

「構造機能と計測分析」研究領域 領域活動・評価報告書

—平成20年度終了研究課題—

研究総括 寺部 茂

(1) 研究領域の概要

本研究領域は、新現象の発見と解明のために欠くことのできない計測・分析技術に関して、個人の独創的な発想に基づくこれまでにない革新技术の芽の創出を目指す研究を対象とするものである。

具体的には、生体物質の構造や機能に関する分析技術や生命現象の計測技術、原子・分子レベルにおける物理・化学現象や物性および表面・界面の構造や機能に関する計測・分析技術、また環境や生態の計測・分析技術などに関して、新たな方法論の創出や、技術展開の契機となるような研究を対象とする。

また、計測・分析技術に関してブレークスルーをもたらすことが期待される試料前処理、試薬、ソフトウェア等の重要な関連技術をも対象とする。

(2) 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

(3) 選考方針

選考の基本的な考え方は下記の通り。

- 1) 選考は「構造機能と計測分析」領域に設けた領域アドバイザー13名の協力を得て研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考の基本的な考えは、研究課題が計測・分析の戦略目標に合致した方法論の開発であり、新規な計測・分析法の芽を創出するまたは既存の方法と比べて技術の飛躍的展開に発展する可能性があること、ならびに研究期間内に目標を実現する戦略があることである。また、研究計画の規模が個人研究の枠内であることと、将来の発展可能性という観点で現役の研究者であることも重視した。

(4) 選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補者を選定した。

選 考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	134 名	16 名	7 名

(5) 研究実施期間

平成17年10月～平成21年3月

(6) 領域の活動状況

領域会議:7回

研究報告会:1回

生命・計測分析合同研究会:3回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:24回

研究開始時に研究現場を訪問し、研究環境、設備等の研究費の確認及びヒアリング、組織責任者への協力依頼を行った。終了年度の訪問では、成果達成状況と残された課題の把握を行った。研究期間内で異動した研究者をその都度訪問し、研究環境を確認した上で、新組織責任者への協力依頼、研究継続に必要な支援の決定を行った。訪問については技術参事が同行した。購入設備の性能確認等に関して必要に応じて技術参事が研究者に協力し稼働をスムーズなものとした。

(7) 評価の手続き

研究者の課題別評価報告書を基に、領域アドバイザーの意見を参考にして研究総括が評価を行った。

また、研究終了時に科学技術振興機構が開催する一般公開である研究報告会の参加者の意見を参考とした。

(評価の流れ)

平成 20 年 6 月	第 8 回領域会議(総括・アドバイザーによる進捗評価とアドバイスの実施)
平成 20 年 12 月	研究報告会実施(総括・アドバイザーによる評価の実施)
平成 21 年 2 月	研究報告書および研究課題別評価書提出(研究者作成)
平成 21 年 3 月	研究総括による最終評価に基づき領域活動・評価報告
平成 21 年 3 月	研究期間終了
平成 21 年 4 月	研究報告書提出

(8) 評価項目

- (1) 研究計画書の目標に対する研究課題の達成度;
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献(計画外成果も含む);
- (3) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、など研究成果の発信状況;
- (4) 表彰・招待講演など外部からの評価状況。

(9) 研究結果

当領域では、物質現象から生命現象に至る幅広い研究課題が採択されている。測定対象は分子・原子であるが試料の形態は多様である。計測・分析法として物理的方法、化学的方法、生物学的方法が可能であり、異分野間の協力が必須である。当領域は広い専門分野の研究者やアドバイザーの交流により活発な研究課題の展開が見られた。将来先端的な計測・分析機器の開発に発展する可能性のある新原理、分析・計測に利用できる可能性のある新材料の探索、それらを新規分析・計測法へと発展させる方法論において新規な展開を示した。研究者別にそれらの研究目的と結果および評価を記述する。

○栗辻安浩 研究者

フェムト秒レーザーパルスとホログラフィーとを組み合わせたシステムにより、超高速度カメラの 1 万倍の速度を持つ光動画計測の実現に挑戦した。3 次元光拡散体の中を伝播する光パルスの波面全体から拡散光を発生させ、それを物体光とするホログラフィーシステムを開発し、光の伝播を 3 次元動画として記録し観察することに成功した。世界で初めてフェムト秒光パルスが伝播する様子を 3 次元動画として観察することに成功したことは高く評価できる。また、光ファイバーなどの実際の光学デバイスでの測定、幅広い波長に対応するホログラム乾板を用いたシステム開発など、実用性を高める多面的な努力を積み重ねている。この手法は、光の物理現象の計測ツールとして幅広い分野で新規な現象の発見や解析に貢献すると思われる。今後は、本技術の応用展開とともに、微小領域などを対象に更に研究を深化させることが期待される。

○今西未来 研究者

ジンクフィンガーの配列特異性と柔軟なモジュール構造を利用した時計タンパク質の新たな探索法に取り組んだ。飛躍的に配列選択性を高めた 6-ジンクフィンガータンパク質、DNA 中の不連続な塩基配列を検出可能とするジンクフィンガーモチーフ間リンカーなどの開発に成功し、時計遺伝子の発現リズムが増強される現象を確認にすることに成功している。DNA 結合選択性を高めるための一連の実験から、時計遺伝子がジンクフィンガーによって制御できることを証明し、生物の概日リズムの解明につながる時計タンパク質探索法の実現性を提示したことは高く評価できる。現段階では時計遺伝子の分子論的解明はまだ十分とはいえないが、時計タンパク質の探索だけでなく一般性の高い分析手法を開発する、という姿勢を意識しながら更に研究を進めていくことが期待される。

○河野行雄 研究者

近接場 THz 光顕微鏡と電子の流れをマッピングする走査型電位計を開発し、それらを更に複合化した電子輸送の新たな観察法の開発を目指した。カーボンナノチューブ量子ドットを活用して、高感度かつ測定周波数制御が可能な THz 光検出素子の開発に成功した。また、THz 光の電磁波電場分布の計算結果を基に、アパーチャ、近接場プローブ、GaAs/AlGaAs 半導体を一体化した実用的なオールインワンチップ検出器を開発し、回折限界を突破する $9\mu\text{m}$ の分解能を実現した。独創的な研究成果とともに実用性向上への努力、応用対象となる新素材への適用検討などの幅広い取り組みは高く評価できる。走査型電位計との複合化は未完成であるが、この成果を応用する方向性は見えてきた。今後は更に高感度化、高分解能化に挑戦し、幅広い応用分野で物性研究の新たなツールとして発展させることが期待される。

○小寺一平 研究者

DNA 解読反応を、多数分子の同時 1 分子蛍光観察により、飛躍的に高速なDNA解読の実現を狙う。解読反応の高効率性と正確性を両立する制限酵素と DNA リガーゼの組み合わせの導出に成功し、さらに酵素反応を最適化するマイクロ流路やガラス基板コーティング、プリズム型全反射照明装置などの技術開発に総合的に取り組み、DNA 解読の基本システムを完成させた。さらに高速な反応解読を狙う新規な蛍光脂質プローブの研究にも着手している。チャレンジ性が極めて高い研究構想であったが、当初の手法の問題点を明らかにしつつ最適な酵素反応系を探索し、マイクロチップの開発まで行うことによりこの方法の実用性を明確なものとした努力は賞賛に値する。本技術は医療や生命研究など様々な分野に大きな変革をもたらす可能性があり、今後の更なる研究の深化が期待される。また、取り組み過程で得たノウハウをサイエンスに仕上げる努力も望まれる。

○竹内昌治 研究者

細胞の内外の物質輸送に重要な役割を果たしている膜タンパク質の機能解析法の研究である。エレクトロフォーメーション法、接触法による脂質 2 重膜形成法、脂質 2 重膜を球状にするマイクロジェット法などのリポソーム形成の基本技術とともに、脂質膜チャンバ形成法、ダイナミックマイクロアレイ技術、イオンチャンネルの複数同時計測技術などのマイクロ流路技術を活用した実用技術開発にも成功した。また、脂質膜チャンバ形成法で作成した脂質膜を用いた膜透過実験により脂質 2 重膜の形成を実証している。独創的なリポソームアレイによる膜タンパク質の機能解析法を発想し、MEMSを巧みに利用して均一径リポソームの作成技術を完成した努力は高く評価される。次世代の治療、創薬法、あるいは生体イオンセンサー開発などへの波及効果はきわめて大きい、幅広く利用される基盤技術としての発展が期待される。

○一三恵美 研究者

抗体でありながら抗原を特異的に分解する「スーパー抗体酵素」(アンチゲナーゼ)の創製を目指す極めて独創性の高い研究である。インフルエンザウィルスのHA抗原のコンセンサス配列を基にいくつかの抗原モデルを見出し、A型インフルエンザウィルス全般に反応可能な抗体酵素の導出に成功した。また抗体酵素を大量に取得できるベクターを見出すとともに、これを用いた大量発現系により抗体酵素の効率的調製法を確立した。免疫工学、タンパク質工学などを駆使して、広範囲のインフルエンザウィルスに対応できる抗体酵素を作成したことは高く評価できる。近年大きな話題となっているエイズウィルス、ピロリ菌なども対象とする研究であり、実現した場合、科学技術のみならず産業へ与えるインパクトは大きいと考えられる。今後、酵素活性のメカニズムを明らかにする研究をさらに深化させ、この成果が「スーパー抗体酵素」に結実することが期待される。

○由井宏治 研究者

電子を分子に付加することで分子の分極率を大きく変化させ、赤外吸収やラマン散乱能を飛躍的に高めるという独自の発想の実現に取り組んだ。理論計算により水中での電子付加により赤外・ラマン活性が著しく増強される結果を導出し、さらに、本法を金属表面と吸着水クラスターの不均一界面の振動分光と、超臨界水中に生成したプラズマと相互作用する水分子の振動分光の測定とに適用し、従来技術で測定できなかった現象や予測された増強スペクトルの測定に成功している。得られた成果は本法の多様な応用分野を示すとともに、電子増強振動分光法の理論を傍証するものとして高く評価できる。一方、未解明の部分も多いので着実に疑問点を整理しつつ現象解析を進めていただきたい。本法は、局所的な環境や構造情報を敏感に反映するため構造決定の重要なツールとなると思われる。波及効果は極めて大きく今後の更なる発展が期待される。

以上のように、専門領域の異なる物理、化学、生物と広い学問分野から参加した7名の研究者がそれぞれの分野で個人の独創的な発想に基づくこれまでにない革新技術の創出を目指して研究を行ってきた。3年半という短期間ではあったが、3分の1程度研究者は目標を達成した。目標達成には至らなくとも、どの研究者も目的達成の目処がつく段階に達しており、近い将来に次世代の新規計測・分析技術の創出や、技術展開が期待できる。各研究者が本領域での研究を契機に計測・分析技術の進展に一層貢献することを期待したい。

(10) 評価者

研究総括 寺部 茂 兵庫県立大学 名誉教授

領域アドバイザー氏名(五十音順)

