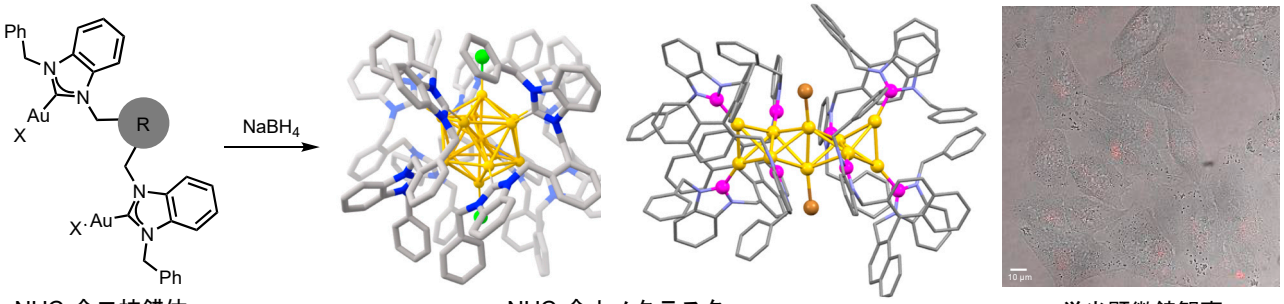
207　安定金ナノ物質を活用する新規イメージング材料の開発	南保　正和

【目的】本研究では含窒素ヘテロサイクリックカルベン（NHC）配位子を活用した安定金ナノクラスターを創出することで、生体イメージングを志向した新規ナノ材料の開発を目的とした。具体的には独自の NHC 配位子の設計によって安定性の高い金ナノクラスターを精密に作り分ける合成法を確立し、その光学特性を調査した。また得られた金ナノクラスターに対して HeLa 細胞を用いてイメージング材料としての応用可能性を検証した。

【方法】1. 2 座 NHC-金ナノクラスターの合成：2 座 NHC 配位子から金錯体を調製し、還元によって金ナノクラスターの合成を行った。得られた金ナノクラスターの物性および安定性の評価を行った。2. 光学的に純粋な NHC-金ナノクラスターの合成：光学活性なビナフチル骨格を含む 2 座 NHC 配位子を設計し、これを用いた金ナノクラスターの合成を行った。3. イメージング材料としての応用可能性の検証：蛍光を示す金ナノクラスターを用いて HeLa 細胞の顕微鏡観察を行った。また MTT アッセイを用いて細胞毒性を評価した。

【結果】金ナノクラスターの安定性の向上を期待し、NHC を様々な置換基で架橋した 2 座配位子から塩化金二核錯体を調製した。さらに $NaBH_4$ による還元を行い、その後塩酸処理を行うことで金原子 13 個、NHC 配位子 5 つ、塩素原子 2 個から成る金ナノクラスターが選択的に得られることを見出した。詳細な構造は単結晶 X 線構造解析によって確認し、興味深いことに NHC 配位子はアキラルにも関わらず金ナノクラスターは螺旋キラリティを有していることが分かった。得られた金ナノクラスターは赤色発光を示し、その量子収率は 23%と既存の金ナノクラスターの中でも極めて高いものであった。溶液を長時間の可視光照射や加熱を行ってもほとんど分解が見られなかったことから非常に高い安定性も兼ね備えていることが明らかとなった。またキラルなビナフチル骨格を含む 2 座 NHC 配位子を有する臭化金二核錯体を調製し、$NaBH_4$ による還元を行ったところ金原子 10 個、NHC 配位子 4 つ、臭素原子 2 個から成ることが示された。単結晶 X 線構造解析によって、中心骨格は 2 つの四面体構造を 2 つの金原子で架橋した様な新奇な扁長楕円体をしていることが明らかとなった。本合成法は光学分割することなく純粋な NHC-金ナノクラスターを得るための有用な手法の 1 つであると考えられる。蛍光を示した NHC-Au_{13} ナノクラスターに関しては溶液を HeLa 細胞に加えて蛍光顕微鏡にて観察を行った。その結果、HeLa 細胞内に発光が検出され金ナノクラスターが細胞内に取り込まれていることが確認された。次に MTT アッセイを用いて金ナノクラスターの細胞毒性評価を行った。その結果、実際に観察を行った際の溶液においても致命的な細胞死は確認されなかったことから金ナノクラスターの毒性は低いと考えられ、金ナノクラスターのイメージング材料の応用可能性を示すことができた。

