロットすると、図 5 に示すように  $x$ - $y$  平面に対して平行に配向している( $\theta$  が大きい)分子は小さな  $g$  値を示し、 $x$ - $y$  平面に対して垂直に配向している( $\theta$  が小さい)分子は比較的大きな  $g$  値を示すという相関性が認められた。これらの実験結果から単一分子 FDCD 計測で観測される  $g$  値の分布は、光に対する分子の配向の違いが大きく起因しているものと結論付けた。

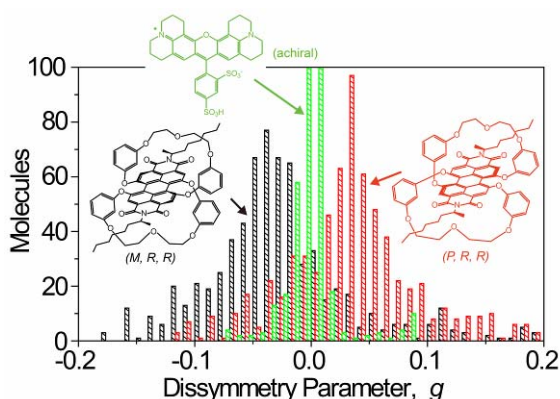


図 4 単一分子 FDCD 計測により得られる  $g$  値のヒストグラム; アキラル分子(ローダミン 101): 緑  $\langle N=570 \rangle$ 、分子 4 の M 体: 黒  $\langle N=594 \rangle$ 、および P 体: 赤  $\langle N=613 \rangle$

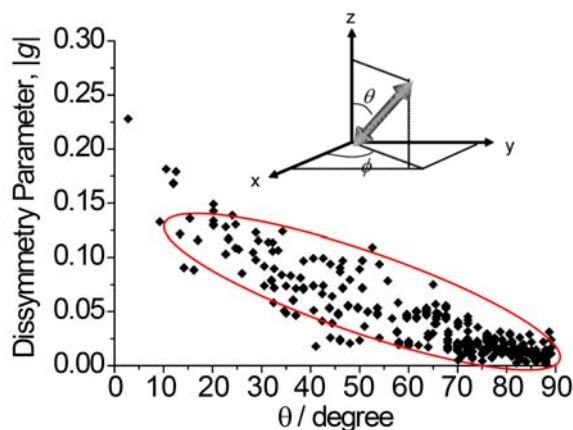


図 5  $g$  値と分子配向  $\theta$  の相関性;  $\langle N=200 \rangle$

#### 2-4. 単一分子キラリ計測の理論的解析

量子化学計算プログラム Gaussian09 を用いて、単一分子 FDCD 計測に用いた分子 4 の構造最適化を行い、その構造の励起状態計算を実行した。構造最適化の手法は密度汎関数法を用い、このときの汎関数は B3LYP、基底関数は 6-31+g(d,p) とした。励起状態計算は時間依存密度汎関数



法を用い、このときの汎関数はB3LYP、基底関数は6-31+g(d,p)とした。基底状態の波動関数と励起状態の波動関数から計算される電気遷移双極子モーメント、磁気遷移双極子モーメントおよび電気遷移四重極子モーメントからrotatory strength tensor:  $R$ を構成し、ランダムに光の進行方向を選び、そのときの $g$ 値を計算した。

計算の結果、一方の鏡像異性体であっても光の入射方向の違いにより正の $g$ 値も負の $g$ 値も示し、光を吸収しにくい向きほどその応答は大きくなり、よく光を吸収する向きでは $g$ 値は小さくなるという計算結果が得られた。これらの計算結果は、2-3項で示した実験結果とよい一致を示した。この結果を基に、さらに再安定構造まわりの多数の構造や分子の熱揺らぎも考慮して $g$ 値を計算することで、実測で得られる $g$ 値を再現する方向に近づくことが認められた。現在、実際の実験環境を計算上においても再現し、分子周りに存在するポリマー分子との相互作用も考慮した計算精度を高めた理論解析に取り組んでいる。なお、この実験は理化学研究所、中村振一郎教授のグループとの共同研究によって行われたものである。

