

分子凝集構造のキラリティー解析を目指した円偏光蛍光顕微鏡の開発

妻鳥 紘之・河合 壯

Chirality of Molecular Aggregates Evaluated by Circularly Polarized Luminescence Microscope

Hiroyuki TSUMATORI and Tsuyoshi KAWAI

Recent progress in circularly polarized microscope system is summarized, which is applied for evaluating optical chirality of aggregated colloidal solution of chiral luminescent molecules. The novel optical system allows to evaluate optical dissymmetry of opaque colloidal solutions precisely because of their specific optical configuration. Significant increase of optical dissymmetry in the aggregates suggested optically active self-organized structure in the colloidal particles.

Key words: optical chirality, circularly polarized luminescence, colloidal solution, self-organization, epi-illumination microscopy

タンパクや DNA などの生体分子には、鏡像非対称性、いわゆるキラリティーを有するものが多く知られている。代表的には DNA の二重らせん構造があげられるが、このほかにもタンパク質のらせん構造、いわゆる α -ヘリックス構造やコラーゲンの三重らせん構造など、分子レベルあるいはその会合体レベルでのキラリティーがあげられる。このような分子レベルのキラリティーに加えて、前後左右で非対称な動物の身体、巻貝、多くの植物など、自然界にはキラルな構造が存在している。もちろん、このような自然界における構造の非対称性は精緻な生命現象に必要不可欠であり、生命現象を理解するためには、分子レベルでのキラリティーの評価は必須ともいえる。創薬や生体適合材料などの観点からも、キラリティーの評価や制御は重要な課題となっている。このような生命関連分野のほかにも、液晶などの材料科学分野においてもさまざまなキラル化合物が利用されており、そのキラリティーは光学特性の重要な支配因子となっている¹⁾。

キラリティーを有する分子は、左右の円偏光に対して、異なる屈折率や吸光特性を示す。特に、左右円偏光に対す

る光吸収の起こりやすさ、すなわち吸光係数の差は、比較的簡便に計測が可能であり、その波長依存性が円二色吸収 (circular dichroism; CD) スペクトルである。左右円偏光に対する吸光度の差 $\Delta\epsilon$ の波長依存スペクトルとして与えられる CD スペクトルは、タンパク質の代表的なキラル構造である α -ヘリックス構造など、生体分子の構造解析のための強力な研究ツールとして、その有効性が確立している。CD 計測法は透過光計測法であるために、溶液では比較的少量の試料が必要であることや、固体では試料の調製が困難であること、生組織や細胞などの不均質で光透過性の低い試料、すなわち光散乱性の強い試料に対しては測定精度が保証されないこと、などの本質的な制約がある^{2,3)}。また、通常の計測装置では、細胞や組織内の局所領域の解析や、キラリティーに関する空間分布の解析は困難である^{4,5)}。キラルな計測対象の多くが生体関連物質や液晶など分子同士の会合や凝集が無視できないことを考慮すると、顕微鏡観察下で分子のキラリティーを直接計測する分子キラリティー顕微計測の開発が求められると考えられる。

表1 FDCD と CPL の応用範囲.

	Luminescence ^{a)}						
	Photo-	Thermo-	Tribo-	Chemi-	Bio-	Electrogenerated chemi-	Sono-
FDCD	○	×	×	×	×	×	×
CPL	○	○	○	○	○	○	○

^{a)} IUPAC Gold Book 「Luminescence」より.