家 泰弘	東京大学物性研究所 所長・教授
大島 忠平	早稲田大学理工学術院応用物理科 教授
大橋 裕二	いばらき量子ビーム研究センター コーディネーター
神原 秀記*1	(株)日立製作所 フェロー
北森 武彦	東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻 教授
坂入 実	(株)日立製作所基礎研究所 主管研究長
庄子 習一	早稲田大学理工学術院電子光システム学科 教授
白木 靖寛	武蔵工業大学 副学長
鈴木 孝治	慶応義塾大学理工学部応用化学科 教授
田中 信男	京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 教授
田中 通義	東北大学 名誉教授
馬場 嘉信	名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻 教授
前田 瑞夫	(独)理化学研究所基幹研究所前田バイオ工学研究室 主任研究員
渡會 仁	大阪大学大学院理学研究科化学専攻 教授

*1 参画期間 平成 18 年 11 月～

(参考)

(1) 外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	8	36	44
口 頭	54	20	74
ポスター	22	24	46
出版	7	1	8
合 計	91	81	172

※平成 21 年 3 月現在

(2) 特許出願件数

国 内	PCT	計
5	2	7

※平成 21 年 3 月現在

(3) 受賞等

○栗辻安浩 研究者

平成 19 年 8 月 第 4 回堀場雅夫賞受賞

○今西未来研究者

平成 20 年 9 月 Chemistry in the New World of Bioengineering and Synthetic Biology (Royal Society of Chemistry), The Best Poster Prize 受賞

○河野行雄 研究者

平成 19 年 5 月 第 22 回応用物理学会講演奨励賞受賞

平成 19 年 11 月 第 2 回日本物理学会若手奨励賞受賞

平成 20 年 3 月 平成 20 年度光科学技術研究振興財団・研究表彰受賞

○竹内昌治 研究者

平成 20 年 4 月 平成 20 年度文部科学大臣表彰・若手科学者賞受賞

○由井 宏治 研究者

平成年 月 社団法人日本分析化学会 奨励賞受賞

(4) 招待講演

国際 20 件

国内 40 件

※平成 21 年 3 月現在

「構造機能と計測分析」領域 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (応募時所属)	研究費 (百万円)
栗辻 安浩 (兼任)	フェムト秒時空間画像計測システムの創成 (京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科)	京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 准教授 (京都工芸繊維大学工芸学部 助教授)	44
今西 未来 (兼任)	新規時計関連タンパク質の探索法の開発 (京都大学化学研究所)	京都大学化学研究所 助教 (京都大学化学研究所 助手)	40
河野 行雄 (兼任)	近接場 THz 光と電位の複合顕微鏡開発: 電子輸送の新観察法 (独)理化学研究所基幹研究所)	(独)理化学研究所基幹研究所 研究員 (東京大学大学院理学系研究科 助手)	43
小寺 一平 (専任)	ゲノム DNA の超迅速な塩基配列決定法 (北海道大学電子科学研究所)	(独)科学技術振興機構 さきがけ研究者 (北海道大学電子科学研究所 研究員)	46
竹内 昌治 (兼任)	リポソームアレイによる膜タンパク質の機能解析法 (東京大学生産技術研究所)	東京大学生産技術研究所 准教授 (東京大学生産技術研究所 助教授)	44
一二三 恵美 (兼任)	インフルエンザウイルスを計測・除去可能な「スーパー抗体酵素」 (大分大学先端医工学研究センター)	大分大学先端医工学研究センター 教授 (県立広島大学生命環境学部 助教授)	36
由井 宏治 (兼任)	電子増強振動分光法の開発と応用 (東京理科大学理学部)	東京理科大学理学部 准教授 (東京理科大学理学部 講師)	42

研究課題別評価書

1. 研究課題名

フェムト秒時空間画像計測システムの創成

2. 氏名

栗辻 安浩

3. 研究のねらい

自然科学において時間発展する現象の解明・理解はより短い時間の領域に興味が移っていき、現在はフェムト秒という超高速領域に最先端の注目が集められ、世界的に多くの研究機関で精力的に研究が進められている。これらの研究の殆どが、単にエネルギーのみや分光スペクトルの超高速時間発展を計測しているのみであり、超高速現象の画像情報を記録・撮影できるシステムは世界的に類がない。フェムト秒という極短時間領域で進展する超高速現象を観察できれば、物理学、化学、生物学などの自然科学における未知の現象の解明ができる。人間が物事を観察することには多大な価値がある。例えば、空間における微小領域を観察する技術として電子顕微鏡がある。現在のナノテクノロジー、ライフサイエンスの発展は電子顕微鏡による観察技術の賜物である。時間領域における微小領域すなわち極短時間の世界を観察できれば、極短時間の超高速技術の創成と発展に不可欠な技術になると考えられる。そこで本研究では、Light-in-flight ホログラフィーを用いてフェムト秒時間領域で進展する現象を動画像として記録・観察できるシステムを創成し、さらにそのシステムを高速現象の時間発展特性の計測への応用を試みる。

4. 研究成果

(1) 光が伝播する様子の 3 次元像の動画記録と観察

光パルスが伝播する様子を記録・観察できるこれまでの技術では、伝播する超短光パルスの 2 次元像の時間発展しか記録できていなかった。これは、Light-in-flight ホログラフィーでは伝播する超短光パルスと拡散板との交差部分の様子を記録するという原理に基づいていたからである。そこで、超高速の世界の様子について、より忠実かつ多くの情報を得るために、光が伝播する様子の 3 次元像の動画記録と観察を行った。

光が伝播する様子の 3 次元像の動画を記録するために考案した光学系とその実証のために構築した光学系を図 1 に示す。光パルスの 3 次元像を観察するには、3 次元の拡散体を用いることにより伝播する光パルスの波面全体から拡散光を発生させ、それを物体光とすればよいと考えた。3 次元拡散体としてゼラチンで作製したゼリーを用いた。フェムト秒光パルスは拡大した平行光パルスにして、3 次元拡散体に導入した。光パルスの 3 次元像を明瞭に識別するために、図 1(a)に示すような「光」という文字パターンで光を遮断するフォトマスクを、ガラス容器の光パルスが入射する面に装着した。光源には、持続時間が 224fs、中心波長が 720nm の光パルスを発するモードロック チタンサファイアレーザーを、記録材料には Agfa Holotest 8E75HD 乾板を使用した。

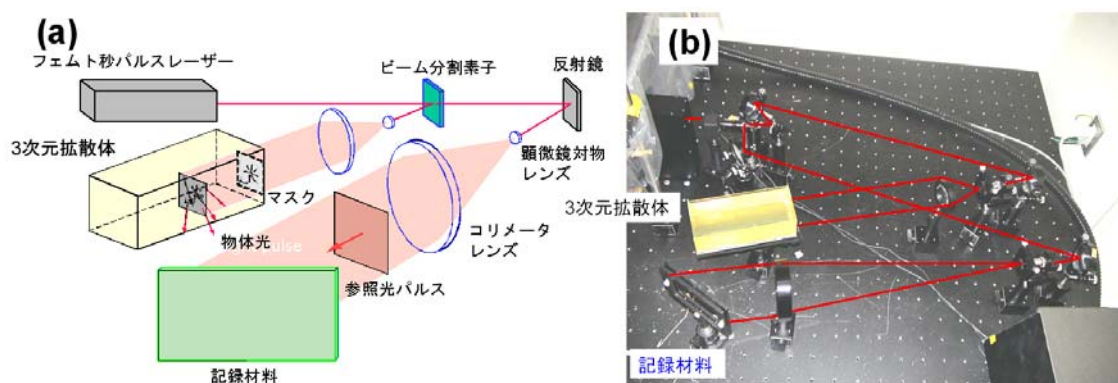


図 1. 光が伝播する様子の 3 次元像の動画記録光学系。(a)概要、(b)構成した光学系の写真。

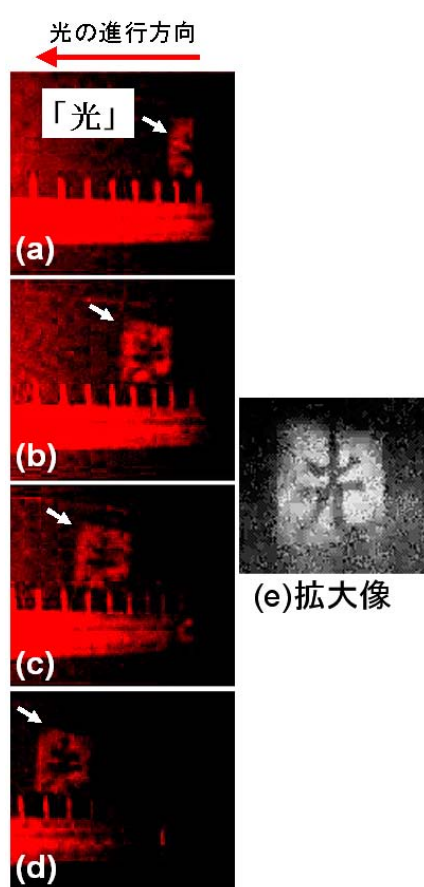


図 2 平行光パルスの伝播の 3 次元像の動画から抽出した 4 コマの画像。

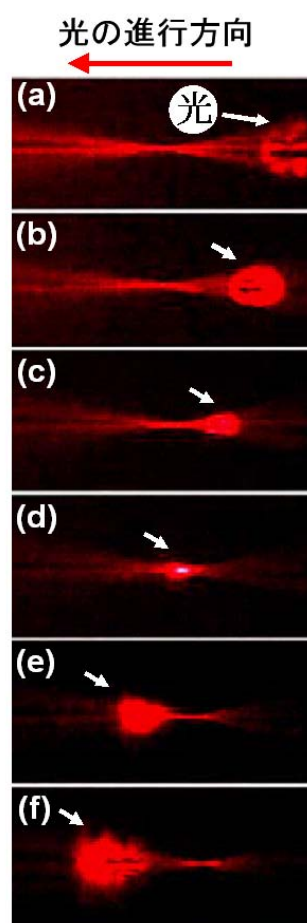


図 3 凸レンズにより収束し集光後、発散する光パルスの 3 次元像の動画から抽出した 6 コマの画像。

実験により光が伝播する 3 次元像を動画として記録・観察に成功した。得られた動画は *Optics Express* のホームページ(<http://www.opticsinfobase.org/oe/abstract.cfm?URI=oe-15-22-14348>)から利用制限無く閲覧できる。その動画から抜き出した 4 コマの画像を図 2 に示す。櫛状のパター

ンは伝播する様子をわかり易いように設けた。櫛の歯の間隔は 1cm である。光パルスは(a)→(b)→(c)→(d)の順に右から左に進んで行く途中である。(e)「光」の部分拡大した像。各画像の時間間隔は 14 ピコ秒で、約 67 μm の薄い光の壁が進んでいく様子の 236 ピコ秒で起こっている現象の記録とスローモーション観察に成功した。

次に、広げて平行光にしたフェムト秒光パルスが凸レンズによって 1 点に集光した後、広がっていく様子の 3 次元動画像記録と観察を試みた。得られた動画は連続した動画として観察できるが、その動画中の 6 シーンを取り出した像を図 3 に示す。(a)→(c)で光パルスは集光していき、(d)ちょうど集光した瞬間、(e)→(f)で広がっていくのを観察できる。「光」という文字が集光した後、上下左右とも反転して進んで行くことも観察できる。各画像の時間間隔は 15 ピコ秒で、得られた動画では 259 ピコ秒で起こっている現象を 3 次元像のスローモーションで観察できた。