NHC-金ナノクラスターの創出とイメージング材料への展開



NHC-金二核錯体　　NHC-金ナノクラスター　　蛍光顕微鏡観察

207. 安定金ナノ物質を活用する新規イメージング材料の開発

南保　正和

名古屋大学 トランスフォーマティブ生命分子研究所

Key words：金属ナノクラスター，金，カルベン配位子，イメージング材料

緒　言

蛍光分子を用いたイメージングは今や生物学、薬学、医学研究において不可欠な基本ツールの一つであり、可視化によって未知の生命現象や生理機能のリアルタイム解析を実現した革新的技術といえる。近年プローブの分子設計による多機能化と顕微鏡技術の高度化によってイメージング技術は進化し続けており、それを利用した医療や創薬への展開が急速に進んでいる。最近では蛍光分子のみならず、生体親和性に優れ、かつ電子顕微鏡でも追跡が可能な物質として金ナノ物質が注目されている［1]。イメージングに適した金属ナノ物質の創出にはサイズや形状の制御だけでなく、ナノ構造の維持や新たな機能の付与を可能とする表面修飾技術が必要となる。これまでにチオールをはじめとする配位子を金表面と結合させる方法が現在最も信頼性の高い表面修飾法として多用されているが、必ずしも万能ではない。例えば、チオールは酸化されやすい官能基であるために酸化によって金属表面から解離してしまう。また金属表面と結合したチオールは他のチオールと容易に配位子交換を起こすことが知られているため、生体内ではシステインやグルタチオンなどの生体チオールとの交換によって望みの分子機能の喪失が懸念されている。さらにチオール修飾金ナノクラスターは蛍光を示すものの、その量子収率は非常に低くイメージング材料への応用に対する大きな障害となっている［2]。したがって、その解決にはチオールに代わる新たな配位子の開発が不可欠である。

最近我々の研究グループでは含窒素ヘテロサイクリックカルベン（NHC）を配位子とする新しい金ナノ物質の創製を行ってきた。特に注目したのは NHC の炭素 - 金属間の結合の強さである。実際、金 - 硫黄と金 - 炭素（NHC）の結合エネルギーを比較すると、それぞれ 125 kJ/mol、158 kJ/mol であり、NHC 配位子は金原子からの解離や交換が起こりにくいことを示唆している。この知見を基に、NHC-金錯体の還元反応を利用することで金ナノ粒子の合成法の開発に成功した［3]。また既知のホスフィン - 金クラスターを足掛かりとして、ホスフィンと NHC の配位子交換による世界初の NHC を有する金ナノクラスターの合成にも成功した［4]。得られた NHC-金ナノクラスターは配位子交換前と比較して熱安定性が飛躍的に向上することが明らかにしている。これらの研究過程を通じ、NHC を用いる戦略がナノ構造の安定化と機能化を両立させるユニバーサルな表面修飾法となる可能性を秘めており、それによって金属ナノ物質の光学特性を利用した新たな科学が展開できると考えられる。

そこで本研究では NHC 配位子を活用した安定金ナノクラスターを創出することで生体イメージングを志向した新規ナノ材料の開発を目的とした。様々な検討を行った結果、独自の NHC 配位子の設計によって多様な金ナノクラスターを作り分ける合成法を開発し、その研究過程でナノクラスターに発光およびキラリティを有することを明らかにした。また得られた金ナノクラスターは HeLa 細胞へ取り込まれ、細胞毒性はほとんどみられなかったことからイメージング材料としての応用が期待される。