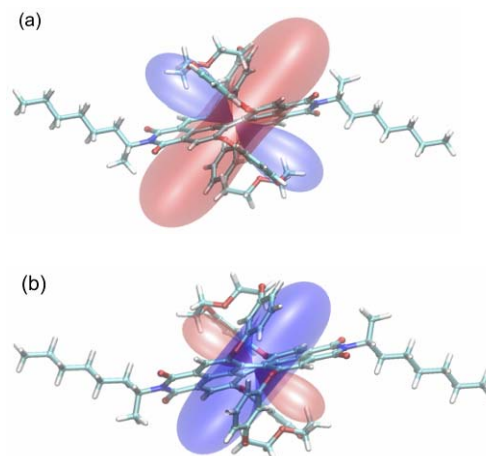


図 6 理論計算により求められる分子 4 の (a)M 体および(b)P 体の最安定構造と  $g$  値の方位依存性; 赤色のローブ: 負の  $g$  値を表す、青色のローブ: 正の  $g$  値を表す

## 2-5. ラセミ混合物試料に対するキラル計測

従来の多数分子が含まれる分子集団系のキラル計測では、それぞれの鏡像異性体が 1 対 1 の割合で混ざったラセミ混合物の試料からは、それぞれの異性体を示すキラルシグナルが互いに打ち消しあってしまうため、キラル情報を得ることはできない。そのため、各異性体を選択的に合成、もしくは分割する必要がある、通常その過程は多大な労力を要する。しかしながら、単一分子キラル計測では、たとえラセミ体においても、そこに含まれる分子そのものはキラルであり、

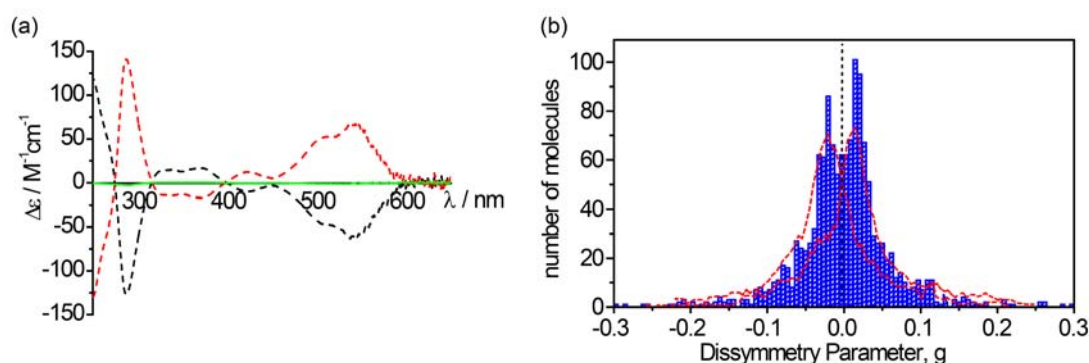


図 7 分子 4 のラセミ混合物試料から得られるキラルシグナル; (a)分子集団系(緑線:ラセミ混合物、赤線:P 体、黒線:M 体)で観測される CD スペクトル(ジエチルエーテル中)、(b)単一分子系で観測される  $g$  値のヒストグラム(赤線:各異性体の測定から得られる  $g$  値の分布曲線)  $\langle N = 1227 \rangle$

個々の分子のキラルシグナルを直接計測するため、それぞれの分子の構造に対応したキラル情報を抽出することができるものと期待される。

分子 4 のラセミ混合物の試料に対して分子集団系および単一分子系の両方でキラル計測を行った結果、通常分子集団系ではいかなる CD シグナルも観測されることはなく、分子のキラル応答を議論できない(図 7(a)、緑線)。一方、単一分子系でラセミ混合物の  $g$  値を評価すると、図 7(b)に示すようにその中に含まれる分子は、分子毎に異なるキラル応答を示し、そこから得られる  $g$  値のヒストグラムは、それぞれの異性体から得られるヒストグラムを足し合わせたような分布となることが認められた。この結果は、通常分子集団系の測定ではキラル情報を引き出すことが不可能なラセミ混合物の試料においても、単一分子系ではキラル情報を議論できることを示す結果であり、単一分子キラル計測の発展性を示す結果であると考えられる。

