

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究課題

「蛋白質系レーザー化学を駆使した新規分析システムの構築」

研究期間：平成14年3月1日～平成17年3月31日

研究代表者

坪井 泰之

北海道大学 大学院理学研究科 助教授

1 . 研究テーマ

- (1)研究領域 : 発展・継続研究
- (2)研究総括 : 坪井泰之(本人)
- (3)研究代表者 : 坪井泰之(本人)
- (4)研究課題名 : 蛋白質系レーザー化学を駆使した新規分析システムの構築
- (5)研究期間 : 平成 14年 2月 ~ 平成 17年 3月

2 . 研究実施の概要

<基本構想> 研究代表者(坪井)は、JST「さきがけ研究21」(1998~2001)において「蛋白質系物質のレーザー化学」に関する系統的な研究を展開し、以下に略記するような重要な知見や技術を確立した。代表的な単純蛋白質であるフィブロインなどを対象にし、例えば、レーザー光により蛋白質の薄膜を固体基板上に作製できること、その薄膜の二次構造を制御できること、蛋白質の二次構造を変換できること、などである。蛋白質系分子の光化学/レーザー化学は基礎的に興味深いだけでなく、各種レーザー分光分析やバイオエレクトロニクス、レーザー医療の観点からも重要である。

このように、蛋白質系分子に対するプロセッシング・ツールとしてのレーザーに大きな可能性を確信した代表者は、本「発展・継続」研究において、上記の発展的応用段階に位置づけられる研究を計画した。本研究は、上記で得られた知見や技術を駆使して、生体物質の新規な分析システムを構築することを目的に推進するものである。

具体的には、以下の二つのテーマを大きな目的に設定した。

(i) 生体機能分子で修飾したマイクロチップ分析チップの構築：

上記を応用に発展させたものであり、固体基板上に酵素などの機能性蛋白質をレーザー光で固定/堆積させ、分析/検出機能を有するマイクロチップを作製する。

(ii) レーザートラップ・ラマン顕微鏡の構築：

上記(i)で作製したマイクロチップの解析用に、そして上記で得たアイデアをさらに膨らませ、具現化するために構築を行う。通常の顕微ラマン分光計に、レーザー捕捉機能を付与し、さらに極めて大きな放射圧を印加できるように工夫する。

これらに加え、研究遂行に伴い得たアイデア、(iii)蛋白質系分子の構造変化のダイナミクスを追跡する圧力/温度ジャンプ計測システムの構築、に関する研究も目指し、若干の成果を得た。

<研究の実施と成果> 上記の研究構想に基づく研究を実施した結果、幾つかの成果を挙げることができた。いずれも、“レーザーを用いて初めて実現できる”ことを常に念頭においている。以下、その概略を述べる。

(1) 生体機能分子で修飾したマイクロチップ分析チップの構築：

成果その1：レーザー転写法によりATP検出型マイクロチップの作製に成功した。

レーザーによる“物質移動”の特徴を利用した研究である。レーザー堆積/転写法の応用研究であり、ATP検出型マイクロチップの作製に成功した。レーザー転写法を用い、さらに基板(チップ材質)として柔軟なポリジメチルシロキサン(PDMS)を選び、ルシフェラーゼを固定したマイクロチップの作製を試みた。ATP(アデノシン三リン酸)は生体エネルギー貯蔵変換物質であり、ルシフェラーゼはルシフェリン存在下においてATPと反応して発光を示す。

レーザー転写法において、レーザー波長、強度、集光照射配置を詳細に最適化したところ、PDMS基板上にルシフェラーゼのマイクロスポット(そのサイズと形状はレーザー集光スポットと一致する)を固定出来た。そのスポットにルシフェリン/ATP水溶液を滴下したところ、明瞭な発光が観測され、その発光スペクトルは当該発光スペクトルと完全に一致した。つまり、生理活性を保持したルシフェラーゼの転写に成功した。さらに、発光スポットのサイズも明確に固定スポットをメモリーしていた。

ATP 検出型マイクロチップの報告例は存在するが、レーザー転写法を用いた作製例は本研究が初めてである。本研究成果は、レーザーパラメータを最適化することにより、簡便な方法でバイオマテリアルを固定できることを示しており、マイクロチップ材料として大きく期待されている PDMS に対し、簡便かつ高速にバイオマテリアルを微細集積固定できる大きな可能性を示している。

(2) レーザートラップ・ラマン顕微鏡の構築

成果その 1 : 高い放射圧を印加できるレーザートラップ・共焦点型ラマン顕微鏡を開発した。

成果その 2 : 代表的な感熱応答型高分子系に対し、広波数範囲のラマンスペクトルの計測に初めて成功した。

成果その 3 : 上記高分子系において、感熱応答型相転移/相分離を光(放射圧)によっても誘起できることを初めて示した。

レーザーによる“放射圧”を駆使した研究である。マイクロチップ内での反応や、光による蛋白質系分子の構造変化をさらに解析する目的で、レーザートラップ機能を有した共焦点型ラマン顕微鏡の開発を行った。このような顕微鏡の開発例は、国内外で数例あるが、特に高い放射圧を印加できるよう工夫した点が我々の装置の特徴である。この顕微鏡により、代表的な感熱応答型高分子であるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAM)やポリビニルメチルエーテル(PVME)の光誘起相転移/相分離の研究を行った。PNIPAMやPVMEは水溶液中において、温度上昇によりコイル型からグロビュール型に相転移/相分離を起こすことでよく知られており、最も単純な蛋白質のモデル化合物であるとみなされている。

PNIPAM、PVMEの水溶液を対象に、広い波数範囲(500 ~ 3500 cm^{-1})に渡るラマンスペクトルの計測に初めて成功した。これらの化合物のラマン散乱強度は極めて微弱であるが、共焦点型光学配置によりバックグラウンド光を大きく低減でき、測定することが出来た。さらに、放射圧印加下での重水溶液中(光熱効果が無視できる)のラマンスペクトルを詳細に解析した。その結果、光(放射圧)がコイル グロビュール型相転移/相分離を誘起できることを実験的に初めて示した。

今後、様々な蛋白質系分子の光誘起構造変化/相転移を探っていく。具体的なプランの詳細を記すことは避けるが、蛋白質系分子における秩序構造の形成機構の解明に本手法が威力を発揮すると考えている。

(3) 蛋白質系分子の構造変化計測を指向した圧力/温度ジャンプ計測システムの構築

成果 : レーザー衝撃波分光計測システムを開発し、摩擦発光計測に応用した。

成果 : レーザー温度ジャンプ法により、感熱応答型高分子系の相分離ダイナミクスを明らかにした。

レーザーによる“衝撃波”を利用した研究である。レーザー衝撃波により、蛋白質の構造変化をトリガーできれば蛋白質のフォールディングダイナミクスを追跡できると考えた。研究期間内にはそこまで到達できなかったが、レーザー衝撃波の発生と同期した時間分解型分光計測システムを構築できた。これを有機結晶系の摩擦発光現象に適用し、半定量的な発光計測やそのダイナミクス計測に成功した。本研究は新聞報道されるに至り、思いがけず反響を得た。また、研究の副産物として、蛍光型の結晶化発光現象も見出すことができた。