方　法

1. 2座 NHC-金ナノクラスターの合成

2 座 NHC 配位子から金錯体を調製し、還元によって金ナノクラスターの合成を行った。得られた金ナノクラスターの物性および安定性の評価を行った。

2. 光学的に純粋な NHC-金ナノクラスターの合成

光学活性なビナフチル骨格を含む 2 座 NHC 配位子を設計し、これを用いた金ナノクラスターの合成を行った。

3. イメージング材料としての応用可能性の検証

蛍光を示す金ナノクラスターを用いて HeLa 細胞の顕微鏡観察を行った。また MTT アッセイを用いて細胞毒性を評価した。

結果および考察

1. 2 座 NHC-金ナノクラスターの合成（図 1）

以前に開発した NHC 配位子を有する金ナノクラスターは発光を示したが、光や熱に対する安定性に乏しいものであった。そこで NHC を架橋した 2 座配位子を用いることでより強固に金中心に結合することで金ナノクラスターの安定性の向上を期待した。まず NHC を様々な置換基で架橋した配位子を合成し、そこから塩化金二核錯体を調製した。さらに $NaBH_4$ による還元を行い、その後塩酸処理を行うことで金原子 13 個、NHC 配位子 5 つ、塩素原子 2 個から成る金ナノクラスターが選択的に得られることを見出した [5]。詳細な構造は単結晶 X 線構造解析にて決定でき、金中心は 20 面体をしており、上下に 2 つ塩素原子、側面に 5 つの NHC 配位子がねじれた形で結合していた。それによって、NHC 配位子はアキラルにも関わらず金ナノクラスターは螺旋キラリティを有していることが分かった。得られた金ナノクラスターは赤色発光を示し、その量子収率は 23%と既存の金ナノクラスターの中でも極めて高いものであった。また溶液を長時間の可視光照射や加熱を行ってもほとんど分解が見られなかったことから非常に高い安定性も兼ね備えていることが明らかとなった。

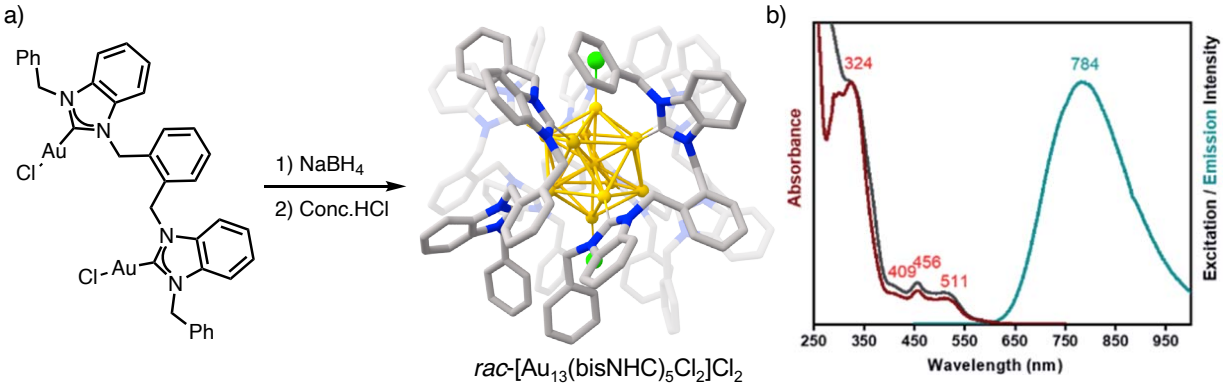


図 1. 2 座 NHC 配位子を用いた Au_{13} ナノクラスターの合成

a）合成スキーム。

b）UV-Vis 吸収スペクトル（赤色）、発光スペクトル（緑色）、励起スペクトル（黒色）。

2. 光学的に純粋な NHC-金ナノクラスターの合成

前述したように 2 座 NHC 配位子を用いる戦略によって、優れた熱安定性と発光を示す金ナノクラスターを得ることに成功した。イメージング材料に適した金ナノ材料の創製には、より強い蛍光を示す金ナノクラスターの開発が必要である。その解決策として、より剛直な NHC 配位子を用いることで無輻射失活が抑えられ、蛍光量子収率の向上が可能であると想定した。本研究においては架橋部位を *o*-キシリル基からより剛直な構造であるビナフチルメチル基に変更した NHC を新たに設計し、これを用いた金ナノクラスター合成を試みた。またビナフチル骨格は潜在的にキラリティを有し、光学活性体が入手容易な BINOL を出発物質にすることで光学的に純粋な配位子が合成可能である点もキラルな金ナノクラスターの合成に有用であると考えた。