### 3. 今後の展開

本さきがけ研究により、従来の分子集団系では議論が不可能であった試料に対しても、分子一つ一つを直接観測することで分子のキラリティーを議論できる可能性が見えてきた。今後はこの技術を応用し、光に対して大きなキラル応答が得られる向きに意図的に分子を固定し、すべての分子が大きなキラル応答を示すキラル媒体を作製できれば、極めて高感度かつ微小な単一分子キラルセンサーなどの実現へと研究を進展できるものと期待される。また、本研究で確立した単一分子のキラル応答に関する理論計算を利用し、従来のように合成した後に理論的な取扱いで物性を議論するのではなく、大きなキラル応答を示しうる分子および配向をあらかじめ予測し、その指針を基にキラル分子を設計・合成するという本来の意味で理論計算が実験を先行する形での研究を展開してみたい。その基礎を確立するためには、本さきがけ研究では成し得なかった他の不斉源のキラル分子に対しても単一分子キラル蛍光計測を実現し、この技術の一般性を確立することや、キラル認識能を有するような新しい蛍光性キラル分子を開発することなどが課題となってくる。それらの課題を一つ一つ解決していくことで、究極的な単一分子レベルでのキラル計測技術を普遍的な技術として発展できるものと考えられる。

### 4. 自己評価

本研究では、キラル計測技術の究極的な到達点ともいえる単一分子レベルでのキラル計測の実現するために、最適な蛍光性キラル分子を合成し、単一分子蛍光計測を応用した単一 FDCCD 計測光学系を構築し、さらに理論計算によって議論を堅固なものとすることで、分子一つ一つのキラリティーを直接計測・議論することを目指して研究を進めてきた。

研究開始当初は、顕微鏡下でのキラル計測におけるアーティファクトの影響や複数の発色団を有する分子の単一分子蛍光計測における問題点に対する認識が乏しく、単一分子 FDCCD 計測で得られる結果を矛盾なく説明することが難しく、幾度となく分子設計や測定光学系の改善を余儀なくされたため、その部分に研究期間の大半を費やすこととなった。しかしながら、非常に多方面にわたる分野の研究者が集まっている本領域の特色を活かし、それぞれの専門分野の方々からアドバイスを頂き、それらの課題を一つ一つ解決し、最終的に本研究に最適と考えられる蛍光性キラル分子を合成し、考えうるアーティファクトの影響を最大限除いた単一分子 FDCCD 計測系を構築することができたことは評価できる点であると考えている。また、分子一つ一つのキラリティーを直接計測することで、分子はその置かれた環境や配向の違いを顕に反映して、分子毎

に異なるキラル応答を示すことを実験的に捉え、その相関性を明らかとし、これまでの分子集団系で観測される  $g$  値は、大小および正負異なる  $g$  値を持つ多数分子の平均値となるために小さな値として観測されるという化学的な本質を明らかにできた点は、今後の新しいキラル計測技術の確立につながる“さきがけ”的な成果となったのではないかと考えている。理論計算においても、分子の向きはランダムであるという前提に基づいた従来の理論計算ではなく、3 次元的な分子の配向まで考慮したキラル応答に対する新しい計算理論を確立できたことも評価できる点であり、今後この計算理論はキラル分子設計に大きく貢献できることを期待している。

本研究の有用性を世間にアピールするためには、具体的な応用例を示すことが重要であるという認識はあったにも関わらず、最適な実験系に辿り着くことができなかった点が悔やまれる。また、本研究ではらせん軸を不斉源とする分子 4 に対してのみ詳細な単一分子キラル計測を行うことができたが、不斉源の異なる他の分子(1-3)については詳細な議論を行うことには至らなかった。原理的にはこれらの分子に対しても単一分子キラル計測を行うことは可能であると考えられる。引き続き研究を継続し、これらの課題を解決し、「4. 今後の展開」の部分で記載した応用展開に取り組むことで、本さきがけ研究で得られた成果を今後大きく発展させることは十分可能であると考えている。

