

ナノグラフェンにおける蛍光回復

有機・炭素ナノ材料ユニット 准教授 成田明光



OKINAWA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY GRADUATE UNIVERSITY

沖縄科学技術大学院大学



OIST

グラフェンとナノグラフェン





赤色蛍光性ナノグラフェン「DBOV」の合成



単結晶X線構造解析





超解像バイオイメージングに使用可能な 水溶性DBOV誘導体の合成





クリックケミストリーによる標的化のための アジド基を有する水溶性DBOV誘導体の合成

末端アルキンを有するピューロマイシン誘導体(OPP)を用いたクリック反応で新生タンパク質を標識





OIST

クリックケミストリーによる標的化のための アジド基を有する水溶性DBOV誘導体の合成

クリック反応を用いた標識による神経細胞内の新生タンパク質の超解像(SMLM)イメージング



従来のイメージングとSMLMの比較



新生タンパク質分布の可視化とボロノイ図



J. Am. Chem. Soc. 2024, 146, 5195.



OIST

蛍光色素として高い光安定性



褪色防止剤なしの環境でのナノグラフェン(例: DBOV)と 有機蛍光色素(例: Alexa 647)の光安定性をイメージ ング時間の関数として示したもの (532 nm, レーザー強度: 25.59 W/cm²)



ナノグラフェンは、通常の有機蛍光材料よりも 光安定性が高い

しかし、ナノグラフェンの蛍光も励起レーザー/ ビームの影響で次第に減衰する



新技術: 蛍光の回復

ナノグラフェンの蛍光は、失活後に長波長(例:近赤外域)の光により 100%回復される



DIST

共焦点顕微鏡像





ROI1: Excitation (561 nm) scanned area ROI2: STED beam (775 nm) scanned area

Confocal: 共焦点顕微鏡

STED: 誘導放出抑制顕微鏡 (Stimulated Emission Depletion Microscopy)



DIST

ナノグラフェンの励起光による蛍光失活 及び 近赤外レーザーによる蛍光回復のメカニズム考察



ナノグラフェン(例:DBOV-Mes)の蛍光失活および回復のメカニズム

ナノグラフェンDBOV-Mesの分子状態(基底状態DBOV-Mes、蛍光 励起状態DBOV-Mes*、蛍光失活状態DBOV-Mes^{•+})を示す



共焦点顕微鏡 及び STED観察におけるDBOV-Mesの蛍光保持率



STEDイメージング中に蛍光回復可能





OIST

蛍光回復/再活性化は様々な環境で実現





応用1 蛍光ミクロスフィア

以下のようなライフサイエンスを中心とした幅広い用途で使用:

- ▶ 血流測定
- > トレース
- ➤ in vivo イメージング
- ▶ イメージング校正
- ▶ フローサイトメーターの校正







୬୯

OIST

新技術:ナノグラフェンを利用した蛍光ビーズ





安定性





多色ナノグラフェン(紫外~近赤外)



- Star OIST



ナノグラフェンによる多色ビーズ(紫外~近赤外)

EX: 8 LEDs: 390, 440, 475, 510, 555, 575, 635, 747 nm, wide field







市販の蛍光ビーズとの比較

ナノグラフェンPSビーズ, 0.1 μm

市販のTetraSpeck, 0.1 µm

633, 561, 458, 405 レーザー 市販のビーズと同等の性能





蛍光ビーズの輝度の最適化

ナノグラフェン	λ _{abs} ^a [nm]	λ _{em} ª [nm]	$oldsymbol{\Phi}_{PL}{}^{a,b}$	Extinction [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Brightness [M ⁻¹ cm ⁻¹]
DDPB-Mes	394, 423	450	0.44	33000@405	14520
DBOV-Mes	564, 610	614, 666	0.79	51000@561 nm	40290
DBDNC	374, 580, 635	643, 698	0.54	57000@633 nm	30780
TBDNP	402 <i>,</i> 442, 805	820, 910	0.14	2000@750 nm	280

^aトルエン中10⁻⁵ Mの濃度で測定; ^b絶対PLQY

輝度は調節可能





新技術の特徴・従来技術との比較

1) アジ化ナトリウム等の安定剤が不要で、通常のバッファ中での 使用が可能

2) 低温保管(2~8℃等)が不要で、常温保存可能

3) 市販ビーズは近赤外がない等の制限があるが、本技術では 紫外〜近赤外に幅広く対応





応用2 バイオミメティックリポソーム



リポソームの臨床応用





ナノグラフェン標識リポソームの調製



PC: phosphatidylcholine DOPE: dioleoylphosphatidylethanolamine

動的光散乱方による平均サイズ: 279 nm

Svenja Morsbach博士, Katharina Landfester教授 (マックス・プランク高分子研究所)との共同研究





Sys

OIST

ナノグラフェン標識リポソームのSTED超解像イメージング



スケールバー: 500 nm

- ▶ PBS中でのイメージング(褪色防止剤は不要)
- ▶ サンプルをPBSに15ヶ月間保存しても、ナノグラフェンは依然として非常によく機能



応用3単一光子エミッター

- 量子情報通信を含む量子光技術に必要な単一光子パルスを生成する 量子光源
- 従来技術の問題
 - レーザー光の減衰:光子数を一定にするのが困難
 - 半導体量子ドット:物性が欠陥状態に大きく依存
- ナノグラフェンを利用し、真の単一光子エミッターを提供できる可能性 (cf. Nat. Commun. 2018, 9, 3470.)
- 蛍光回復により安定・長期の単光子発光を実現できる可能性





実用化に向けた課題

バイオイメージング用の蛍光プローブとしての実用化には、 細胞膜透過や特定の部位をターゲットできる誘導体群の ライブラリーを確立する必要あり





企業への期待

- 新たなバイオイメージング用の蛍光プローブや次世代発光 デバイスの開発を考えている企業様には本技術が有用と 思われる
- このような分野に興味がある企業様との共同研究を希望





本技術に関する知的財産権

発明の名称: FLUORESCENCE RECOVERY IN NANOGRAPHENE

出願番号 : EP24165695.8

出 願 人:沖縄科学技術大学院大学学園、マックス・プランク学術振興協会

発明者:成田明光、嘉部量太、Xiaomin Liu、Qiqi Yang、 Mischa Bonn







沖縄科学技術大学院大学 OIST │ Innovation

技術移転セクション E-mail: tls@oist.jp