まず *S* 体の 2 座 NHC 配位子を有する臭化金二核錯体を調製し、$NaBH_4$ による還元を行った（図 2）[6]。ESI-MS

によって、得られた金ナノクラスターは 1.とは異なり、金原子 10 個、NHC 配位子 4 つ、臭素原子 2 個から成ることが示された。単結晶 X 線構造解析によって、中心骨格は 2 つの四面体構造を 2 つの金原子で架橋した様な新奇な扁長楕円体をしていることが明らかとなった。金ナノクラスターは発光特性を示さなかったが 546 nm に特異な UV-Vis 吸収を示し、量子化学計算を用いることで中心骨格に由来するものであることを示すことができた。さらに *S* 体と *R* 体の金ナノクラスターの CD スペクトルは鏡面対称であり、これはキラリティが NHC 配位子から金中心に転写されていることを示唆した。本合成法は光学分割することなく純粋な NHC-金ナノクラスターを得るための有用な手法の 1 つであると考えられる。

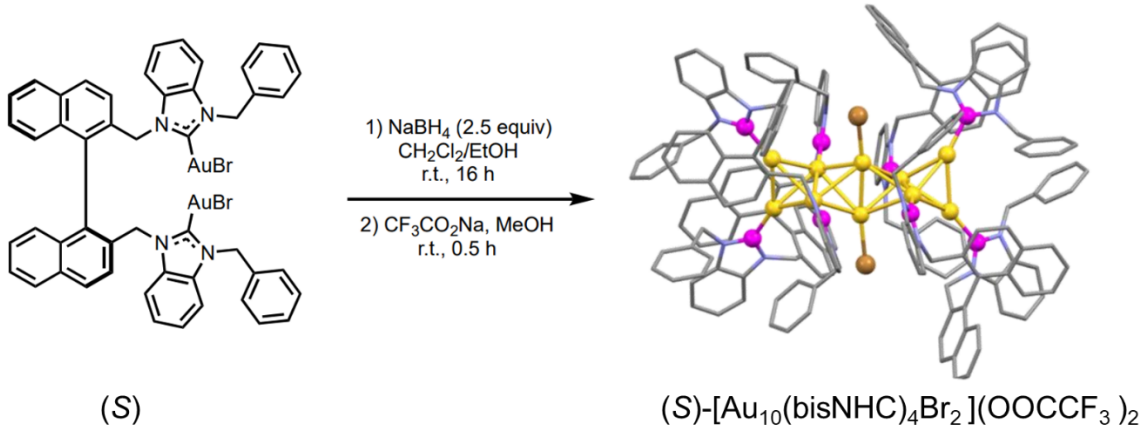


図 2.　キラルビナフチル骨格を有する NHC-Au_{10}ナノクラスターの合成

3. イメージング材料としての応用可能性の検証

1.で合成した発光を示す金ナノクラスターを用いてイメージング材料の応用可能性を検証した。NHC-Au_{13}ナノクラスターの溶液（300 nM 0.1% DMSO 水溶液）を調製し、HeLa 細胞に加えて蛍光顕微鏡にて観察を行った（図 3）。その結果、HeLa 細胞内に発光が検出され金ナノクラスターが細胞内に取り込まれていることが確認された。細胞内にはエンドサイトーシスによって取り込まれていたと考えられる。次に MTT アッセイを用いて金ナノクラスターの細胞毒性評価を行った。その結果、実際に観察を行った 300 nM の溶液においても致命的な細胞死は確認されなかったことから金ナノクラスターの毒性は低いと考えられる。

本研究において金ナノクラスターのイメージング材料の応用可能性を示すことができたが、発光強度や波長、細胞への取り込み効率の改善が今後の課題である。これらの課題に対しては NHC 上の置換基の修飾によって制御・改善可能であると考えており、現在検討を進めている段階である。