このレーザー衝撃波法は、圧力ジャンプ法的一种と見なすことができる。一方、既述の(2)で述べた感熱応答型高分子において、相分離のダイナミクスは殆ど不明であった。そこで、レーザー光増感温度ジャンプ法を提案し、この手法により PVME や PNIPAM の感熱応答相分離のダイナミクスを計測し、その時定数を決定することが出来た。

今後、レーザー衝撃波は細胞に対する遺伝子注入に応用し(既に着手)、レーザー温度ジャンプ法はよりその適用範囲を広げていきたいと考える。

<終わりに> 以上、本研究推進課題においては、(1) 酵素蛋白質に対してはパルスレーザーを用いた分析チップの作製、(2) 蛋白質モデル化合物に対しては CW レーザーを用いた構造変化誘起と分析、そして (3) レーザー温度/圧力ジャンプ法による関連化合物の動的挙動計測、以上三つの課題を推進した。これらの内、(1)、(2)は本課題申請時にその構想を詳述したものであり、本課題は開始時のスタンスがブレることなく推進したと云える。(3)に関しては、(1)、(2)を推進しながら着想に至った課題であるが、副次的に推進したにも関わらず、予想以上の成果を挙げる事ができた。

以上、本課題は蛋白質系物質に対するレーザー化学の新たな展開を切り拓くに十分な成果を挙げたと総括する。

3. 研究構想

本「発展・継続研究」を生む形となった「さきがけ研究21」において、推進者は蛋白質系分子に対するプロセッシング・ツールとしてのレーザーの可能性を強く感じると同時に、これら物質系のレーザー化学/光化学自身に大きな関心を持った。蛋白質や関連モデル高分子化合物は環境や刺激に応じて姿形を変える点が面白い。「レーザーという“武器”で、これら物質群の科学にどのような貢献ができるか?」、「レーザーを用いて初めてできることは何か?」これを強く意識して目指した研究目標が以下の二点である。

(I) 生体機能分子で修飾したマイクロ分析チップの構築

(II) レーザートラップ・共焦点型ラマン顕微鏡の構築と蛋白質モデル化合物への応用

(I)は「物質移動」、(II)は「放射圧」というレーザー誘起過程の特徴を、それぞれ駆使したものである。

(I)は応用的側面が強い研究であり、バイオマテリアルを微細に基板上にパターンニングした分析診断チップ/アレイの開発を指向した。実用を意識した要素技術の開発とノウハウの蓄積に注力した。ATP検出酵素を固定した発光分析型マイクロチップをレーザー転写法で試作することが出来た。今後は受光素子のチップへの埋め込みや、DNAアレイの作製など、より汎用性を広げ実用化を目指したい。

(II)は基礎的側面が強い研究である。光学系/光学素子を工夫し、高い測定精度を備えた顕微分光システムを構築することが出来た。蛋白質やモデル高分子に特徴的な構造を放射圧により創りだすことを狙っていた。蛋白質モデル化合物の一つである感熱応答性高分子をターゲットにしそのラマンスペクトルを広い波数範囲で初めて測定し、純粋な放射圧により相転移/相分離を生起できることを実証できた。今後はより“美しい”秩序構造の形成とその形成機構の解明に取り組んでいきたい。

上記の研究を推進しながら、次々と研究のアイデアが浮かんできた。アイデアというものは、所詮アイデアであり、具現化してこそ価値がある。しかし凡人の浅知恵で中々具現化できない。悲しいことである。しかし、期待通りに行かない“はかなさ”には阪神ファンは皆慣れており、しぶとく粘った結果、

(III) 蛋白質系分子の構造変化計測を指向した圧力/温度ジャンプ計測システムの構築に関し、若干の成果をあげることが出来た。レーザー衝撃波分光計測システムを構築し、蛋白質系分子には到達できなかつたものの、天然糖類化合物のメカノルミネッセンスに関し、新たな知見を得ることができた。また、レーザー温度ジャンプ法により、感熱応答性高分子の相分離ダイナミクスを計測することも出来た。今後はこれらをより“fine”な方向で昇華させると同時に、レーザー衝撃波のバイオ応用などの研究にも着手し、新たな局面を拓いていきたい。

以上、上記(I)~(III)の研究構想の背景から進め方、新たな目標までを簡単

に述べた。蛋白質系のレーザー化学として関連科学に貢献できることを切に祈っている。

4 . 研究成果

(1) 研究内容及び成果

(I) 生体機能分子で修飾したマイクロ分析チップの構築

成果その 1 : レーザー転写法により ATP 検出型マイクロチップの作製に成功した。

<はじめに> マッチ箱程度のサイズのガラスやシリコンなどからなる固体基板に、各種バイオマテリアルを“組み込んだ”DNAチップやプロテインチップは、遺伝子の高速スクリーニングや疾患の迅速診断を可能にすることから、その重要性は疑いのないものになっている。これらのチップの作製においては、いずれもDNAや抗体などのバイオマテリアルを固体基板上に“固定”と“微細パターンニング”することが必須であるが、汎用性の高い方法が確立されたわけではない。近年、このような微細な固定を目的に、レーザーを用いた固定方法が盛んに研究されている。それらは大別すると“レーザー堆積(PLD)法”と“レーザー転写(LIFT)法”の二つに大別される。PLD法は、推進者が“さきがけ21”においてその詳細を検討した(例えば、Y. Tsuboi et al., *J. Appl. Phys.* 2001, 89, 7917., Y. Tsuboi et al., *J. Photochem. Photobiol. A* 2001, 145, 209.など)。本「発展・継続」研究においては、LIFT法の可能性を探った。

LIFT法とは、図1に示すように、ターゲット物質をコートした透明基板の裏面からパルスレーザー光を照射し、ターゲット/基板界面における温度・圧力上昇により「飛び出した」ターゲット物質を対置したチップ基板上に「転写」する方法である。従来の研究例では、ターゲットを低温マトリックス中に埋め込んだり、ターゲット物質/透明基板の界面にレーザー光吸収層(金属薄膜層)を設けたり、あるいはチップ基板を有機物で予めコートするなどの工夫が必要であった。これらの工夫は、「バイオマテリアル(ターゲット)の生理活性を失わず」、かつ「チップ基板上にしっかりとそのバイオマテリアルを固定」する二つの大きな目的のためになされたものである(例えば、「マイクロチップとバイオマテリアル」、坪井泰之(分担執筆)レーザーマイクロ・ナノプロセッシング、杉岡幸次・矢部 明 編、シーエムシー出版、東京、pp. 312-324 (2004).)。