次に、通信などの光ファイバに用いられる分布屈折率構造では光パルスが曲がりながら伝播する。分布屈折率構造中を光パルスが伝播する様子の 3 次元像の動画記録と観察を試みた。水とゼラチンで作製したゼリーに連続的な濃度勾配を形成し、屈折率を連続的に変化させることで、この 3 次元拡散体を作製した。記録したホログラムを再生したときに、得られた動画から抽出した写真を図 4 に示す。各写真の中央左から右に延びる輝く曲線は同様のシーンを連続波レーザーで記録した際の再生像であり、フェムト秒光パルスの光路を認識しやすいように、パルス光で記録した像と重ねて表示している。各図は時間間隔を約 52ps ずつ抽出したものである。図 4 の各写真中で矢印の下にそれぞれの動く輝点が撮影に成功したフェムト秒光パルスであり、図 4 の(a)–(d)の順にフェムト秒光パルスが分布屈折率媒質中で連続的に屈折を繰り返して、緩やかに曲がりながら進む様子が記録されたことが、連続波レーザーの像に沿って進んでいることからわかる。

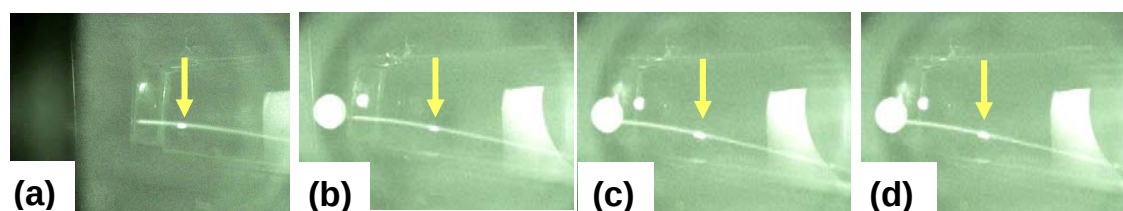


図 4 分布屈折率媒質中を伝播するフェムト秒光パルスの 3 次元動画像から抽出した 4 コマ画像。

(2)フェムト秒光パルスの第二高調波の伝播の動画記録と観察及び書き換え

これまで利用してきたホログラム乾板 Agfa Holotest 8E75HD が製造中止となり、新たな記録材料を用いる必要が生じた。しかしながら現時点で利用可能なホログラム記録材料の殆どは緑色から青色にかけての可視短波長光に感度を持つ。一方、フェムト秒レーザー光パルスの中心波長は 700nm 以上の近赤外域であり、このホログラム記録材料では記録できない。しかも可視のフェムト秒光パルスの伝播を記録・観察した例は報告されていない。そこで、利用可能な記録材料を用いても、フェムト秒時空間画像計測システムを構成できるように、フェムト秒光パルスの第二高調波発生(SHG)を行うシステムを構成した。BBO 結晶を使用し、中心波長 400nm のフェムト秒光パルスの SHG を行った。記録材料にはこの波長に感度があり、解像力が高く入手しやすい乾板である Konica P5600 を用いた。平行光パルスの伝播を被写体として記録し、そのホログラムを再生

した。得られた動画から抜き出した 4 コマの画像を図 5 に示す。伝播する平行光パルスが伝播する様子を横から見たシーンである。青色の部分はホログラムを照明した際に発生する散乱光であり所望の像の背景光に重なっている。矢印の右に弓状の輝線として、フェムト秒光パルスの第二高調波の伝播の動画記録と観察に成功した。

また、新規ホログラム材料として書き換え可能ホログラム材料である光導電性プラスチックホログラム(PPH)にフェムト秒光パルスの伝播の動画記録と観察も行い、記録と観察に成功した。これにより、構成するシステムでは従来ホログラム材料に代わる新しい材料の可能性を示した。

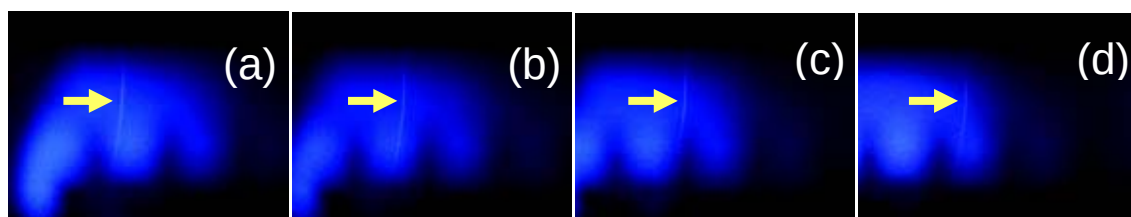


図 5 フェムト秒光パルスの第二高調波の伝播の動画から抜き出した 4 コマの画像。

5. 自己評価

本研究は、従来の方法では速すぎてできなかった、フェムト秒領域での超高速現象を動画像計測・可視化・解析できるシステムの創成を目指して行ってきた。このシステムの全体動作までは至らなかったが、システム構成に必要な各要素として、これまで用いていたが製造中止になったホログラフィック材料に代わる新たな材料に対するフェムト秒光パルスのホログラフィック動画記録、微小領域観察のための顕微鏡システム、デジタル計測システム、レーザー誘起超高速現象の発生システムなどについて検討、設計、試作を行い実験的にそれらの有効性を示すことができた。研究期間中にレーザーが故障しその交換品の納品に 6 ヶ月以上がかかり、想定外の時間が要したがその間は、計算機シミュレーションによりシステム構成の各要素の可能性を示すことができた。

当初の研究計画には無かったが以前から着想していたこととして、目標とするシステムにおいて試料を配置する部分を 3 次元光拡散体にするにより、3 次元超高速動画像観察・計測システムが可能であるということを実証するために、フェムト秒光パルスが伝播する 3 次元の様子を動画像として記録・観察実験を行い、所望の結果が得られた。この結果は、フェムト秒光パルスが伝播する様子を 3 次元動画像として観察したことに世界で初めて成功したというだけでなく、光が伝播する様子を 3 次元動画像として人類が記録・観察に成功したということでもある。この結果により、提案システムの計測機能をさらに空間的に 1 次元分の情報を増やせることを実証した。

現在、最も高性能な超高速カメラの 1 万倍の速度を持つ超高速動画記録・再生が可能な時空間画像計測システムの実現に対する目標としては、計測システムとしての全体動作は達成できなかったものの、動画像速度は達成ができた。

3 次元動画像計測技術であるデジタルホログラフィーを本研究で目標とするデジタル版システムを実現する方法として研究を進めてきた。現在研究中の並列デジタルホログラフィーを細胞の 3 次元動画像計測に有用であると考え、計測法の開発とその装置の原理実験により有効性を確認した。この成果は医療に関する分析技術にも有用と認められ第 4 回堀場雅夫賞が授与された。自

身は応用物理学出身であり、生物や生命科学分野には疎かったが、さきがけの領域会議に参加し幅広い分野の研究発表を聴講し研究者の方々との情報交換をすることにより、この成果を得るための着想となった。

さきがけ研究の当初の課題は完全には達成していないが、研究期間中に達成できた要素や着想したことは、今後の研究を進めて行く上で必要な礎を実現できたというだけでなく、研究の展開や可能性の幅を大きく広げることができたという点から見て、大きな価値があったと認識している。これらの成果は、さきがけ「構造機能と計測分析」領域の領域会議での情報収集や議論に依るところが大きく、研究総括 寺部茂先生、アドバイザーの先生、さきがけ研究者の皆様に感謝申し上げます。

6. 研究総括の見解

超高速度カメラの1万倍の速度を持つ光動画像の計測システムの開発を狙う研究である。フェムト秒レーザーパルスとホログラフィーとを組み合わせたシステムを構築し、超高速現象の可視化に挑戦した。

主たる成果は次の2点である。

①3 次元光拡散体の中を伝播する光パルスの波面全体から拡散光を発生させ、それを物体光とするホログラフィシステムを開発し、これにより光が伝播するという超高速現象を3次元動画として記録し観察することに成功した。

②本計測システムを用いて、凸レンズでの集光や光ファイバー(分布屈折率構造体)の光パルス伝播の3次元動画記録と観察を行い光デバイスにおいて光伝播の可視化が可能なことを実証した。

また、長波長だけでなく可視短波長光に対応したホログラム乾板を用いたシステムで動画記録・観察に成功するなど、このシステムの実用性を高める多面的な努力を積み重ねている。

これらの研究成果は6篇の原著論文、7件の学会招待講演にまとめられている。また平成19年8月に第4回堀場雅夫賞を受賞している。

フェムト秒領域の動画計測に挑む意欲的な研究提案であり、世界で初めてフェムト秒光パルスが伝播する様子を3次元動画像として観察することに成功したことは高く評価できる。この手法は、物理現象の光の計測ツールとして幅広い分野で、新規な現象の発見や解析に貢献すると思われる。今後は、本技術の応用展開を図るとともに、微小領域の光の動きの超高速可視化技術の実現に向かって更に研究を深化させることが期待される。

7. 今後の展開

さきがけの研究期間内でフェムト秒時空間画像計測システムを構成する要素が実現できたとともに、問題点も明らかになった。今後の展開として、まず明らかになった具体的な問題点を解決する方法を検討し、実現していく予定である。また、これまでに実現できた要素を統合してシステムを早期構築し計測システムとして全体動作させることを予定している。

微小領域のフェムト秒動画の記録光学系の構成と動画像記録

高速現象の動画像記録を行うためには、微小領域のフェムト秒パルスの伝播を記録できること

がキーとなる。しかしながら、微小領域のフェムト秒パルスのホログラフィック記録には、物体光パルスと参照光パルスとの光路長を高精度に合わせる必要がある。この高精度調整方法として光路微調整光学系を構成し、さらに干渉縞モニターシステムを構築することにより実現できると考えている。

デジタル版システムの構成

デジタル版システムでは、撮像素子の画素が数 μm であるために参照光パルスをあまり大きな傾き角度で照射することができない。そのために、原理的に所望の像に対して、不要な光が重畳することが原理的に避けることができず、画質や計測精度が低下することが容易に予想される。この不要な光の重畳をデジタル信号処理により除去する方法を検討することが重要な課題である。現在幾つかの新たな方法を考案しその評価を行っており、完全な除去はできていないが、効果的に除去できる方法が明らかになりつつあり、この方法の有効性を実験により確認することを予定している。

超高速現象の動画像観察・計測応用

本システムを超高速現象の動画像観察・計測応用として、まずフェムト秒レーザーパルスを種々の物質に集光した際に発生するプラズマの発生から時間発展を動画として記録することを予定している。

次に、非線形光学材料中や固体発光素子中での光の振る舞いを観察することにより、材料の評価装置への発展を予定している。

実用化に向けてのシステム構成および実装方法の検討

現在構築している実験システムは、大型の光学除震台上に構成しているために、実用システムとしては適した構成や実装がなされていない。汎用かつ実用システムへと発展させるためには、使用するフェムト秒レーザー、光学系の構成や配置等を検討しコンパクト実装を行う必要がある。まずは、市販の医療・バイオ応用の顕微鏡サイズに実装することを目指した光学系の最適設計を行う。