CD スペクトルがキラル物質による光の吸収における円偏光非対称性を計測する技術であるのに対して、光の放射における円偏光非対称性を計測するのが円偏光蛍光 (circularly polarized luminescence; CPL) 計測である⁶⁾。光学素過程としての光吸収と光放射の対称性を考慮すると、CD スペクトルと CPL スペクトルは類似の情報を含んでいることが理解される。CD スペクトルは基底状態の分子構造を反映するのに対して、CPL は発光励起状態での分子構造を反映する点には注意が必要である。一方で、計測方法としての制約の観点では、CD 測定が光透過を必要とするのに対して、発光現象を計測する CPL 測定は必ずしも透明な試料に限定されるものではない。CPL 測定は本質的に発光性を有する試料に限定されるが、一般的に発光分光法は吸収分光法よりもはるかに高感度、低バックグラウンドの計測が容易であることから、CPL 計測が比較的少数、低濃度の計測にも適していることが期待される。実際、蛍光測定法では、単一分子レベルの極微量、少数の分子の性質をも解析することが可能である⁷⁾。蛍光計測法は細胞などの試料に関しても高い空間・時間分解能での顕微鏡測が広く用いられていることから、CPL が顕微鏡計測に適した計測法であると期待される。

CPL と類似の発光法によるキラリティー評価法に、蛍光検出 CD 計測 (fluorescence detected circular dichroism; FDCD) 法も検討されている⁸⁾。これは、左右の円偏光励起光に対する発光強度の差を検出するもので、左右円偏光に対する吸収の差 (=CD) を間接的に計測する手法である。FDCD 法により単一分子レベルのキラリティーをも評価可能との報告もなされており、その検証が進められる一方で、蛍光法によるキラリティー評価が注目されている⁹⁻¹¹⁾。

表1にまとめたように、FDCD に対して CPL は光励起に限定されず、さまざまな励起方法による発光現象に適用できる可能性がある。たとえば、電界発光に伴う円偏光発光は円偏光有機 EL として注目されている^{12,13)}。

1. 顕微 CPL 計測法の原理

CPL 計測では、通常の蛍光発光における左右の円偏光成

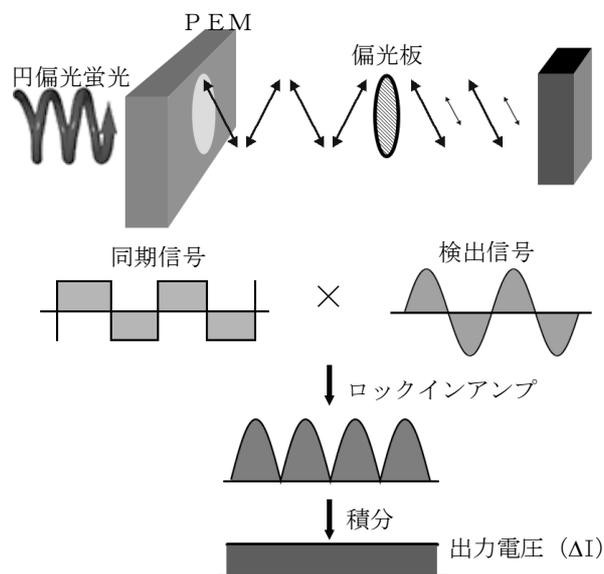


図1 交流検出法による CPL 計測.

分の差を精密に検出することが必要である。通常の有機分子の場合には、左右の円偏光の強度比は、たとえば 50.05 : 49.95 あるいはこれ以下にその差は小さい。このような円偏光強度の組成比のパラメーターとして、非対称性因子 g 値がよく用いられる。

$$g = 2(I^L - I^R) / (I^L + I^R)$$

$|g|$ 値は 0 から 2 の値をとり、理想的な円偏光では $|g| = 2$ である。上の例では $g = 0.002$ 程度で、このような小さな強度差を感度よく計測するためには、通常は交流検出法が用いられる。図1に交流検出法の基本的な考え方を示す。光弾性変調器 (photoelastic modulator; PEM) は、石英ガラスやフッ化カルシウムなどに圧電素子を利用し周期的な圧力を加えることで、入射光に対する複屈折位相差を周期的に変調させる。PEM の変調周波数はおおむね 20~50 kHz 程度である。

PEM に入射した円偏光成分は、偏光楕円率と垂直軸に対する傾きが周期的に変調する楕円偏光に変換される。さらに直線偏光子を通すことで、振幅が周期的に変調する直線偏光となる。したがって、円偏光成分は発光強度の交流変調成分として検出される。実際の蛍光発光には、円偏光