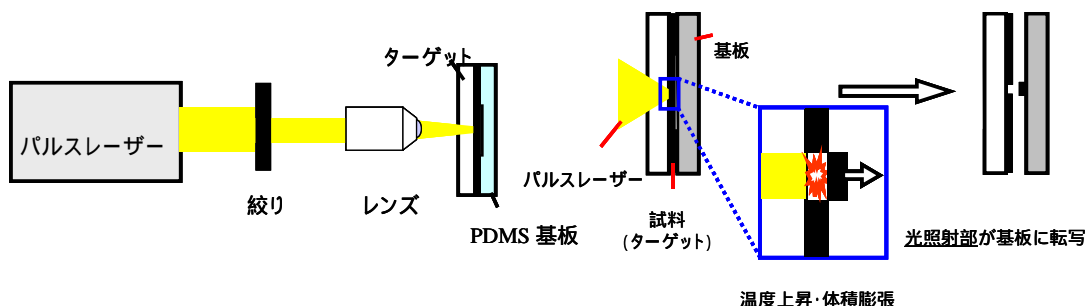


図1. LIFT法の概略図

LIFT法をより一般的にチップの作製に用いるためには、より簡単な方法が必要である

う。推進者は、チップ基板の材料として近年注目を集めつつあるポリジメチルシロキサン（PDMS）が LIFT 法に極めて好適ではないかと目を向けた。PDMS は、加工成型性が高く、かつ安価であるといった利点を備えている。加えて、ガラスやシリコンに比べると PDMS は極端に柔軟である。つまり、レーザー照射により超音速で飛び出したバイオマテリアルが PDMS 基板に一部侵入する形で基板に「植え付けられ」固定されることが期待できる。

本研究で PDMS 基板に LIFT 固定を狙ったのは、ルシフェラーゼ酵素である。ルシフェラーゼは、ルシフェリンとアデノシン三リン酸（ATP）を基質として発光することが知られている。従って、ルシフェラーゼを固定したチップは発光検出型の ATP 分析チップである。ATP は生物のエネルギー貯蔵変換物質であり、生物が代謝活動を行えば、そこには必ず ATP が存在する。つまり ATP 検出チップは、食品や水における微生物の混入検査に利用できる。

<実験> 前置きが長くなったが、実験の概略を述べる。実験に用いたルシフェラーゼはゲンジボタルからルシフェラーゼ DNA を採取し、大腸菌に導入することにより工業的に生産されたものであり、ルシフェラーゼ、ルシフェリン+ATP 反応キットとして市販されている。ルシフェラーゼ水溶液を石英基板にキャストし乾燥後に得られたフィルム（膜厚 $50 \mu\text{m}$）をターゲットに用いた。PDMS は加熱加工成型し、基板表面に直径 4 mm、深さ 40 μm のウェルを作製し、このウェル上に LIFT 固定を行った。LIFT 光源としてナノ秒パルス発振の YAG レーザー（波長 355, 266 nm）を用い、LT はシングルショットで行った。ターゲット裏面（石英側）からレーザーパルスを照射し、ターゲットに密着させた PDMS 基板にルシフェラーゼを転写した。つまり、PDMS 基板のウェルの深さが 40 μm であり、この距離がルシフェラーゼ-PDMS 基板間距離にそのまま対応している。転写固定したルシフェラーゼのスポットの微細化に、この距離は重要なパラメータとなる（後述）。このように転写固定した試料に対し、光学顕微鏡観察や顕微ラマン分光法により、転写の空間分解能や転写後の化学構造について評価を行った。さらに、ルシフェリン/ATP 含む水溶液をウェルに滴下し、化学発光の有無、スペクトル測定により、転写後のルシフェラーゼの生理活性を評価した。

<研究成果>

転写スポットの微細化とPDMS基板の優位性の実証： 266、355 nm の両レーザー波長で転写が確認されたが、転写に必要なレーザーフルエンスは異なり、266 nm で 0.4 J/cm^2 、355 nm で 1.5 J/cm^2 であった。この値は各波長におけるルシフェリンの吸収係数の差で説明される（後述）。355 nm レーザーパルス照射後のターゲット基板並びに転写されたスポットの光学顕微鏡画像を **図 2** に示した。

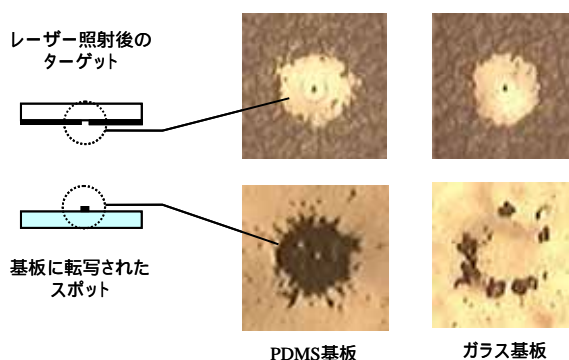


図.2 レーザー照射後のターゲット（上段）と、転写後のルシフェラーゼスポット（下段）の

光学顕微鏡画像.

図のスケールは、各写真が $400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$ であり、固定用基板として PDMS とガラスを用いた結果を両方示してある。照射後のターゲット基板（図中上段）では、レーザーのビームパターンに応じた形状/サイズでルシフェラーゼがそのまま除去されているのがわかる。しかし、転写用の基板にガラスを用いた場合（図中右側）では、転写されたルシフェラーゼのスポット形状は大きく乱されており、良好な転写が行われたとは言い難い。一方、PDMS 基板への転写（図中左側）では、レーザースポット形状どおりの転写が行われていることが一目瞭然でわかり、PDMS 基板への転写の優位性が示された。通常の光学レンズでもこのスポットは直径 $200 \mu\text{m}$ まで小さくでき、対物レンズを用いれば $100 \mu\text{m}$ 以下の微細化も出来る。また、PDMS 基板のウェルの深さ（すなわち、ルシフェラーゼ層と PDMS 基板間の距離）を図 2 の $40 \mu\text{m}$ から $50 \mu\text{m}$ 以上にすると、転写スポットは図 2 よりも大きくぼけたものになった。レーザー照射により、ルシフェラーゼはある程度の立体角を持って飛び出し、PDMS 基板に転写されるのであろう。

以上、チップ基板材質に PDMS を用い、レーザー強度、集光光学系、そして PDMS 基板ウェルの深さを最適化することにより、PDMS 基板上にルシフェラーゼの微細なスポットを転写できることが示された。

ATP検出チップの動作確認（転写ルシフェラーゼの生理活性）： 上記のように転写/作製したチップも、実際にATP検出チップとして動作しなければ意味をなさない。そのために最も重要な点は、LIFT転写におけるルシフェラーゼの生理活性の保持である。まず、転写したルシフェラーゼスポットのラマンスペクトルを測定したところ、 355 nm 転写においてはスポットのラマンスペクトルはルシフェラーゼのおおよそ一致したが、 266 nm 転写の場合は両者のラマンスペクトルの不一致が観測された。つまり、光子エネルギーの大きい 266 nm レーザー光による転写では、ルシフェラーゼの化学分解が示唆される。

次に、作製したチップの動作確認を行った。ルシフェラーゼスポットを転写したチップ上のウェルに、ATP+ルシフェリン水溶液を微量滴下し、化学発光の有無によりその生理活性の評価を行った。図. 3 にその発光画像を示す。