また、超高速現象の時間発展のその場計測、実時間計測を行えるようにデジタル版における電子処理系の高速化、最適設計、専用処理ボードや専用 LSI の開発を検討している。

8. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

- ・ Y. Awatsuji, M. Sasada, A. Fujii, and T. Kubota, "Scheme to improve the reconstructed image in parallel quasi-phase-shifting digital holography," *Applied Optics* **45**, 968-974 (2006)
- ・ Y. Awatsuji, A. Fujii, T. Kubota, and O. Matoba, "Parallel three-step phase-shifting digital holography," *Applied Optics* **45**, 2995-3002 (2006)
- ・ T. Kubota, K. Komai, M. Yamagiwa, and Y. Awatsuji, "Moving picture recording and observation of three-dimensional image of femtosecond light pulse propagation," *Optics*

Express 15, 4348–1454 (2007)

(2)特許出願 なし

(3)受賞

・平成 19 年 8 月 第 4 回堀場雅夫賞受賞

(4)学会発表

口頭発表(国際)

- ・ K. Komai, M. Yamagiwa, Y. Awatsuji, S. Ura, K. Nishio and T. Kubota, "Motion picture of three-dimensional image of femtosecond light pulses diffracted by a diffraction grating", 5th International Conference on Optics-photonics Design & Fabrication, 2006.
- ・ M. Aihara, M. Makino, T. Kakue, A. Kuzuhara, Y. Awatsuji, K. Nishio, S. Ura, and T. Kubota, "Motion picture recording of visible femtosecond light pulse propagation," 13th Microoptics Conference, 2007.
- ・ K. Tosa, M. Aihara, T. Kakue, A. Kuzuhara, M. Makino, Y. Awatsuji, S. Ura, K. Nishio, T. Kubota, "Moving picture recording of femtosecond light pulse propagation with rewritable recording material," International Topical Meeting on Information Photonics 2008, 2008.

ポスター発表(国際)

- ・ T. Kakue, K. Komai, M. Yamagiwa, Y. Awatsuji, K. Nishio, S. Ura, and T. Kubota, "Light-in-flight recording by holography for recording motion picture of magnified image of ultrashort light pulse propagation," 5th International Conference on Optics-photonics Design & Fabrication, 2006.
- ・ A. Kuzuhara, K. Komai, T. Katayama, K. Nishio, Y. Awatsuji, S. Ura, and T. Kubota, "Motion picture recording of visible femtosecond light pulse propagation," 13th Microoptics Conference, 2007.

(5)招待講演

招待講演(国際)

- ・ Y. Awatsuji and T. Kubota, "Observation of Femtosecond Laser Pulses Propagating in Space and Time," IEEE Laser and Electro-optics Society 19th Annual Meeting (LEOS 2006), 2006.
- ・ Y. Awatsuji and T. Kubota, "Moving pictures of three-dimensional image of femtosecond light pulse propagating in three-dimensional space," Sixth Euro-American Workshop on Information Optics, 2006.

招待講演(国内)

- ・ 栗辻安浩, "フェムト秒光速動画像システム," 日本分析化学会第 55 年会、2006.

- ・ 栗辻安浩, “フェムト秒動画像記録再生機器,” 東京コンファレンス, 2006.

(B) その他の主な成果

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

- ・ T. Takaoka, N. Kawano, Y. Awatsuji, and T. Kubota, “Design of a reflective aspherical surface of a compact beam-shaping device,” *Optical Review* **13**, 77–86 (2006)

(2) 特許出願 なし

研究課題別評価書

1. 研究課題名

新規時計関連タンパク質の探索法の開発

2. 氏名

今西 未来

3. 研究のねらい

生物における一日約 24 時間というリズムの発振を司るタンパク質は時計タンパク質とよばれ、それらの遺伝子発現自体がフィードバック制御によって約 24 時間周期のリズムを形成していることが知られている。これまでに、遺伝学的な手法によって、種々の時計タンパク質が発見されてきたものの、リズム形成のメカニズムは不明な点が多く、関与するタンパク質やプロモーター上のエレメントに関する知見を得ることが重要な鍵をにぎる。私は、リズム形成に関わる要因を探索するために、ゲノム DNA に作用し、時計遺伝子の発現リズムに摂動を与えることのできる人工 DNA 結合タンパク質を、新しい分子ツールとして利用できないかと考えた。そこで、代表的な転写因子の DNA 結合モチーフとして知られる Cys2-His2 型ジンクフィンガーモチーフをもとに、様々な遺伝子配列に結合しうる人工 DNA 結合タンパク質および転写因子のライブラリーを作製し、人工ジンクフィンガータンパク質(転写因子)を用いた時計遺伝子発現リズムの調節、および内在性の調節因子の探索を目指した。

4. 研究成果

マルチジンクフィンガータンパク質の DNA 結合性および転写因子としての性質

【フィンガー連結体の作製と DNA 結合性の解析】

代表的な DNA 結合モチーフの1つである Cys2-His2 型ジンクフィンガードメインは、フィンガーあたり3塩基を認識し、フィンガーが複数個連結した構造をとって単量体で連続した DNA 配列に結合するという特徴がある。従って、様々なトリプレットに対応するジンクフィンガーモチーフを連結することによって、長い任意の DNA 配列への結合能を付与することが期待される。そこで、まず、ジンクフィンガー連結体(マルチジンクフィンガー)を作製し、それらの DNA 結合能を検討した。標的 DNA 配列として、時計遺伝子プロモーターに存在するシスエレメントを選択した。マウス時計遺伝子 *Period1*

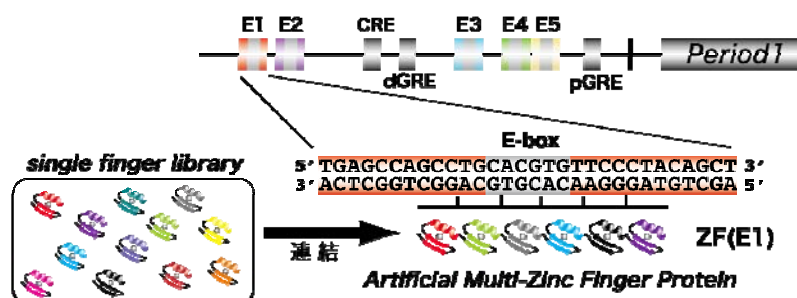


Figure 1. 時計遺伝子 *mPeriod1* プロモーター転写調節エレメントを標的とする人工マルチジンクフィンガータンパク質の作製

のプロモーター上には、リズム的な発現に関わるとされる、E-box 配列が5個(E1〜E5とする)、また核内受容体結合配列、cAMP 応答配列など、様々な転写因子結合エレメントが存在する。しかしながら、時計遺伝子発現のリズム形成における、これらのエレメント各々の寄与はほとんど明らかにされておらず、またゲノム上の特定部位に変異を導入することは簡単ではない。したがって、標的配列選択性の高いジンクフィンガーを得ることができるかどうかは、エレメントの機能評価に向けて重要な意味を持つと考えられる。選択性を発揮するためには、ゲノムサイズを考慮すると16塩基対以上のDNA配列に結合できることが望まれる。そこで、各エレメントを含む周辺18塩基対を標的とするジンクフィンガー6連結体を作製した(Figure 1)。DNA結合実験の結果、例えばE2を標的として作製した6-ジンクフィンガータンパク質は、同じE-boxと呼ばれるシスエレメントであるにもかかわらず、Figure 2に示すように、E2を含む標的配列にのみ結合し、高いDNA配列結合選択性を示した。他のエレメントを標的とした場合も、極めて高い選択性で目的配列に結合することが明らかとなった。一方、作製した6-ジンクフィンガータンパク質の中には、DNA結合能を持たないものも多いことが明らかとなった。そこで、フィンガー欠失体を用いてDNA結合能を検討した結果、各ジンクフィンガーモチーフとDNAトリプレットは完全に独立した対応関係にあるわけではなく、連結体のDNA結合能は、フィンガーの組み合わせによって影響を受けることが示唆された。

【ヘリックスリンカーの導入による不連続配列への選択的結合】

現在までに、全てのトリプレットに対応するジンクフィンガーモチーフは得られていない。したがって、認識できないDNA配列をスキップする、すなわち、不連続な配列に結合できる人工DNA結合タンパク質は有用であり、人工ジンクフィンガータンパク質のライブラリーの多様化を生み出すことが期待される。そこで、効率的に不連続配列に結合できるフィンガーの連結方法を検討した。具体的には、ヘリックス構造を形成しやすいペプチド配列(EAAAR)₄を用い、GC-box配列に結合する、転写因子Sp1のジンクフィンガードメイン(Sp1ZF3)同士を連結し、6つのフィンガーを有するSp1ZF6(EAAAR)₄を作製した(Yan, et al. 2007)。ヘリックスを形成した際のリンカーの長さはDNA1ヘリカルターン分(約10bp)に相当すると予測される。2

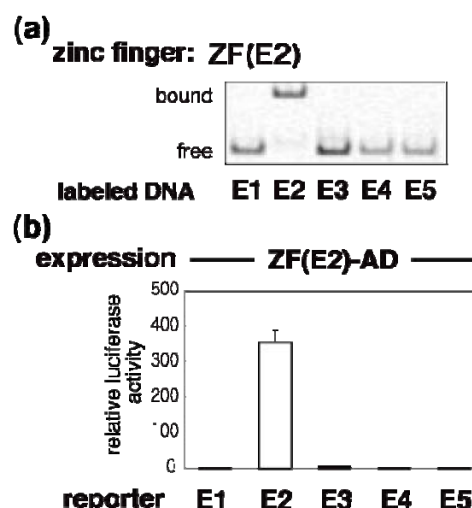


Figure 2. E2-box を標的として作製した6-ジンクフィンガータンパク質のDNA結合配列選択性 (a) 精製タンパク質を用いたゲルシフトアッセイ (b) 細胞内でのレポーターアッセイ

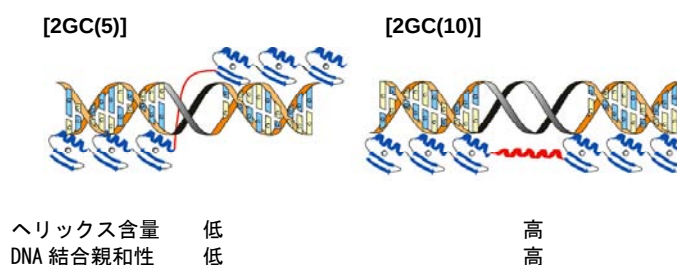


Figure 3. ヘリックスリンカーを導入したマルチジンクフィンガータンパク質

つの認識配列が1ヘリカルターン離れ、同位相にある 2GC(10)と、逆位相にある 2GC(5)に対する結合性を、フレキシブルなリンカーで連結したものと比較した。その結果、Sp1ZF6(EAAAR)4 は、2GC(10)への選択性が高く、またこの時、リンカーのヘリックス傾向性も高いことが明らかとなった (Figure 3)。DNA 認識には直接関与しないリンカー領域が、不連続配列の位置選択性には極めて重要な役割を果たすことを示す結果であり、ジンクフィンガータンパク質のデザインにとって有用な知見を提供するものと考えられる。