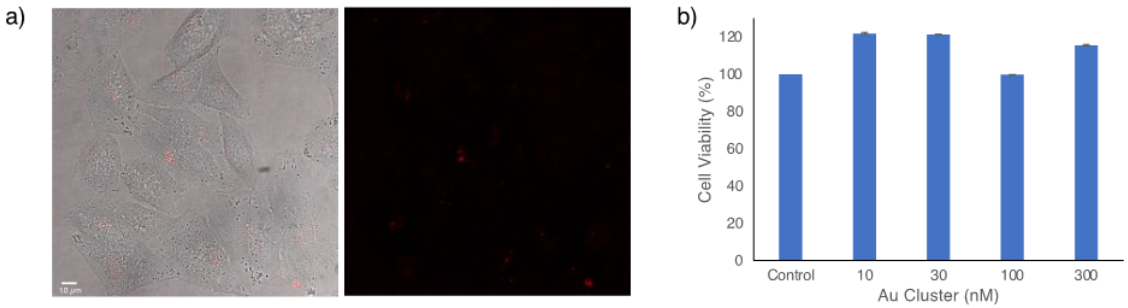


図 3.　NHC-Au_{13}クラスターのイメージング特性評価

a)　HeLa 細胞の顕微鏡観察。左：明視野＋蛍光観察、右：蛍光観察、検出条件：励起波長 488 nm、蛍光波長 700～740 nm。スケールバー：10 μm。

b)　MTT アッセイによる細胞毒性評価。

共同研究者・謝辞

本研究はクイーンズ大学（カナダ）の Cathleen Crudden 教授と共同で行ったものであり、ここに深く感謝いたします。研究成果は当研究グループ所属の学生、博士研究員、技術補佐員諸氏のたゆまぬ努力によって得られたものである。また細胞を用いたイメージングに関しては当研究所ライブイメージングセンターの佐藤良勝特任准教授にご指導をいただき、ここに感謝の意を表します。本研究は公益財団法人上原記念生命科学財団の支援を受けて行われたものであり、厚く御礼申し上げます。

文　献

1） Smith B R, Gambhir S. Nanomaterials for in vivo imaging. Chem Rev. 2017 Feb 8;117(3):901-986. Epub 2017 Jan 3. PMID: 28045253 DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00073

2） Zhu M, Aikens C M, Hollander F J, Schatz G C, Jin R. Correlating the crystal structure of a thiol-protected Au25 cluster and optical properties. J Am Chem Soc. 2008 May 7;130(18):5883-5. Epub 2008 Apr 12. PMID: 18407639 DOI: 10.1021/ja801173r

3） Man R W Y, Li C-H, MacLean M W A, Zenkina O V, Zamora M T, Saunders L N, Rousina-Webb A, Nambo M, Crudden C M. Ultrastable Gold Nanoparticles Modified by Bidentate N-Heterocyclic Carbene Ligands. J Am Chem Soc. 2018 Feb 7;140(5):1576-1579. Epub 2018 Jan 24. PMID: 29211456 DOI: 10.1021/jacs.7b08516

4） Narouz M R, Osten K M, Unsworth P J, Man R W Y, Salorinne K, Takano S, Tomihara R, Kaappa S, Malola S, Dinh C T, Padmos J D, Ayoo K, Garrett P J, Nambo M, Horton J H, Sargent E H, Hakkinen H, Tsukuda T, Crudden C M. N-heterocyclic carbene-functionalized magic-number gold nanoclusters. Nat Chem. 2019 May;11(5):419-425. Epub 2019 Apr 15. PMID: 30988416 DOI: 10.1038/s41557-019-0246-5

5） Yi H, Osten K M, Levchenko T I, Veinot A J, Aramaki Y, Ooi T, Nambo M, Crudden C M. Synthesis and enantioseparation of chiral Au_{13} nanoclusters protected by bis- N-heterocyclic carbene ligands. Chem Sci. 2021 Jul 2;12(31):10436-10440. Epub 2021 Aug 11. PMID: 34447535 DOI: 10.1039/d1sc03076k

6） Man R W Y, Yi H, Malola S, Takano S, Tsukuda T, Häkkinen Nambo M, Crudden C M. Synthesis and Characterization of Enantiopure Chiral Bis NHC-Stabilized Edge-Shared Au_{10} Nanocluster with Unique Prolate Shape. J Am Chem Soc. 2022 Feb 9;144(5):2056-2061. Epub 2022 Jan 31. PMID: 35100506 DOI: 10.1021/jacs.1c11857