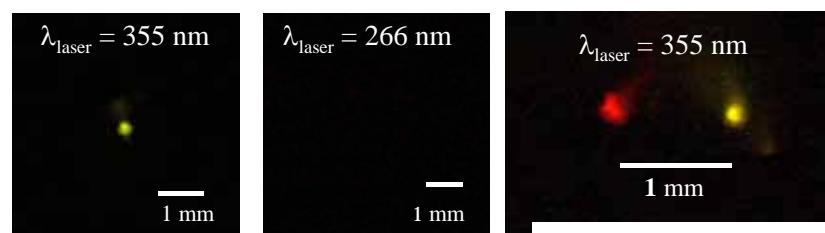


図 3 試作した ATP 検出チップの動作（生理活性試験）

図のように、 355 nm LIFT により作製したチップでは明確な化学発光のスポットが確認された。発光スポットサイズはおおよそ $100 \mu\text{m}$ であり、水溶液を滴下しても微細な発光スポットがぼやけないことは、PDMS 基板に強固にルシフェラーゼが固定されていることを示している。また、このような発光は数分間以上持続しており、 355 nm LIFT

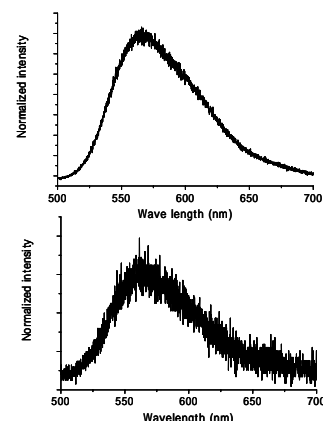


図 4 オリジナルの発光スペクトル(上段)と、チップ上の発光スペクトル(下段)

過程において、ルシフェラーゼの生理活性が十分に保持されていることを示す。このチップ上の発光スペクトルを測定したところ、図4のようにオリジナルの発光スペクトルと極めてよく一致した。つまり、ルシフェリン/ルシフェラーゼ/ATPの酵素反応がチップ上においてもよく再現されていることを確認できた。さらに発光色が異なるルシフェラーゼの転写も、サブミリメートル間隔で転写スポットを整列させ、その発光色の違いも明確に識別できている。一方、ラマンスペクトルで光分解が示唆された266 nm転写スポットでは、このような化学発光は観測されず、転写過程において生理活性が損なわれたことがわかった。このように、レーザー波長を355 nmにしたLIFT転写により、ATP検出チップを試作することに成功した。

LIFTの機構の提案：本研究でターゲットに用いたルシフェラーゼの吸収スペクトル(電子スペクトル)を測定したところ、266 nm、355 nm両波長で吸収を有することがわかった。266 nmにおける吸収はトリプトファン残基のインドール環の電子遷移に基づくものであり、355 nmの吸収は多数のアミノ酸残基の吸収tailもしくは不純物によるものと考えられる。両レーザー波長において、転写すなわちターゲットからのルシフェラーゼの飛び出しは光熱的機構により進行すると考えられる。その詳細は明らかではないが、光子エネルギーの高い266 nmでは1光子/多光子光分解により生理活性が損なわれるのに対し、355 nmでは不純物増感作用によりこのような光分解の寄与が相対的に抑制され、主に光熱作用によりルシフェラーゼの飛び出しが起こるため、生理活性を保持した転写が可能になったと思われる。

<まとめと展望> 以上、PDMS基板を用いれば、単純なLIFT法により、複雑な化学構造を有する酵素(ルシフェラーゼ)をその生理活性を保持しつつ転写/固定できることが明確に示された。その際、特にレーザー波長とウェルの深さがスポットの微細固定化と高輝度化に重要なパラメータであることを明らかにした。PDMS基板は各種分析診断チップの基板材料として大きく期待されていることから、LIFT法によるバイオマテリアルとの良好な“相性”が示された意義は大きいと考える。

今後は、DNAやイムノアッセイ用抗原などのLIFT転写を試み、その良好な相性をより一般的に確立していきたい。同時に、これら様々なバイオマテリアルをレーザー固定したPDMSチップを実用化段階まで引き上げることも、もちろん大変魅力的なテーマであると考えている。

(II) レーザートラップ・共焦点型ラマン顕微鏡の構築と蛋白質モデル化合物への応用

成果その1： 高い放射圧を印加できるレーザー・共焦点型ラマン顕微鏡を開発した。

成果その2： 代表的な感熱応答型高分子系に対し、広波数範囲のラマンスペクトルの計測に初めて成功した。

成果その3： 上記高分子系において、感熱応答型相転移/相分離を光(放射圧)によっても誘起できることを初めて示した。

<はじめに> 蛋白質、あるいはそれらの関連化合物やモデル化合物は溶液中(生体中)で特殊な立体構造をとり、それによって機能を発現しており、その構造や構造形成過程/機構は科学一般における重要課題の一つと云ってよい。このような特殊な立体構造をレーザー光という物理摂動によって作り出すことはできないであろうか? 例えば、推進者は“さきがけ21”において、蛋白質(フィブリン)の二次元超薄膜にパルスレーザー光を

照射すれば、ランダムコイル型二次構造の中に逆平行シート構造が形成されることを見出したが、他の系においてもレーザーによって高次構造を変化させたり、その過程をモニターすることはできないのであろうか？ このような疑問がそもそものモチベーションである。

蛋白質などの高分子の溶液に対物レンズを通じてCWレーザー光を集光すれば、分子鎖に電磁気学的な圧力 (=放射圧 あるいは dipole gradient force) が働き、集光位置に高分子が凝集する。この現象を用いれば、高分子を高い濃度で存在させる、濃度非平衡状態 (=ミクロ微粒子) を、非接触で任意の位置に出現できることになる。さらに、出現したミクロ微粒子は放射圧によりただちに捕捉され、光軸に従って自在に操ることが出来る。このような技術は他に見当たらない。放射圧で集められた蛋白質、高分子の集合構造は極めて興味深い。また、局所的高濃度下では、自発的な結晶や高次構造の形成も、もちろん大きく期待されるであろう。このような集合体に対し、蛍光分光法による凝集状態の解析例は Hofkens & Masuhara らの先駆的な報告があるが、振動分光法はより構造に鋭敏であると期待した。

そこで、上記のような放射圧下での蛋白質/高分子の構造を高精度で解析できる「レーザー捕捉機能を有した顕微ラマン分光システム」の開発を行い、放射圧で誘起される構造変化の検証を行った。

<装置構成と対象試料> 構築した「レーザー捕捉型顕微ラマン分光計測システム」の概要を、図5に示したブロックダイヤグラムを参照しながら説明する。放射圧を発生させる光源としてCW発振型Nd:YAGレーザー ($\lambda = 1064 \text{ nm}$)、ラマン励起用の光源としてCW発振型のアルゴンイオンレーザー ($\lambda = 488 \text{ nm}$)を用いた。これらの二本のレーザービームは同軸で倒立型光学顕微鏡に導入され、特注ダイクロイックミラーで反射された後に対物レンズ ($\times 100$ 、 $\text{NA} = 1.3$) で試料溶液中の同じ位置に焦点を結ぶ。このダイクロイックミラーの反射率は 1064 nm で 100% 、可視域で 50% となっており、焦点位置に高い放射圧を印加することができる。放射圧が強く働いた領域からのラマン散乱光は、ピンホール ($d = 100 \mu\text{m}$)、二枚のホログラフィックノッチフィルターを通過した後に、分光器/冷却型CCDカメラによって分光検出される。ピンホールにより本光学配置は共焦点型になっており、集光焦点位置のみの分光情報を拾うことができる。本装置の空間分解能は深さ方向 $2.4 \mu\text{m}$ /水平方向 $0.3 \mu\text{m}$ 、分光波数分解能は 2.0 cm^{-1} である。