【マルチジンクフィンガー型人工転写因子の創製】

様々な DNA 配列に結合するジンクフィンガーと転写調節ドメインとの融合タンパク質は、標的配列下流の遺伝子発現を制御する人工転写因子として働くことが期待される。また、膨大なゲノムサイズを考慮すると、長い DNA 配列に対して高い選択性で結合することができるマルチジンクフィンガードメインが求められる。一方、in vitro での DNA 結合実験の結果から、フィンガーの連結数が3、6、9と増加するにつれ、DNA 結合平衡に到達する時間が顕著に増加する (<2時間~72 時間程度)ということが明らかとなった (Figure 4a)。そこで、フィンガーを9個有するマルチジンクフィンガー型転写因子を作製し、細胞内での経時的な転写調節能を、3-フィンガー型のものと比較した (Morisaki, et al. 2008)。具体的には、天然に存在する転写因子 Zif268 の DNA 結合ドメイン ZifZF3 をもとに、リガンドの添加に

よって機能発現をスイッチできるよう、エストロゲンレセプターリガンド結合ドメインを融合した人工転写因子、ZifZF3ERAD および ZifZF9ERAD を作製した。リガンド添加 1.5 時間後の9-フィンガー型 ZifZF9ERAD の転写活性化量は、3-フィンガー型と比べほぼ等しく、速やかに転写を活性化することが示唆された (Figure 4b)。また、不十分な標的配列に対しては顕著な転写活性化は認められなかったことから、ZifZF9ERAD の細胞内における配列選択性は高く、また、見られた速やかな転写活性化は、一部のフィンガーによる部分的結合ではなく、9-フィンガーの結合によって引き起こされていることが示唆された。マルチジンクフィンガー型転写因子の高い DNA 結合選択性に関しては、*mPeriod1* プロモーター中のエレメントを標的としたジンクフィンガー由来の人工転写因子を用いた実験からも示された (Figure 2b)。これらの結果から、作製したマルチジンクフィンガー型転写因子の細胞内での有用性が期待される。

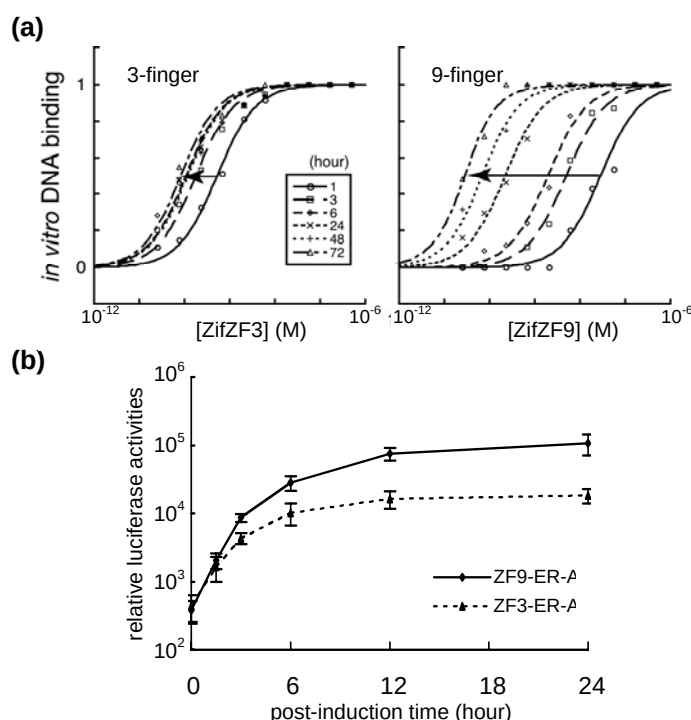


Figure 4. 3フィンガータンパク質と9フィンガータンパク質の(a) in vitro DNA 結合 (b)細胞内転写活性化の時間変化

ジンクフィンガー型人工転写因子の時計遺伝子発現への作用

人工ジンクフィンガータンパク質が時計遺伝子の発現リズムに与える作用を検討するために、*mPeriod1* プロモーターを標的として作製した各ジンクフィンガータンパク質に核移行シグナル (NLS) を融合した ZF-NLS、さらに転写活性化ドメインを融合した ZF-AD を NIH3T3 細胞内で発現させ、時計遺伝子の発現パターンのモニタリングを行った。発現パターンの検出は、時計遺伝子プロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポーターベクターを、ジンクフィンガータンパク質発現ベクターとコトランスフェクション後、ルシフェリン含有メディウムを使用し、細胞内発光を光電子増倍管を用いてリアルタイムで検出した。その結果、ZF-NLS の発現によっては、時計遺伝子発現パターンに変化は認められなかった。一方、転写活性化ドメインを有する ZF-AD を発現させた場合、レポーター遺伝子の発現量の変動(リズム)が増強され、より持続性の高い周期的発現が見られた。このジンクフィンガー型転写因子は、*mPeriod1* プロモーターを標的としているにもかかわらず、他の時計遺伝子プロモーター制御下のレポーター遺伝子のリズム的な発現も誘起したことから、ジンクフィンガー型人工転写因子の内在的な時計制御システムへの作用が示唆される。ゲノム中の特定領域に選択的に作用できる人工ジンクフィンガータンパク質は、時計遺伝子のリズム的な発現メカニズムの解明のみならず、人為的に時計遺伝子発現リズムを増強するための、これまでにない分子ツールとしての応用が期待される。

5. 自己評価

人工ジンクフィンガーライブラリーの作製に関しては、DNA 結合親和性の獲得が簡単ではなく、当初想定していたサイズには及ばなかった。しかしながら、DNA 配列選択性が高いジンクフィンガーを作製することができ、さらに、結合性に関する詳細な検討および、リンカー改変体の作製を通じ、任意の配列に結合できる DNA 結合タンパク質のデザインにとって重要な情報が得られた。また、マルチジンクフィンガー型転写因子の高い塩基配列選択性と速やかな転写活性化を細胞内でも示し、その有用性を支持する結果を得た。時計遺伝子への作用に関しては、作製した人工マルチジンクフィンガー型転写因子を用いることによって、時計遺伝子の発現リズムに摂動を与えることができた。研究期間内では、リズム形成を担う因子を特定するには至らなかったが、様々な遺伝子に変動を及ぼす薬剤刺激とは異なり、ゲノムの特定部位を直接標的とする分子ツールが得られたことによって、これまでにない方法で、生物リズム形成のメカニズムに迫ることが可能になると考えている。

6. 研究総括の見解

ジンクフィンガーの配列特異性と柔軟なモジュール構造を利用した、時計タンパク質の新たな探索法という独創性の高い研究である。時計遺伝子の特定の塩基配列領域に結合するジンクフィンガー連結体の作成を狙うとともに、これを用いて時計遺伝子発現リズム因子の探索に挑戦した。主たる成果は次の2点である。

①DNA結合で飛躍的に配列選択性を高めた 6-ジンクフィンガータンパク質の作成に成功した。また、そのジンクフィンガーモチーフ間にフレキシブルなリンカーを介在させることによりDNA中の不

連続な塩基配列の検出に成功した。

②ジンクフィンガー連結体と転写活性化ドメインの融合タンパク質を細胞内で発現させ、時計遺伝子の発現リズムが増強される現象の確認に成功した。

また、9-ジンクフィンガー連結体を用いて長大なDNA配列に対しても適応可能であることを確認し、この方法の有用性を更に確かなものとした。

これらの研究成果は 2 篇の原著論文、3 件の学会招待講演にまとめられている。また平成 20 年 9 月に Chemistry in the New World of Bioengineering and Synthetic Biology にて The Best Poster Prize を受賞している。

DNA結合選択性を高めるための一連の実験から、時計遺伝子がジンクフィンガーによって制御できることを証明し、生物の概日リズムの解明につながる時計タンパク質探索法の実現性を提示したことは高く評価できる。現段階ではジンクフィンガーと DNA との結合性や発現リズム増強のメカニズムなど未解明の部分も多く、かつ時計遺伝子の分子論的解明もまだ十分されていない。時計タンパクの探索だけでなく、一般性の高い分析手法を開発する、という姿勢を意識しながら研究を進めていくことを期待する。

7. 今後の展開

引き続き、フィンガー個々の特性が連結体の DNA 結合性にどのように反映されるかに関する解析、および連結方法の更なる改良をすすめ、マルチジンクフィンガーによる高い DNA 結合親和性と選択性の獲得法を確立したい。それによって、時計遺伝子に限らず、様々な遺伝子をゲノムの特定領域から制御できる人工転写因子として、また、プロモーター解析のツールとして、生命科学研究に活かすことができると考えている。時計遺伝子の発現リズムが人工転写因子によって増強されたのは、大変興味深い現象であるが、そのメカニズムに関しては未解明である。遺伝子発現の時間変化や一細胞ごとのリズムを解析し、人工ジンクフィンガー型転写因子の作用機序を明らかにすることによって、時計遺伝子の周期的な発現リズムの形成を担う要因を解明していく予定である。

8. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

- ・ Wei Yan, Miki Imanishi, Shiroh Futaki, Yukio Sugiura, "Alpha-Helical Linker of an Artificial 6-Zinc Finger Peptide Contributes to Selective DNA Binding to a Discontinuous Recognition Sequence" *Biochemistry*, 46, 8517-8524 (2007)
- ・ Tatsuya Morisaki, Miki Imanishi, Shiroh Futaki, Yukio Sugiura, "Rapid Transcriptional Activity in Vivo and Slow DNA Binding in Vitro by an Artificial Multi-Zinc Finger Protein" *Biochemistry*, 47, 10171-10177 (2008)

(2)特許出願 なし

(3)受賞

- ・平成20年9月 Chemistry in the New World of Bioengineering and Synthetic Biology (Royal Society of Chemistry), The Best Poster Prize 受賞

(4)学会発表

口頭発表(国内)

- ・今西未来、“亜鉛フィンガー型人工転写因子の創製:遺伝子制御と情報解析に向けて”、日本薬学会第127年会、2007
- ・今西未来、“遺伝子制御に向けたマルチ亜鉛フィンガータンパク質の創製”、バイオメディカル分析科学シンポジウム、2007

ポスター発表(国際)

- ・M. Imanishi, A. Nakamura, and S. Futaki, “Artificial Zinc Finger-Type Transcription Factors Targeting Circadian Clock Genes” Chemistry in the New World of Bioengineering and Synthetic Biology, 2008

ポスター発表(国内)

- ・今西未来、中村篤史、二木史朗、“時計遺伝子プロモーターに作用するジンクフィンガー型人工転写因子の創製”、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム 2008
- ・中村篤史、今西未来、二木史朗、土居雅夫、岡村均、“ジンクフィンガー型人工転写因子を用いた時計遺伝子プロモーター制御”、第15回日本時間生物学会学術大会、2008

(5)招待講演

招待講演(国内)