成分だけではなく直線偏光成分も含まれるが、直線偏光成分は PEM と偏光子を透過した後には直流成分として検出される。したがって、光電子増倍管 (photomultiplier tube; PMT) の信号出力の直流成分を I 、交流成分を ΔI とすると、 g 値は $2\Delta I/I$ に比例する。ロックインアンプを PEM の変調周波数 ω に同期させることで ΔI を評価する。CPL 計測では ΔI や g 値の発光波長依存性が重要となるため、直線偏光子と PMT の間に回折格子型分光器を設置することになる。この場合、分光器の光軸は PEM の光学異方軸に対して 45° 傾けることで、回折格子の偏光方向依存性の影響を抑制できる。大きな異方性を有する試料の場合には、発光における直線偏光成分が円偏光検出に影響を及ぼす場合がある。この点については、PEM の変調周波数 ω に対

して 2ω 成分を検討することで、その影響を検証する必要がある^{2,3)}。

図2に、通常のCPL計測系と顕微CPL計測系の概略図を示す。CPL顕微計測系では励起光と発光を同じ対物レンズで集光させるため、ダイクロイックミラー (dichroic mirror; DM) を用いて、励起光と発光の光路を分離している。このような光学系とすることにより、試料に対して同じサイドから励起光照射と蛍光計測を行うことが可能となり、不透明な試料にも対応可能となる。さらに、計測領域が対物レンズの焦点領域に限定されることから、試料の量を CD 計測のミリリットル (ml) レベルからピコリットル (pl) レベルまで減らすことが可能となる。また、試料の位置を変えることで、CPL 強度の空間的依存性すなわち CPL マッピングが可能となる。

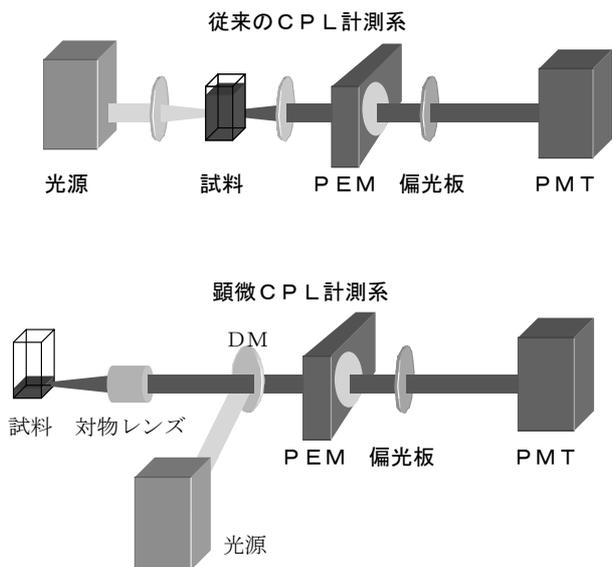


図2 CPL計測系の概略図。

2. 顕微CPL計測系の開発

図3に、われわれが構築した顕微CPL計測系の概略図を示す。光源には Ar^+ レーザー (CW) を用いてランダム偏光に偏光解消したのち、正確に 45° に調整した DM で反射させ、対物レンズに入射させている。試料は3軸自動ステージに固定されており、局所領域の光学キラリティーやその空間分布を評価することが可能である。CCD を用いて観察しながら励起光を試料にフォーカスさせる。CPL 測定時はミラー (M) を光軸から外せるように可動式としている。ここで用いたミラー M をハーフミラーとすることで、CPL 計測と同時に測定領域の観測も可能である。しかしハーフミラーが円偏光を歪める可能性があるため、本装置では可動式ミラーを採用している。試料からの蛍光は PEM と偏光子を経て PMT で検出される。検出されたシグ