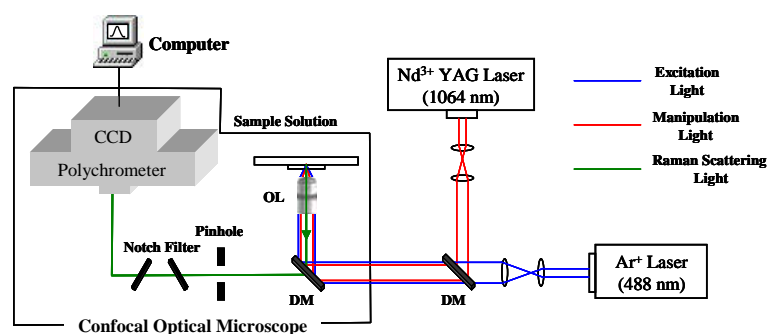


図5 構築したレーザー捕捉/共焦点型顕微ラマン分光計測システム

一方、このような方法論の対象として取り挙げたのは、代表的な感熱応答型ポリマーであるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) (PIPA) やポロビニルメチルエーテル (PVME) である。PIPAやPVMEは水溶液中で室温から10 K程度の温度上昇でコイル-グロビュール型の相転移を起こし、巨視的な相分離に至ることはよく知られており、蛋白質のモデル化合物とみなすことが出来る。このような水溶液に1064 nm レーザー光を集光すると、水が1064 nm に弱い倍音吸収を有するために光熱効果で温度上昇が誘起され、集光位置に微粒子が形成される。一方、重水溶液中ではそのような光熱効果を無視できるが、純粋な放射圧の凝集効果により、微粒子が形成される。すなわち、PIPAやPVMEは放射圧で形成される高分子高次構造を解析するのに最適なモデル化合物である。振動分光法によるPIPA (PVME) のコイル-グロビュール相転移の研究は1990年代より活発に研究されているが、PIPA自身のラマン散乱強度が著しく弱いため、十分な議論が進められていないのが現状である。推進者は、このPIPAやPVMEを対象に、以下のような成果をあげた(例えば、Y. Tsuboi et al., *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 7033.)。

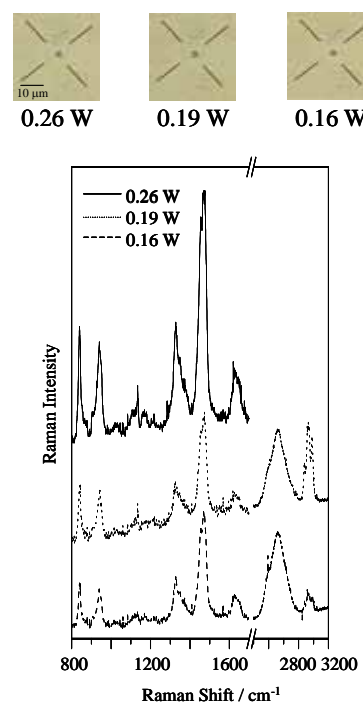


図6 重水溶液中で放射圧により形成したPIPAの微粒子とそのラマンスペクトル。

< 研究成果 >

溶液中におけるPIPAのラマンスペクトルの測定： 共焦点型顕微光学配置を採用することにより、ラマン散乱測定におけるバックグラウンド光を大幅に低減し、各種光学系を工夫した。その結果、水溶液/重水中におけるPIPA自身の骨格振動に由来するラマンスペクトル (500 ~ 3500 cm^{-1}) を広い波数範囲に渡って取得することに初めて成功した。低波数範囲のラマンスペクトルは高次構造に依存しがたいこと、アミド振動散乱帯は高次構造に若干依存すること、アミドの水素原子が重水素原子に置換されると広い波数範囲に渡ってラマンスペクトル形状は影響をうけることなど、重要な知見を得ることができた。尚、PVMEに対しても同様のラマンスペクトルの計測に成功している。

放射圧による相分離の実証： 上述の通り、PIPAやPVMEの重水溶液中にCWレーザービームを集光すれば、焦点位置に働く純粋な放射圧の効果で分子集合体 (微粒子) が形成される。その様子と集合体のラマンスペクトルを図6に示す。やはり、広い波数範囲においてS/N比よくラマンスペクトルが計測されていることがわかる。PIPAやPVMEは、ランダムコイル型の高次構造を取って水溶液中に均一に溶解している。そこに強い放射圧が働くと右図のように微粒子が形成されるわけであるが、問題は微粒子におけるPVMEの高次構造である。ランダムコイル型は水和している構造を有し、グロビュール型への構造転移は高分子鎖の脱水和により誘起されると考えられており、この水和/脱水和構造も鋭敏にラマンスペクトルに反映される。このような観点から図6のラマンスペクトルを詳細に検討したところ、微粒子におけるPIPAの高次構造はグロビュール型であることがわかった。

すなわち、集光レーザービームが創り出す放射圧という摂動によって、蛋白質モデル

化合物である PIPA や PVME のコイル グロビュール型の相転移 / 相分離を誘起できることを実証した。それらの様子は図 7 のように描けるであろう。

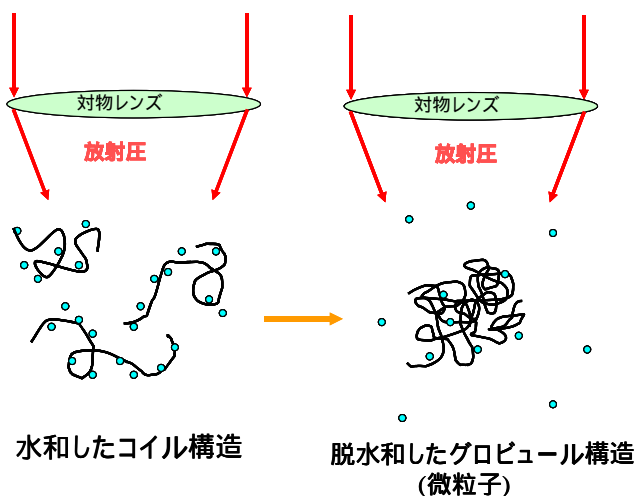


図7 レーザー放射圧による高次構造変化（相転移/相分離）の機構

<まとめと展望> 集光レーザービームが創り出す放射圧によって、均一な高分子溶液中の任意の位置に濃度非平衡な凝集状態を作り出すことができる。今回構築した計測システムは、このような集合体のラマンスペクトルを精度よく計測することが出来る。蛋白質モデル化合物である PIPA や PVME を対象に、放射圧によって高次構造変化-相転移/相分離を引き起こすことを実証できた。