- ・今西未来、“亜鉛フィンガーを用いた人工DNA結合タンパク質の創製とその応用”、日本分析化学会第55年会、2006

(B) その他の主な成果

なし

研究課題別評価書

1. 研究課題名

近接場 THz 光と電位の複合顕微鏡開発：電子輸送の新観察法

2. 氏名

河野 行雄

3. 研究のねらい

テラヘルツ(THz)電磁波を用いた技術、特に分光・イメージングは、無機・有機材料、生体系、宇宙・天体系など自然科学や産業界の多岐にわたる分野で強力な計測ツールとなることが期待されている。高性能なイメージングを達成する基本として、検出感度と空間分解能の向上が必須となることは、分野を問わない共通の課題である。ところが THz電磁波は電波領域と光領域に挟まれた帯域に位置するという特殊事情のため、その発生や検出に関してエレクトロニクスとオプティクスという既存の2大技術がそのままでは活用しにくい。したがって、光源と検出器といった電磁波計測のための基本素子すら確立された定番と呼べるものがまだない。現在候補となるものはいくつか開発されているが、隣の帯域である可視光・近赤外光領域と比べると技術的な差は大きい。さらにイメージング技術においては、THz 波の波長(0.1~1mm 程度)が可視光に比べて2, 3桁長いことから高い空間分解能が容易に得られないという大きな課題に直面している。以上を背景として本研究は、物質中電子の振る舞いの解明を目的とした、(1)回折限界を超える高分解能を可能にする近接場 THz光顕微鏡の開発、さらに計測の多次元化を目指した(2)電位分布観測が可能な高分解能エレクトロメーターの開発、の2点を目指して行われた。

4. 研究成果

(1)カーボンナノチューブを用いた高感度・周波数可変テラヘルツ検出器の開発

カーボンナノチューブ(CNT)量子ドットは、半導体量子ドットに比べて1電子帯電エネルギーが10~50meVと1桁以上大きくなるため、単電子トランジスタとしてより高温で動作する。このデバイスに THz ガスレーザーを照射することで、電子輸送特性に与える効果を調べた。

図1に、THz 照射なし/ありに対する、CNT 量子ドットのドレイン電流のゲート電圧依存性(クーロン振動)の結果を示す。THz 照射なしで本来電流が流れない領域(クーロン閉塞状態)においても、THz 光を照射することによって新たなサテライト電流が発生することが分かった。さらに、THz 光の周波数を変えると、それに応じて電流ピークの位置が変化する

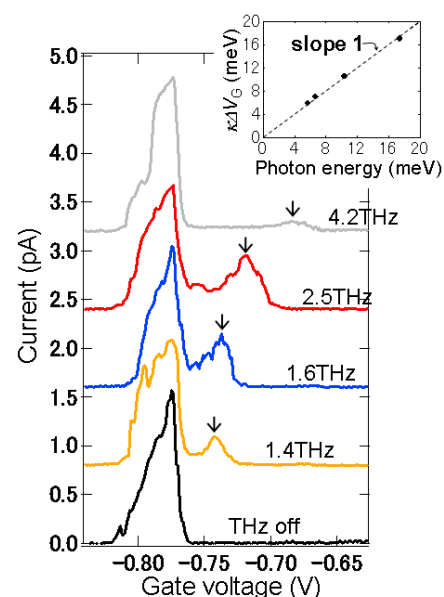


図1. THz照射なし/ありに対するカーボンナノチューブのドレイン電流-ゲート電圧特性。挿入図は2つの電流ピーク間のエネルギー差のTHz光子エネルギー依存性。

ることが明らかにされた。図1挿入図に示したように、サテライト電流ピーク位置は、THz 光子エネルギーに対して線形の依存を示しており、これはまさしくCNTにおけるTHz 光子支援トンネルの直接的な証拠を与えている。検出器としての観点から言えば、周波数可変な THz 検出に成功したことを意味する。

(2)オールインワンチップ近接場テラヘルツ検出器の開発

回折限界を突破し、サブ波長分解能を可能にする近接場光学と呼ばれる技術がある。可視・近赤外光領域では、先鋭化された光ファイバによる微小開口あるいは STM/AFM 探針などによる微小散乱体を利用して、すでに確立された手法がある。ところがTHz 領域では、可視光と比較して波長が 2~3 桁長いこと、市販レベルでは高感度な検出器が存在しないこと等の理由から、その技術的確立は容易ではなく、チャレンジングな課題となっている。本研究では、異種半導体界面 2 次元電子ガス(2DEG)を用いて、新しい近接場(エバネッセント場)THz検出器の開発に成功した。

2. 1 通常の近接場光イメージング

通常よく使用される近接場光イメージングは、図2に描いたように大きく開口型と無開口(散乱)型の2つに分けられる。前者は波長よりも小さな穴に光を通して検出器まで導く手法だが、穴を通過後に光の強度が急激に減少するという問題がある。後者は先鋭化された金属探針で近接場光(エバネッセント場)を散乱させ、検出器まで導く手法である。しかしながらこのやり方では、Far field 光が大きな背景光として検出器に入射するため、大きなバックグラウンド信号として現れることがある。これと近接場光との区別がしばしば問題になる。また、一般的に近接場光の強度は非常に弱いため、高感度な検出機構が必要となるが、開口型、無開口(散乱)型に限らず、検出器が離れた位置にあることがそれを妨げていた。

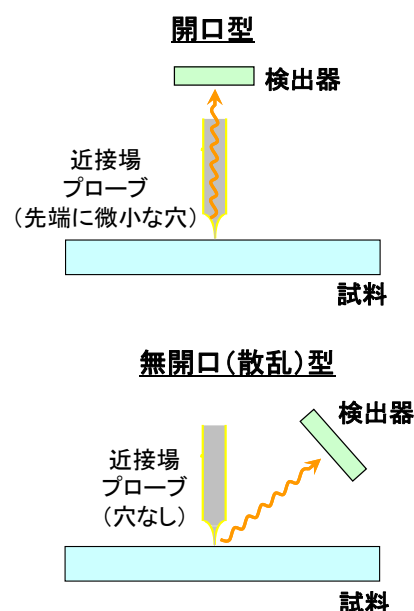


図2. 通常の近接場光イメージング(開口型と散乱型)。

2. 2 開発した近接場THz検出器の素子構造

本研究では、従来のやり方から発想を変えて、近接場 THz 検出に必要な全ての要素ーアパーチャー、平面プローブ、検出器ーが半導体(GaAs/AlGaAs ヘテロ構造)ワンチップに集積化されたデバイスを作製した(図3)。近接場光測定の成否は、本来局在し

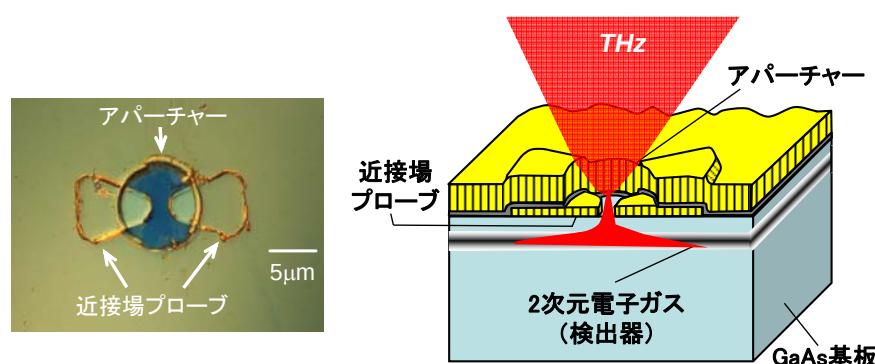


図3. 開発した近接場THzイメージング検出器の光学写真(左)と概念図(右)。

ており、かつ強度の弱い近接場光をいかに効率よく検出器まで導くかが鍵となる。今回作製したデバイスは以下の2つの工夫がなされている。1つ目は、アパーチャーのすぐ背後に存在する近接場平面プローブにより、波長よりも十分小さなサイズのアパーチャー部に発生した近接場光の電場分布(本来は一部分に局在している)をプローブ先端で遠方まで広げることができる。2つ目の工夫は、プローブによって空間的に引き延ばされた近接場光をすぐ間近(60nm 下)にある2D EG検出器で直接的に検出することができる。したがって、近接場THz光のみの高感度検出が可能となる。

2. 3 計算・実験結果:近接場THzイメージングの実証

上述の効果を検証するために、有限要素法によってアパーチャー近傍における THz 電磁波の電場分布を計算した(図4)。近接場プローブがないものとあるものとで比較を行った。この図に示されるように、前者では近接場光がアパーチャー部に局在している様子が見て取れる。一方後者では、近接場プローブの存在によって、本来アパーチャー部に局在する近接場光が空間的に広がっている様子が確認された。この効果により、近接場光と2DEGとの結合効率、言いかえるならば検出感度の増大が期待できる。

以上の計算結果に基づいて、THz 光透過/不透明領域(透過部の幅:50 μm 、不透明部の幅:80 μm)が規則的に並んだ試料に本検出デバイスを近接させながら走査することで、THz 光透過強度分布を測定した(図5)。アパーチャー+プローブでは明確なプロファイルが観測されているのに対して、アパーチャーのみの場合では信号が観測されていない。これは図4の計算結果で示された大きな電場引き込み効果を実証した結果である。

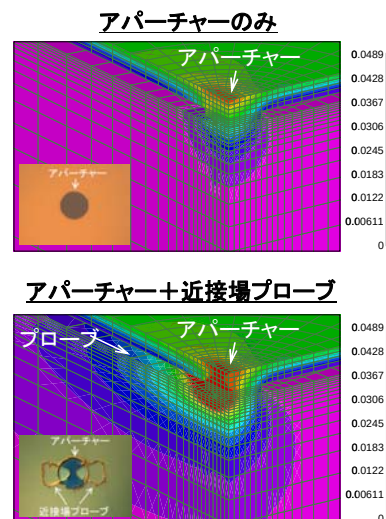


図4. 有限要素法によるアパーチャー近傍における THz 電場分布の計算結果。

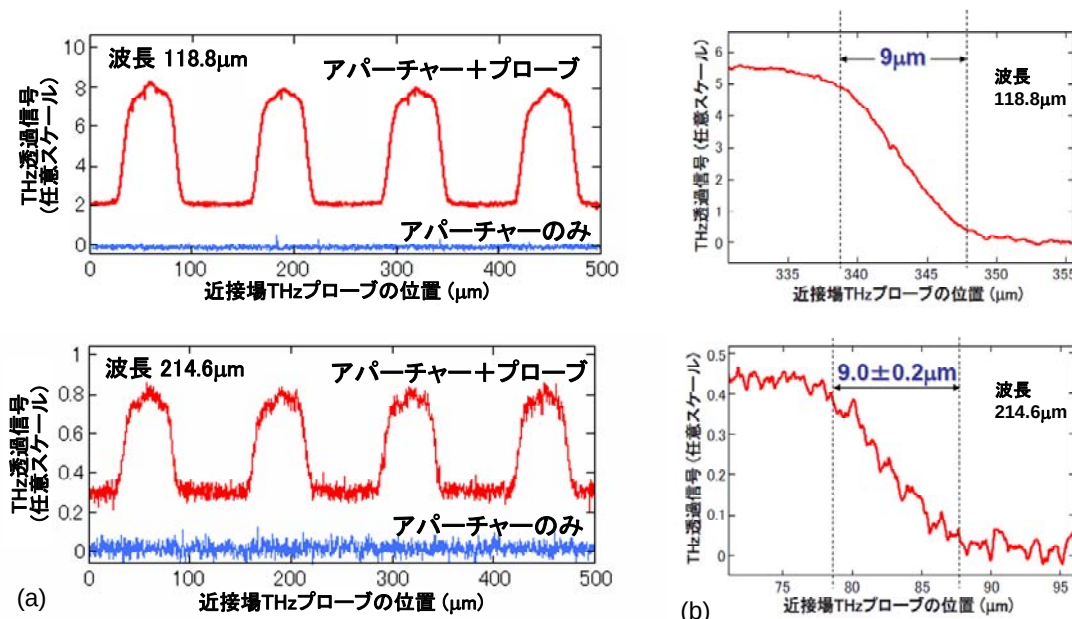
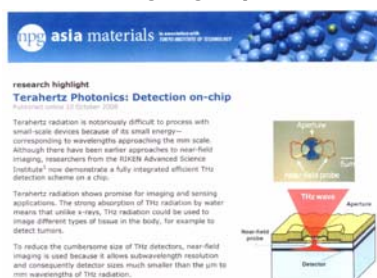