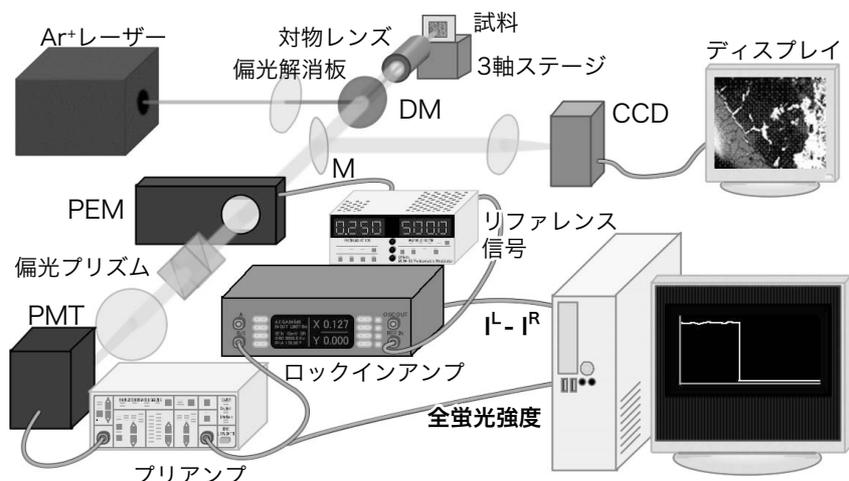


図3 CPL顕微計測系。

ナルは、先に述べた原理に基づき、パソコン上へ蛍光強度 I と左右円偏光の差 (ΔI) が取り込まれる。

本計測器のキャリブレーションを行うために、図4に示した標準物質 **1** を用いた。物質 **1** は蛍光量子収率が88%、非対称性因子 g が $|3 \times 10^{-3}|$ と大きく、CPLのキャリブレーションには最適である。CD計測系のキャリブレーションには従来、カンファーなどが用いられるが、CPL計測系は蛍光検出であるため、蛍光量子収率が高く非対称性因子が比較的大きな物質が望ましい。図4には本計測系で測定した物質 **1** のCPL非対称性因子のスペクトルを示す。S体とR体でミラーイメージのスペクトルを得ることができた。また、これらのスペクトルは市販のCPL計測系と一致している。図4に示す程度のスペクトルはおおよそ10秒程度で取得することが可能である。