本手法は、大きな可能性を秘めていると考える。高分子や蛋白質における秩序構造の形成機構の解明は魅力的なテーマであるが、実験的なアプローチは容易ではない。ここでアピールした“放射圧による集合体形成”が一つの解決の糸口になるのではないかと考えている。コイル グロビュール型の転移だけでなく、例えば集合体におけるシート構造形成とそのラマンモニタリングなどを行うことにより、秩序構造の形成の機構解明に迫れば、と考えている。

(III) 蛋白質系分子の構造変化計測を指向した圧力/温度ジャンプ計測システムの構築

成果 : レーザー衝撃波分光計測システムを開発し、摩擦発光計測に応用した。

成果 : レーザー温度ジャンプ法により、感熱応答型高分子系の相分離ダイナミクスを明らかにした。

<はじめに> 既述のように、蛋白質やそれらの関連化合物/モデル化合物は、周囲の環境-温度、圧力、pH など-に応じて最適な立体構造を取る（フォールディング）。このような最適構造を取る過程のダイナミクスは極めて興味深く、レーザーはこのような問題に関しても有効な実験的アプローチを与える。例えば、レーザー照射により発生する衝撃波により系の圧力を急激に上昇させれば（圧力ジャンプ）、蛋白質の立体構造を一旦歪ませることになる。この“歪んだ”不安定な構造から安定な構造に戻る（緩和）過程を計測すればフォールディングダイナミクスの知見を得ることができる。また、レーザー照射による光熱効果を用いれば、系の温度を急激に上昇できるので（温度ジャンプ）、それにより誘起される構造変化を計測しても、同様

の知見を得られることになる。特に、後者の「レーザー温度ジャンプ法」は幾つかの優れた研究例が報告されている。一方、前者のレーザー衝撃波「圧力ジャンプ」を用いた当該研究例や物理化学的研究例は殆ど無い。これらを踏まえ、ナノ秒パルスレーザーを用いたレーザー圧力/温度ジャンプ分光計測システムを構築し、幾つかの重要な知見を得た(例えば、Y. Tsuboi et al., *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 7547.)。なお、レーザー圧力ジャンプ(衝撃波)計測法に関しては、新聞報道により反響を得たことを付記しておく(日本工業新聞 2003年2月20日付)。

<装置構成> レーザー衝撃波分光計測システムの装置概要を図8に示す。試料セル裏面には衝撃波発生層がコートされており、ナノ秒パルスレーザーを集光照射すれば圧力数10 Mpa程度の衝撃波を試料に印加できる。Nd³⁺:YAGレーザー(fwhm ~10 ns)の基本波パルス(1064 nm)を衝撃波発生層に集光した。衝撃波発生層は、レーザー光をよく吸収し、光熱作用によりアブレーションが誘起される。そして、同時に発生する衝撃波が効率よく試料に伝播するように、試料セルはデザインされている。この際、試料に直接レーザー光が照射しないように十分に注意を払い、実験はシングルショットで行っている。衝撃波強度はPZT素子と自作のアンプを用い、デジタルオシロスコープにより測定できる。衝撃波により試料が光る(発光)場合、その時間挙動は光電子増倍管を用いて計測できるし、時間ゲート付MCPD測光器を組み合わせれば時間分解スペクトルも得ることができる。測定した試料自身に巨視的な形態変化がある場合はキセノンフラッシュランプを光源とし、CCDカメラにより高速イメージング追跡できる。このフラッシュランプをモニター光源とすれば、衝撃波で誘起される変化の時間分解吸収スペクトルも得ることが出来る。レーザーとこれらの周辺機器/計測機器は、遅延信号発生器によって同期されており、これらダイナミック計測が可能となった。なお、レーザー温度ジャンプ計測装置の概要も、上記のセル廻りの変更とプローブ光用レーザービームの導入以外は大きくは変わらない。

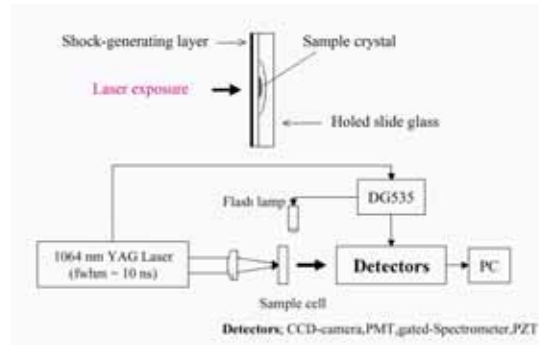


図8 レーザー衝撃波分光計測システム

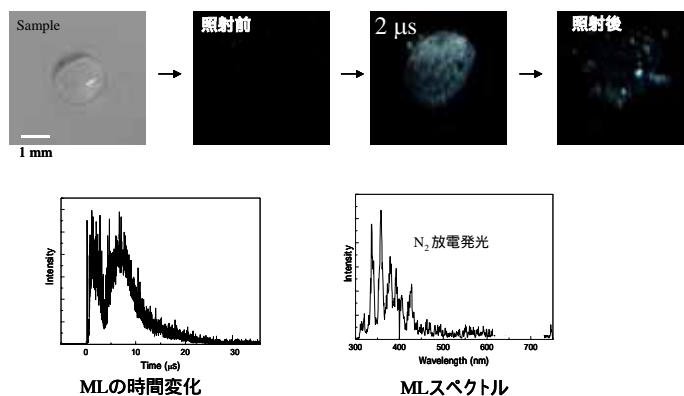


図9 糖類のメカノルミネッセンスのダイナミクス計測

<研究成果>

メカノルミネッセンスのダイナミクス計測：

レーザー圧力ジャンプ(衝撃波)分光計測法は、残念ながら未だ蛋白質系分子に適用するに至っていない。現段階では、有機固体系のメカノルミネッセンスに適用を行っている段階である。固体に機械的応力を印加し、破砕や剥離を行う際に可視発光が観測される場合があり、このような発光を Triboluminescence(TL)、もしくは MechanoLuminescence(ML)と呼ぶ(摩擦発光)。歴史の古い研究分野であるにも関わらず、MLの機構に関する我々の本質的理解は未だ浅い。そ

これは、従来の ML 研究における方法論に大きな問題が有り、ML の定量的な発生・観測手段が充分に開発されていなかったからである。レーザー衝撃波法はこの点を解決し、半定量的かつダイナミクス計測が可能な計測方法を提供している。

対象とした試料は古くから ML の研究が行われてきた糖類である。図9にスクロースを対象とした場合の研究結果の一例を示した。本手法により、試料破碎のダイナミクスや ML の時間変化とそのスペクトルを高精度に追跡でき、メカノルミネッセンスに関する重要な知見を得ることができた。例えば、これまで糖類のアモルファス固体や特定の糖類は ML を示さないとされてきたが、本手法によりそれらは微弱でも明確に ML を示すことが明らかとなった。他にも、有機電子系化合物において結晶化相転移型の ML を見出すなど (Y. Tsuboi et al., *J. Phys. Chem. B* 2004, 108, 2822.) 成果を挙げた。