図5. 近接場 THz 検出器走査による THz 透過分布測定。(b)は(a)の一部を拡大したデータ。

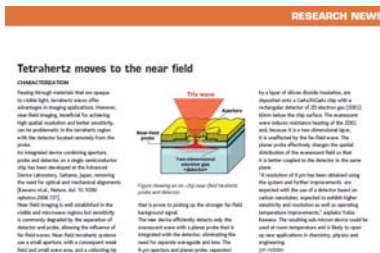
図5(a)の信号減衰部分を拡大することで、このデバイスが持つ空間分解能を見積もった(図5(b))ところ約 $9\mu\text{m}$ であった。この値は、(1)照射THz光の波長に依存しない、(2) $214.6\mu\text{m}$ の波長に対して約24分の1に相当し、回折限界を突破している、(3)アパーチャー径($8\mu\text{m}$)にほぼ一致する。以上の3つの特徴は近接場特有の効果である。したがってここでの実験結果は、今回開発した素子によって近接場 THz イメージングが実現されたことを示している。

本研究で開発した素子は1つの半導体に必要な要素が集積化された“オールインワンチップ”構造であり、各要素間の光学的・機械的調整が不要で信頼性・実用性が高い。今後は、半導体デバイス検査、食品検査、基礎物性研究など多くの用途への普及が期待できる(図6に成果発表)。

Nature Asia Materials
Research Highlight (10 Oct. 2008)



Materials Today
(Elsevier, UK)

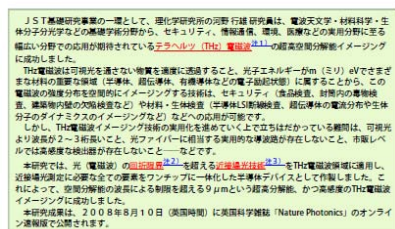


日刊工業新聞
2008年12月9日

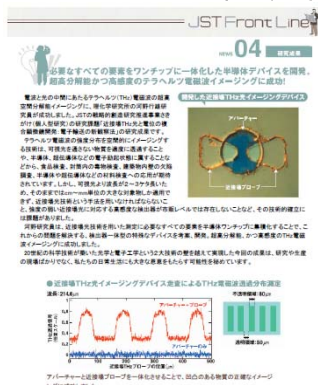


JSTプレスリリース
2008年8月11日

テラヘルツ電磁波の超高分解能画像化に成功
(セキュリティや材料・生体検査など画期的な新画像化技術に道)



JSTニュース 2008年10月号



- その他、以下で特集・紹介:
- 化学工業日報 (2008年8月11日朝刊)
 - Laser Focus World Japan (2008年10月号)
 - RIKEN NEWS (2008年11月号)
 - RIKEN RESEARCH (2008年12月号)

図6. 開発した近接場 THz イメージングに関する成果発表。

(3) 開発した装置の応用を目指した研究: 単層グラフェンの THz 電磁波応答(ディラックフェルミオンの THz 共鳴)

単層グラフェンでは、キャリアが質量ゼロのディラックフェルミオンになり特異な物性を発現することから、世界中で大きな注目が寄せられている。グラフェンの磁場によるランダウ準位形成が通常の半導体とは著しく異なっており、準位間隔が遠赤外～中赤外($1\sim 50\text{THz}$ 程度)の相当な広帯域にわたる。したがって、テラヘルツ電磁波をプローブとした分光やイメージング技術ならびに電位分布や電位揺らぎ分布観測技術を駆使することで、特異なランダウ準位の構造やディラックフェルミオンの時空間特性を探索することは大変興味深い。本研究で開発した2つの装置を適用する対象としては、格好の舞台である。本研究ではこれらの第一歩として、テラヘルツ電磁波との相互作用下におけるグラフェンの電気伝導特性を調べた。

図7に、テラヘルツ電磁波照射に対する電気抵抗変化の磁場依存性の結果を示す。グラフェン

2次元電子ガス(2DEG)と通常のGaAs/AlGaAs-2DEGとの比較を行った。GaAs-2DEGでは応答信号が観測されないのに対して、グラフェン 2DEGでは明瞭なピーク構造が観測されている。今回測定した磁場範囲 0-5Tにおいて、GaAs-2DEGの有効質量から見積もられるランダウ準位間エネルギーは 0-8.5meVである。したがって、それより大きな光子エネルギー(134meV)の電磁波吸収が生じないのは合理的な結果である。一方グラフェン 2DEGでは、キャリア速度を $\sim 1 \times 10^6$ m/s(文献値)と仮定すると、観測されたピークでの磁場値 2.2Tは、134meVの電磁波を吸収してランダウ準位指数 $n = -1 \rightarrow 2$ の遷移を起こす際の磁場値とよく一致する。以上から図7の結果は、テラヘルツ電磁波の共鳴吸収を通して、ディラックフェルミオンがフェルミ準位以上のランダウ準位に励起されたことを示していると理解できる。

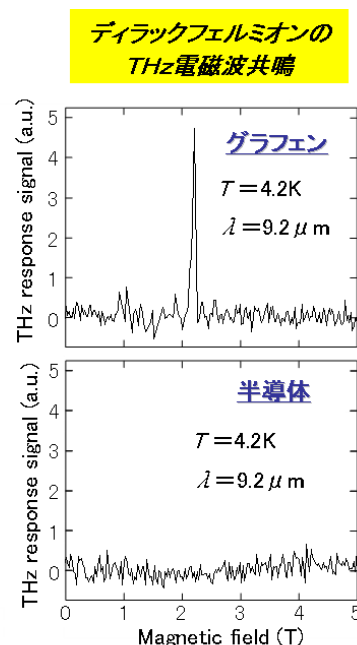


図7. グラフェン(上)と GaAs/AlGaAs(下)の THz 応答信号の磁場依存性。照射THz電磁波の波長は 9.2 μ m。

5. 自己評価

目標として掲げた大きな柱である2つの装置開発、(1)近接場THz顕微鏡ならびに要素技術としてのTHz検出器の開発、(2)高分解能エレクトロメーターの開発は、ほぼ達成した。ただし残された最後の期間で行う予定であった装置を応用した物質科学研究については、手掛け始めたところでプロジェクトが終了した。当然のことながら研究自体はここで終了するわけではない。装置のさらなる発展的開発にせよ、装置を応用した研究にせよ、さきがけ研究を行っていきながら蓄積されたアイデアがいくつかあり、それらの実現に向けてこれからも邁進する。

6. 研究総括の見解

近接場 THz光顕微鏡と電子の流れをマッピングする走査型電位計を開発し、それらを複合化した電子輸送の新たな観察法の研究である。半導体量子構造や高温超伝導体といった最先端物質の物性研究への応用を目指して要素技術の構築に挑戦した。主たる成果は次の2点である。

- ①カーボンナノチューブ量子ドットを THz検出素子として活用する試みで、極めて高感度でありかつ測定周波数をゲート電圧で制御することが可能な THz検出素子の開発に成功した。
- ②アパーチャー近傍の電磁波電場分布の計算結果から、アパーチャー、近接場プローブ、GaAs/AlGaAs半導体を一体化したオールインワンチップ検出器を開発し、THz光の回折限界を突破する 9 μ m の分解能を確認した。

また、グラフェンの物性研究についても開発した本法の適用を試み、THz電磁波応答信号の磁場依存性に極めて興味深いデータを得ている。

これらの成果は 16 篇の原著論文、12 件の学会招待講演にまとめられている。また、平成 19 年に第 22 回応用物理学会講演奨励賞、平成 20 年に第 2 回日本物理学会若手奨励賞、平成 21 年

平成 20 年度光科学技術研究振興財団研究表彰を受賞している。

独創的な研究成果とともに実用性向上への努力、応用対象となる新素材への適用検討などの幅広い取り組みも高く評価できる。近接場 THz 光と電位測定 of 複合顕微鏡を開発するという当初の目標には至らないが、この成果を応用する方向性は見えてきた。今後は、更に高感度化、高分解能化の限界に挑戦し、多くの応用分野で新材料の物性研究を加速することが期待される。

7. 今後の展開

(1) THz 検出器について

今後の改良点として、THz 検出信号の高感度な読み出し(単一電子ダイナミクスの計測が可能な量子ポイントコンタクト素子を CNT の間近に配置したハイブリッド構造の作製)、検出周波数精度と動作温度の向上(2重結合量子ドット構造を作製し、2つの量子ドットの離散準位間の電子遷移により検出)を計画している。

(2) THz イメージングについて

今回開発した近接場 THz 検出器は現時点でも多くの用途に使用できるが、材料科学や細胞科学などの分野では観察対象によってより高い空間分解能が要求される場合がある。本デバイスの空間分解能はアパーチャー径で決まるため、この径を小さくすれば空間分解能は向上する。ただしそれに伴ってエバネッセント場の強度が急激に減少するため、検出器の感度も同時に向上させる必要がある。そのための有望な策として、開発した CNT による検出器を利用することを計画している。この検出器は 2DEG のみの検出器よりもはるかに高感度である。このデバイス構造の改善によって、約 2 桁高い $0.1 \mu\text{m}$ の空間分解能が得られると見積もっている。このデバイスも“全集積化”型であるため、コンパクトで使い勝手のよいものになるだろう。

(3) THz 計測の物質科学研究への応用について

THz 分光・イメージングは幅広い用途が可能であり、特に「非破壊検査」の観点から将来は巨大な市場形成につながる可能性を秘めている。こういった展開とともに、物質・材料研究への応用も興味深い課題である。THz 光の特徴として、光子エネルギーが meV 領域、電磁波振動の時間が ps 領域にあることも重要な要素である。したがって、半導体、超伝導体、有機導体などの物質中電子の低エネルギー励起状態やダイナミクスの空間・時間特性を調べるツールとして、本研究で開発した高感度 THz 検出器や高分解能 THz イメージングが大きな威力を発揮すると期待している。