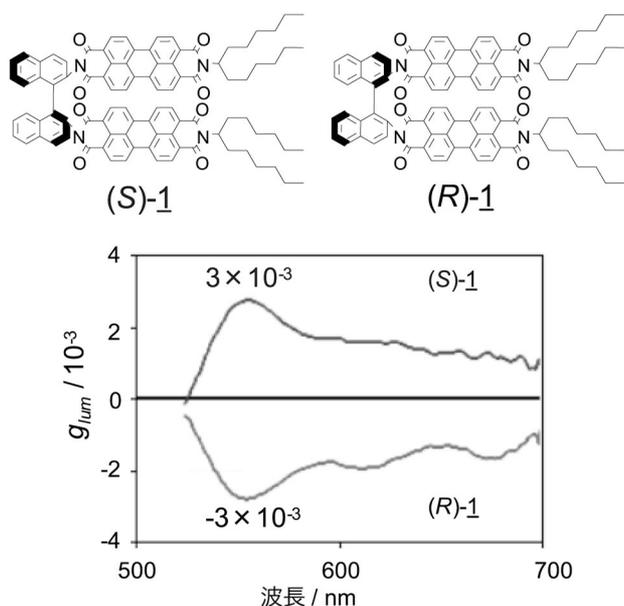


図4 標準物質 **1** のCPLスペクトル。

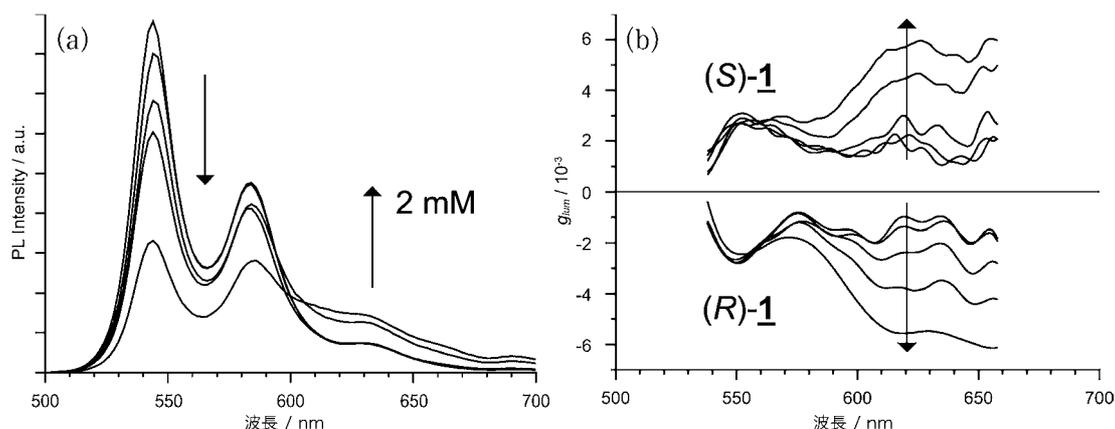


図5 コロイド溶液のCPLスペクトル。

3. 不透明な分子凝集体の光学キラリティー評価

物質 **1** は π - π スタックによる会合や液晶を形成することで知られているペリレンの誘導体である¹⁴⁾。この分子は高濃度領域において分子間相互作用によりコロイド溶液となり、吸収や発光において特徴的な長波長シフトした発光バンドが立ち上がる。このバンドの蛍光寿命が約20 nsと長いことから、分子間相互作用により構造体が形成していることが示唆された¹⁵⁾。図5 (a) には蛍光スペクトルの濃度依存性を示した。濃縮とともにモノマー由来の545 nm周辺のピークが減少し、630 nm周辺の新たな発光バンドが立ち上がることがわかる。図5 (b) にはCPL非対称性因子のスペクトルを示した。モノマー由来の発光波長である545 nm付近における g 値は、高濃度溶液においても変化しなかった¹⁶⁾。このことは、濃度変化による物質 **1** の構造変化はなく、周囲に存在する溶媒や凝集体からの影響を受けていないことが示唆される。また、光学活性な凝集体を円偏光が通過した場合、円偏光複屈折 (CB) や直線二色性 (LD)、直線複屈折 (LB) により、アーティファクトが発生する可能性がある。特に物質 **1** の凝集体は吸収波長が550 nm付近まで伸びるため、濃度が増加するに従いCPLが歪められることが予測されるが、本測定では観測されなかった。これは高濃度条件下では励起光が試料の奥まで透過せず、ほとんど表面からの発光をとらえているためである。顕微CPL計測系の有効性を示している。

濃度増加に伴い、630 nm付近の g 値が増強する現象が見いだされた。コロイド粒子において分子がランダムにスタッキングして構造体を形成している場合、このような g 値の増強は説明できない。例えば、キラリティーをもたないペリレン分子を同様に高濃度条件下でCPL測定を行った場合、長波長の発光バンドは観測されるが、CPLは観測されない。したがって、この g 値の増強は、コロイド

溶液中で物質 **1** がキラルな高次構造を形成していることを意味している。このような g 値の増強は、CD 計測の領域では励起子カップリング円二色性 (exciton-coupled circular dichroism; ECCD) としてよく知られた現象であり¹⁾、現在までに多数の論文で報告されている。不透明なコロイド溶液から CPL により g 値の増強を観測したのは、本研究が初めてである。

以上から、顕微 CPL 計測系が蛍光性生体試料やデバイスなどのキラリティー解析において有用であり、このようなキラリティー解析手法の需要が今後ますます高まると期待される。

本稿で紹介した CPL 顕微計測の最大の特徴は、同一面での励起と計測による不均質不透明な試料のキラリティー評価である。このような試料におけるキラリティーの定量化は、従来の CD スペクトルでは困難である。積分球を用いる CD 計測装置も市販されているが、 g 値の正確な評価には対応していない。また、CPL 顕微計測は微量試料のキラリティー評価にも向いていると考えられる。