## 5. 研究総括の見解

鏡像対称性を持たない鏡像異性体分子の性質をキラルティーと呼ぶ。身近な例として、limonene 分子の一方はレモンの香りで、その鏡像異性体分子はオレンジの香りがする事が知られている。深港研究者は、この分子のキラリティーの起源を化学的アプローチにより解明することにチャレンジした。分子集団で計測すると平均化された値が得られるが、個々の分子を計測すると同一のキラル分子を計測しているにも関わらず、分子毎に大小・正負と異なる幅広い分布をもったキラル応答を示すことを明らかにした。深港研究員は理論計算と合わせてこの結果を解析し、薄膜中の分子の向きに起因することを突き止めている。今後は一分子レベルで制御した分子のキラリティーを基軸に新しい機能開発が可能になるものと期待している。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. T. Fukaminato, “Single-molecule fluorescence photoswitching: Design and synthesis of photoswitchable fluorescent molecules” *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12, 177–208 (2011)
2. T. Fukaminato, T. Doi, M. Tanaka, N. Tamaoki, K. Okuno, Y. Ishibashi, H. Miyasaka, M. Irie, “Single-molecule Fluorescence Photoswitching of a Diarylethene–Perylenebisimide Dyad: Non-destructive Fluorescence Readout” *Journal of the American Chemical Society*, 133, 4984–4990 (2011)
3. T. Fukaminato, M. Tanaka, T. Doi, N. Tamaoki, T. Katayama, A. Mallick, Y. Ishibashi, H. Miyasaka, M. Irie, “Fluorescence Photoswitching of a Diarylethene–perylenebisimide Dyad Based on Intramolecular Electron Transfer” *Photochemistry and Photobiological Sciences*, 9, 181–187 (2010) <Most popular top 10 articles in February>
4. T. Fukaminato, T. Doi, M. Tanaka, M. Irie, “Photocyclization Reaction of Diarylethene–Perylenebisimide Dyads upon Irradiation with Visible (> 500 nm) light” *Journal of Physical*

Chemistry C, 113, 11623–11627 (2009)

5. M. Saitoh, T. Fukaminato, M. Irie, “Photochromism of a Diarylethene Derivative in Aqueous Solution Capping with a Water-soluble Nano-cavitand” Journal of Photochemistry and Photobiology A, 207, 28–31 (2009)

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

【招待講演】

1. 深港 豪, “フォトクロミック分子を用いた単一分子蛍光の光制御”、第1回光科学異分野横断萌芽研究会、平成23年8月10日、かんぽの宿奈良
2. 深港 豪, “単一分子蛍光の光制御”、レーザー学会学術講演会第31回年次大会:最先端の光の創成を目指したネットワーク研究拠点シンポジウム、平成23年1月10日、電気通信大学

【学会発表(国際)】

1. T. Fukaminato, “Probing the chiral nature by single molecule fluorescence detection”, AS-JST JointWorkshop on Innovative Use of Light and Nano/Bio Materials, May 26, 2011, Academia Sinica, Taipei, Taiwan
2. T. Fukaminato, K. Shinoda, S. Yokojima, S. Nakamura, M. Irie, “Photocyclization reaction of diarylethene-perylenebisimide dyads upon irradiation with visible (> 500 nm) light”, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, December 20, 2010, Honolulu, Hawaii
3. T. Fukaminato, T. Doi, M. Tanaka, N. Tamaoki, K. Okuno, Y. Ishibashi, H. Miyasaka, M. Irie, “Fluorescence photoswitching based on intramolecular electron transfer of diarylethene perylenebisimide dyads”, 6th International Symposium on Organic Photochromism, October 18, 2010, Nisseki Yokohama Hall, Yokohama, Japan
4. T. Fukaminato, M. Irie, “Photoswitching of fluorescence basd on diarylethene photochromism”, New Horizons of Photochromism – From Design of Molecule to Applications –, October 13, 2008, ARRAS, France

【解説／総説・著書】

1. 深港 豪、入江 正浩: “フォトクロミック分子を用いた単一分子蛍光スイッチ”、高分子 Vol. 60, pp.74–75 (2011)、(社)高分子学会