感熱応答型高分子の相分離ダイナミクス計測： (II) で述べたPIPAやPVME水溶液における感熱応答性コイル-グロビュール型の相分離は古くから多くの研究例があるものの、そのダイナミクスに関しては殆ど分かっていない。そこで、申請者は、上述のレーザー温度ジャンプ法を本手法に適用した。光学系やレーザー波長、試料系の最適化の詳細を検討した結果、これらの系に対し、相分離のダイナミクスを計測し、時定数を高精度に決定することに初めて成功した (図 10)。本手法は感熱応答性高分子一般に適用できるものであり、今後多くの関連系に対し時定数を決定できる意義は大きい。

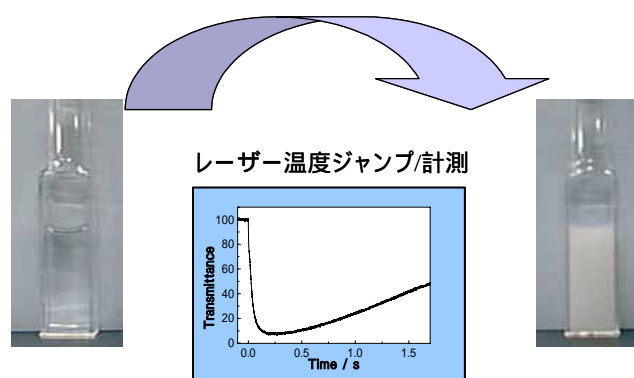


図10 感熱応答性高分子のレーザー温度ジャンプ/ダイナミクス計測

(2) 研究成果の今後期待される効果

(1) 「生体機能分子で修飾したマイクロ分析チップの構築」に関しては、特に国外で活発に研究が進められている。その対象の殆どは DNA であり、要はレーザーの高速操作性を利用して、診断用 DNA アレイを構築することを目指している。このようなアレイ/チップを作製する工程は、まさに要素技術の集合体と云ってよい。本課題で達成した PDMS 基板と LIFT 法のカップリングは汎用性が高く、様々なバイオマテリアル固定型のアレイ/チップ作製に威力を発揮すると考えられる。具体的に述べる。PDMS 基板/LIFT 法では、まずバイオマテリアル試料の溶媒を必要としないので完全ドライプロセスで固定を行うことができる。そして、レーザーの高繰り返し性と合わさって、工程の短縮の効果が見込まれる。また、レーザーの集光性を活かし、スポットの超微細化 ($1\ \mu\text{m}$ 以下) の効果が見込まれる。

(II)「レーザートラップ・共焦点型ラマン顕微鏡の構築と蛋白質モデル化合物への応用」は、どちらかと言えば基礎的な研究である。レーザー捕捉型分光顕微鏡は、国内外で数件存在するが、現在のトレンドは細胞/オルガネラあるいは関連バイオ系の計測である。推進者の研究は、「放射圧を利用して、任意の位置/タイミングで分子集合体を創りだす」点で、関連研究とは決定的に差別化される。この現象を駆使すれば、蛋白質や高分子系特有の秩序構造の出現と形成機構といった極めて重要な問題に迫ることができると考えている。

(III)「蛋白質系分子の構造変化のダイナミクスを追跡する圧力/温度ジャンプ計測システムの構築」では、特にレーザー圧力ジャンプ(衝撃波)に関しては国内外でも応用例は極めて乏しく、新しいレーザー応用の可能性を秘めていると考えられる。その詳細を記すことは差し控えたいが、例えばレーザー衝撃波を用いた全く新しい応用として、生細胞への遺伝子導入などが考えられる。既に推進者らも着手しており、良好な結果が得られつつある。フォールディングのダイナミクス計測といった基礎科学から、遺伝子導入といった応用問題にまで、その展開は今後大いに楽しみであろう。

5 . 研究実施体制

(1) 体制

研究代表者： 坪井泰之

所属： 北海道大学大学院 理学研究科 化学専攻

(2)メンバー表 他にメンバーはいない。

6 . 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
05年3月3日 4日	「次世代レーザープロセッシング産業応用調査専門委員会」 ならびに量子デバイス研究会	北大	20名	当該分野の講演を行い、 討論を行う。

(2)招聘した研究者等

氏 名（所属、役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間

7 . 主な研究成果物、発表等

(1) 論文発表 (**原著論文** 2002 ~ 2005) (国内 0 件、海外 13 件)

1. “Pulsed Laser Deposition of Poly(tetrafluoroethylene), Poly(methylmethacrylate), and Polycarbonate Utilizing Anthracene-Photosensitized Ablation”
Yasuyuki Tsuboi, Hisanori Adachi, Etsuo Yamamoto, and Akira Itaya
Jpn. J. Appl. Phys., 41 (2002) 885-890.
2. “Picosecond Dynamics of Excited 9, 9'-Bianthryl Adsorbed Porous Glass: Role of the Symmetry Breaking in the Ground State”
Yasuyuki Tsuboi, Tamami Kumagai, Masato Shimizu, Akira Itaya, Gerd Schweitzer, Frans C. De Schryver, Tsuyoshi Asahi, Hiroshi Masuhara, and Hiroshi Miyasaka
J. Phys. Chem. A, 106 (2002) 2067-2073 .
3. “Nanosecond and Femtosecond Laser Photochemistry and Ablation Dynamics of Neat Liquid Benzenes”
Koji Hatanaka, **Yasuyuki Tsuboi**, Hiroshi Fukumura, and Hiroshi Masuhara
J. Phys. Chem. B, 106 (2002) 3049-3060.
4. “Laser Ablation of Silk Protein (Fibroin) Films”
Yasuyuki Tsuboi, Hisanori Adachi, Kazushi Yamada, Hiroshi Miyaaka, and Akira Itaya
Jpn. J. Appl. Phys., 41 (2002) 4772-4779.
5. “Nonlinear Photochemistry and Ablation of Liquid Naphthalene Derivatives”
Yasuyuki Tsuboi, Kentaro Irie, Hiroshi Miyasaka, and Akira Itaya
J. Phys. Chem. A, 107 (2003) 3017-3023.
6. “AFM Observation of Silk Fibroin on Mica Substrates: Morphologies Reflecting the Secondary Structure”
Kazushi Yamada, **Yasuyuki Tsuboi**, and Akira Itaya
Thin Solid Films, 440 (2003) 208-216.
7. “Laser-Driven Shock Wave-Induced Triboluminescence of an Organic Crystal: Toward a Semiquantitative Study”
Yasuyuki Tsuboi, Toshiaki Seto, and Noboru Kitamura
J. Phys. Chem. B, 107 (2003) 7547-7550.
8. “Pulsed Laser Deposition of Polytetrafluoroethylene Using Fundamental Pulses of a Nd³⁺:YAG Laser”
Yasuyuki Tsuboi, Tomohiro Kuro-Oka, Kentaro Irie, and Akira Itaya
Appl. Phys. A, 78 (2004), 339-342.
9. “Fluorescent Crystalloluminescence of N-isopropylcarbazole”
Yasuyuki Tsuboi, Toshiaki Seto, and Noboru Kitamura
J. Phys. Chem. B, 108 (2004) 2822-2826.
10. “Investigation of Formation Process of Metal Colloids Generated by Laser Ablation in Water: Observation of Ejection of Matter with Microsecond-Time-Resolved-Imaging”
Takeshi Tsuji, **Yasuyuki Tsuboi**, Noboru Kitamura, and Masaharu Tsuji
Appl. Surf. Sci., 229 (2004) 365-371.
11. “Molecular Probe for a Fluorous Medium: Long-Lived Phosphorescence of α -Diketones in Perfluoromethylcyclohexane”
Yasuyuki Tsuboi, Kensaku Okada, Noboru Kitamura
Anal. Sci., 21 (2005) 303-308.