将来は、不均質な膜構造や細胞などにおけるキラリティーの空間マッピングが可能となると考えている。ゲル、キャスト膜、液晶などさまざまな不均質試料の CPL の場所依存性が解明され、局所構造の不均質性や時空間にわたるゆらぎに関する新たな知見が得られると期待している。

文 献

- 1) N. Berova, K. Nakanishi and R. W. Woody (Eds.): *Circular Dichroism: Principles and Applications*, 2nd ed. (Wiley, New York, 2000)
- 2) T. Harada; H. Hayakawa and R. Kuroda: "Vertical-type chiroptical spectrophotometer (I) : Instrumentation and application to diffuse reflectance circular dichroism measurement," *Rev. Sci. Instrum.*, **79** (2008) 073103.
- 3) N. Asano, T. Harada, T. Sato, N. Tajimac and R. Kuroda: "Supramolecular chirality measured by diffuse reflectance circular dichroism spectroscopy," *Chem. Commun.* (2009) 899-901.
- 4) M. Yamaguchi, K. Mawatari, A. Hibara, M. Tokeshi and T. Kitamori: "Circular dichroism thermal lens microscope for sensitive chiral analysis on microchip," *Anal. Chem.*, **78** (2006) 2646-2650.
- 5) K. Claborn, E. Puklin-Faucher, M. Kurimoto, W. Kaminsky and B. Kahr: "Circular dichroism imaging microscopy: Application to enantiomorphous twinning in biaxial crystals of 1,8-dihydroxyanthraquinone," *J. Am. Chem. Soc.*, **125** (2003) 14825-14831.
- 6) J. P. Riehl and F. S. Richardson: "Circularly polarized luminescence spectroscopy," *Chem. Rev.*, **86** (1986) 1-16.
- 7) M. Irie, T. Fukaminato, T. Sasaki, N. Tamai and T. Kawai: "A digital fluorescent molecular photoswitch," *Nature*, **420** (2002) 759-760.
- 8) D. H. Turner, I. Tinoco, Jr. and M. F. Maester: "Fluorescence detected circular dichroism," *J. Am. Chem. Soc.*, **96** (1974) 4340-4342.
- 9) R. Hassey, E. J. Swain, N. I. Hammer, D. Venkataraman and M. D. Barnes: "Probing the chiroptical response of a single molecule," *Science*, **314** (2006) 1437.
- 10) Y. Q. Tang, T. A. Cook and A. E. Cohen: "Limits on fluorescence detected circular dichroism of single helicene molecules," *J. Phys. Chem. A*, **113** (2009) 6213-6216.
- 11) M. D. Barnes, R. H. Paradise, E. Swain, D. Venkataraman and N. I. Hammer: "Comment on "Limits on fluorescence detected circular dichroism of single helicene molecules",", *J. Phys. Chem. A*, **113** (2009) 9757-9758.
- 12) H. Goto and K. Akagi: "Optically active conjugated polymers prepared from achiral monomers by polycondensation in a chiral nematic solvent," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44** (2005) 4322-4328.
- 13) E. Peeters, M. P. T. Christiaans, R. A. J. Janssen, H. F. M. Schoo, H. P. J. M. Dekkers and E. W. Meijer: "Circularly polarized electroluminescence from a polymer light-emitting diode," *J. Am. Chem. Soc.*, **119** (1997) 9909-9910.
- 14) T. Kawai, K. Kawamura, H. Tsumatori, M. Ishikawa, M. Naito, M. Fujiki and T. Nakashima: "Circularly polarized luminescence of a fluorescent chiral binaphthylene-perylenebiscarboxy-diimide dimer," *Chem. Phys. Chem.*, **8** (2007) 1465-1468.
- 15) H. Tsumatori, T. Nakashima, J. Yuasa and T. Kawai: "Enhanced circularly polarized emission of chiral dimer of pi-conjugated perylene in opaque film," *Synth. Met.*, **152** (2009) 952-954.
- 16) H. Tsumatori, T. Nakashima and T. Kawai: "Observation of chiral aggregate growth of perylene derivative in opaque solution by circularly polarized luminescence (CPL)," *Org. Lett.* (in press).

(2010年4月16日受理)