12. “Poly(N-Isopropylacrylamide) Microparticles Produced by Radiation Pressure of a Focused Laser Beam: A structural Analysis by Confocal Raman Microspectroscopy Combined with Laser-Trapping technique”
Yasuyuki Tsuboi, Masayuki Nishino, Tetsuya sasaki, Noboru Kitamura
J. Phys. Chem. B 109 (2005) 7033-7039.
13. ” Template-Guiding Synthesis and Individual-Level Characterization of Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Microgels” Hu Yan, Masayuki Nshino, Yasuyuki Tsuboi, Noboru Kitamura, Kaoru Tsujii, *Langmuir*, in press.

(2) 口頭発表 (招待講演/依頼講演のみ記す)

国際学会招待講演 (6件)

1. “Laser Ablation and PLD of a Functional Protein”
Y. Tsuboi
 SPIE International Symposia in LASE2003 (LAMON VIII in Photonic West)
 (Jan. 25-31, 2003, San Jose Convention Center, California).
2. “Laser Trapping – Raman Microspectroscopy of Polymer Particles”
Y. Tsuboi
 Singapore International Chemical Conference 3 (Dec. 15-17, 2003, Shangri-La Hotel, Singapore).
3. “Laser Chemistry of a Functional Protein”
Y. Tsuboi
 5th RIES-Hokudai International Symposium (Nov. 30-Dec. 2, 2003, Hokkaido Univ. Sapporo).
4. “Phase Transition of a Thermo-responsive Polymer by Radiation Pressure of a Focused Laser Beam”
Y. Tsuboi
 7th Japan-American Frontiers of Science (invited poster presentation),
 (2004. Dec. 10-12, Carifornia).
5. “Laser Chemistry of Biomaterials”
Y. Tsuboi
 International Symposium on Nanostructure Control at Solid Surfaces for the Construction of Nano-molecular / Bio Devices, (2005, 3.9-10, Sapporo).
6. “Laser Chemistry of Biomaterials”
Y. Tsuboi
 Pacific Rim Conference on Lasers and Electro-Optics 2005 (Jul. 12-15, 2005, Tokyo).

国内招待/依頼講演 (7件)

1. “シルクのレーザー化学とアブレーション”
坪井 泰之
 レーザー学会第22回年次大会、2002年1月24 - 25日、於 大阪国際交流センター。
2. “シルク蛋白質のレーザー化学”
坪井 泰之
 第19回電気化学ライラックセミナー、2002年6月22-23日、於 大滝セミナーハウス。
3. “TICT分子系の光ダイナミクスの新しい展開”
坪井 泰之
 第18回分析化学緑陰セミナー、2002年7月6-7日、於 小樽おこばち山荘。
4. “有機固体系のメカノルミネッセンスとクリスタロルミネッセンス”
坪井 泰之
 信州大学繊維学部特別講演会、2004年3月8日、於 信州大学繊維学部。

5. “放射圧で創る高分子ナノ微粒子の顕微ラマン分光”
坪井 泰之
電子研セミナー「光・ナノテク・材料」、2004年3月11日、於 北海道大学電子研.
6. PLD of Polytetrafluoroethylene (PTFE) at 355 and 1064 nm
坪井 泰之
第1回 PLD (レーザーアブレーション成膜) 研究会, 2004. 11. 26, 早稲田大学理工学部.
7. バイオマテリアルのレーザープロセッシング
坪井 泰之
第12回次世代レーザープロセッシングとその産業応用調査専門委員会, 2005. 3. 3, 北海道大学.

(3)特許出願 (国内 9件、海外 1件)

国内

レーザー加工方法および装置
坪井泰之 他 3 名. 特願 2004-108255

他8件

海外

レーザー加工方法および装置
坪井泰之 他3名 国際出願番号: PCT / JP2005 / 7403 (国際出願日: 2005年4月18日)

(4)新聞報道等

新聞報道

“北大が新手法; 破壊による発光を定量化”

日本工業新聞 2003年2月20日(木)付.

受賞 なし

(5)その他特記事項

現在、精密機械系ベンチャー企業1社に技術アドバイザーとして正式に参画し、事業展開に技術協力を行っている。また、これを通じ、バイオ系ベンチャーとも事業展開につき相互協力を行っている。

8 . 結び

「さきがけ研究21」の終了を半年後に控えた2001年4月、それまで5年間勤務した京都工繊大を離れ、北大理学研究科に異動した。装置の移設費や研究環境の整備、立ち上げ費用等に多額の拠出を迫られていた丁度その時、本「発展・継続」事業に採択されたことは本当に幸運であった。そして、現在まであつというまの3年間であった。

まず、研究の達成度の自己評価から記す。申請の段階で計画していた（つまり実際に申請書に記した）内容からブレることなく研究を推進した。その結果、当初設定していた目標は概ね達成できたと自己評価している。レーザー圧力ジャンプ/温度ジャンプなど、本推進課題から生まれたテーマも進行中である。これら成果をまとめた研究論文は既に数報を出版済みであるが、さらに鋭意執筆中である。また、得られた成果の意義は既に述べたとおりである。特に放射圧や衝撃波といった新たな物理的摂動を蛋白質物質系に導入した事は、基礎科学的に意義が大きいと考えている。

本推進課題は、坪井が代表者として推進し、研究組織は「代表者 坪井泰之、以上」というシンプルこの上ないものであった。JST様のご支援には海より深く感謝しているが、願わくばせめて1名の博士研究員を雇用したかったというのが本音である。もちろん、JSTのみならず、本研究を共に遂行した北大理学研究科の以下の院生・学生諸氏にも深謝する（以下、カッコ内は研究テーマ）。勢登俊明 君（衝撃波）、岡田健作 君（温度ジャンプ）、西野正行 君（放射圧）、古畑備介（チップ）の4名がこの3年間の本課題の推進を支えてくれた。

今後は、これまでの研究を忠実に発展させるのではなく、全く新しい視点を導入し、リニューアルした研究を展開していきたい。それは、例えばバイオ関係（例えばレーザー遺伝子導入）かもしれないし、ベンチャービジネスを指向したものかもしれないし、あるいは高感度高分解能スペクトロスコーピーかもしれない。まあ、正直なところ私にもわからないということだ。わからないなりに、いつもドキドキしながら研究していきたいと考えている。

最後になりましたが、国府田隆夫先生はじめ「さきがけ21」からお世話頂いたJST関係者の方々、そして本「発展・継続」研究でお世話になった関係者各位の御一人様御一人様に心より御礼申し上げます。皆様の暖かいご支援なしでは坪井の北大の4年間は成り立ちませんでした。本当にありがとうございました。

（以上）