1つの面白い方向性として、グラフェンにおける THz 発光イメージングを測定することで、ディラックフェルミオンの局所的なエネルギー散逸機構や伝導特性を探求することを計画している。

8. 主な論文等

(A) さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

- ・ Yukio Kawano and Tohru Okamoto, "Macroscopic Channel-Size Effect of Nonequilibrium Electron Distributions in Quantum Hall Conductors", Physical Review Letters 95, 166801-1-4 (2005)
- ・ Yukio Kawano and Tohru Okamoto, "Noise-voltage mapping by a quantum-Hall electrometer", Applied Physics Letters 87, 252108-1-3 (2005)
- ・ Yukio Kawano, Tomoko Fuse, Seiko Toyokawa, Takeo Uchida, Koji Ishibashi, "Terahertz photon-assisted tunneling in carbon nanotube quantum dots", Journal of Applied Physics vol. 103, pp. 034307-1-4 (2008) and subsequently selected for Virtual Journal of Nanoscale Science & Technology vol. 17, (2008)
- ・ Yukio Kawano and Koji Ishibashi, "An on-chip near-field terahertz probe and detector", Nature Photonics 2, 618-621 (2008)

論文(国内)

- ・ 河野 行雄, "高感度テラヘルツ波検出器 —近接場イメージングへの応用—", 日本光学会誌「光学」・特集「テラヘルツ波デバイスの開発と応用」 38, 81-88 (2009)

(2)特許出願

発 明 者:河野 行雄、石橋 幸治

発明の名称:近接場テラヘルツ光検出器

出 願 人:独立行政法人 理化学研究所

出 願 日:2008 年 8 月 7 日(未公開)

出 願 番 号:特願 2008-178041

発 明 者:河野 行雄、石橋 幸治

発明の名称:テラヘルツ光検出装置とその検出方法

出 願 人:独立行政法人 理化学研究所

出 願 日:2008 年 9 月 1 日(未公開)

出 願 番 号:特願 2008-222980

発 明 者:河野 行雄、石橋 幸治

発明の名称:Near-field terahertz wave detector

出 願 人:独立行政法人 理化学研究所

出 願 日:2009 年 1 月 9 日(未公開)

出 願 番 号:US12/351208

発 明 者:河野 行雄、石橋 幸治

発明の名称:テラヘルツ電磁波検出装置とその検出方法

出 願 人:独立行政法人 理化学研究所

出 願 日:2009 年 2 月 9 日(未公開)

出 願 番 号:特願 2009-27537

(3)受賞

- ・ 平成 19 年 9 月 第 22 回応用物理学会講演奨励賞受賞
- ・ 平成 20 年 9 月 第 2 回日本物理学会若手奨励賞受賞
- ・ 平成 21 年 3 月 平成 20 年度光科学技術研究振興財団・研究表彰受賞

(4)著書

- ・ Yukio Kawano, Tomoko Fuse and Koji Ishibashi, "Ultra-highly sensitive terahertz detection using carbon-nanotube quantum dots", Physics and Modeling of Tera- and Nano-Devices (World Scientific Publishing Co Pte Ltd), 2008

(5)学会発表

口頭発表(国際)

- ・ Yukio Kawano, Tomoko Fuse, Takeo Uchida, Koji Ishibashi, "Observation of terahertz-photon sidebands in carbon nanotube quantum dots", 17th International Conference on the Electronic Properties of Two-Dimensional Systems (EP2DS-17), 2007
- ・ Yukio Kawano, "Terahertz sensing and imaging using carbon nanotubes: application to quantum transport", LISE Special Seminar at Harvard University, 2008
- ・ Yukio Kawano, Tomoko Fuse, Seiko Toyokawa, Takeo Uchida, Koji Ishibashi, "Highly sensitive and frequency-tunable THz detector using carbon nanotube quantum dots", 33rd International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves, 2008
- ・ Yukio Kawano and Koji Ishibashi, "On-chip near-field THz imaging probe integrated with a detector", 33rd International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves, 2008
- ・ Yukio Kawano and Koji Ishibashi, "Near-field terahertz detection on one chip", International Workshop on Optical Terahertz Science and Technology 2009, 2009

(6)招待講演

招待講演(国際)

- ・ Yukio Kawano and Tohru Okamoto, "Spatial imaging of noise voltages by a quantum-Hall scanning electrometer", 7th International Conference on New Phenomena in Mesoscopic Structures/5th International Conference on Surfaces and Interfaces of Mesoscopic Devices, 2005
- ・ Yukio Kawano, "Terahertz sensing and imaging based on carbon nanotubes: frequency-selective detection and near-field imaging", JST-DFG Workshop on

Nanoelectronic、2008

- ・ Yukio Kawano、“Frequency-tunable detection and near-field imaging of THz waves”、International Symposium on Terahertz between Japan and Sweden、2008
- ・ Yukio Kawano、“Application of low-dimensional electronic devices to THz technology: Carbon nanotube detector and near-field imaging”、2nd Japan-Korea Joint Workshop on THz Technology、2008

招待講演(国内)

- ・ 河野 行雄、“超高分解能テラヘルツ波イメージングー固浸レンズ式と近接場式ー”、電子情報通信学会大会・2009 年総合大会シンポジウム「ここまでのミリ波・テラヘルツ波イメージング」、2009

(B) その他の主な成果

なし

研究課題別評価書

1. 研究課題名

ゲノム DNA の超迅速な塩基配列決定法

2. 氏名

小寺 一平

3. 研究のねらい

癌を始めとする内因性の疾病の多くは遺伝子変異の集積に起因する。こうした疾病の理解や治療、予防のためには、患者 1 人 1 人の病変細胞において DNA のどの箇所に変異がもたらされたかを明らかにする必要がある。しかし 29 億塩基対にもおよぶヒトゲノムを既存の技術で解読するには多大な労力とコストが必要であり、個人ゲノムの解読は実用化されていない。そこで私は、新しい DNA 解読反応を 1 分子蛍光観察により高速かつ並列的に解読する方法を考案し、これを実現するための基礎技術の確立を試みた。具体的には、DNA リガーゼと制限酵素を至適条件で組合せ、DNA を 1 塩基ずつ連鎖的に削除する酵素反応の効率化に関する研究を行った。また、蛍光プローブと 1 分子観察光学系を用いて DNA 解読反応を並列的に可視化し、新しい高速 DNA 解読技術の確立を目指した。また、上記の DNA 解読反応を DNA の組換えに応用する技術を考案し、これを実証して新しい DNA 組換え反応を実用化するための研究も行った。DNA 組換えは、生物学的な研究や技術において非常に使用頻度の高い重要な技術であるにもかかわらず、これまで応用性と迅速性を兼ね備えた組換え技術は実現されていなかった。そこで、DNA 解読反応から派生した新しい酵素反応を用い、全自動であらゆる DNA 組換えに対応できる技術の実用化を目指した。

4. 研究成果

DNA 解読反応に関する研究

分子生物学的な研究で通常用いられる制限酵素は type IIP と呼ばれる酵素であり、DNA の認識部位と切断部位とがオーバーラップする。一方で、type IIS に属する制限酵素では認識部位と切断部位が異なる位置に存在するため、プローブ DNA には認識部位を、解析対象 DNA には切断部位をそれぞれ設けることにより、任意の塩基数だけ DNA を削除することが可能である。Type IIS 制限酵素のこのような特性と、固定化した DNA、蛍光標識したプローブ DNA、DNA リガーゼなどを反応させることで、DNA の塩基配列が決定できると考えた。解

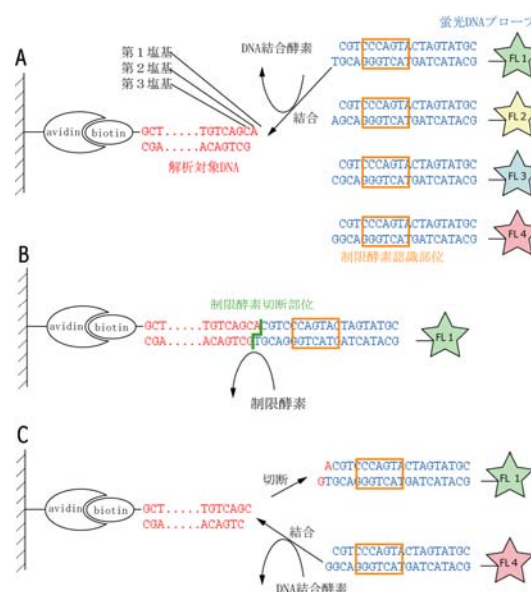


図1 DNA 解読反応の原理

析対象となる DNA は一方の末端で基板表面に固定し、もう一方の末端を突出末端とする。プローブ DNA にも突出末端を設け、末端の種類に応じてそれぞれ 4 色の蛍光標識を繋ぐ。こうした反応系に DNA リガーゼを加えると解析対象 DNA の末端の種類に応じたプローブが結合され、蛍光色素の波長により DNA の第 1 塩基が決定する。ここに type IIS 制限酵素を加えると第 2 塩基が露出する形で DNA が切断され、新たにプローブと DNA リガーゼが反応することで第 2 塩基が決定する。このような一連の反応を DNA 解読反応と呼び、これを繰り返し、あるいは連続的に行うことで DNA の塩基配列を順次決定することが出来る(図1)。

DNA 解読反応を実験的に検証するために、バルク反応系を用いて種々の条件の検討を繰り返した。こうした実験を行うために解析対象 DNA を蛍光標識し、type IIS 制限酵素と DNA リガーゼによる解読反応で分子量が小さくなった蛍光 DNA の断片をキャピラリー電気泳動で解析した。この実験から反応速度と配列正確度が高く、本手法に最も適した制限酵素を見いだした。同様の実験系を用いて DNA リガーゼの検討も行った結果、通常の分子生物学的な研究で用いられる T4 DNA リガーゼではなく、NAD⁺要求性のリガーゼが反応効率と正確性の両方を満たすことを明らかにした。こうした酵素のスクリーニングにより選り出された酵素を組み合わせることで、DNA の連鎖的な解読反応を効率的に行うことができるようになった。さらに、1 分子観察で必要となる界面活性剤やイオン強度、DNA 末端の形状、吸着阻害剤などと DNA 解読反応との相性もバルク反応系で解析し、DNA 解読反応に関する基礎的な知見を得ることが出来た。

マイクロ流路と 1 分子観察光学系の開発

DNA 解読反応を可視化するためには、ガラス基板に固定されている解析対象 DNA と反応した蛍光プローブを溶液中のフリーなプローブと見分ける必要がある。これを実現するために、ガラスの近傍に取り込まれたプローブのみを励起できるプリズム型全反射照明装置を開発し、これにより、一様な励起光を広範囲に照射することが可能となった。

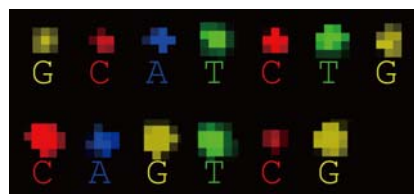


図2 DNA 解読反応の 1 分子観察

また、各種酵素の至適温度が異なることや、1 分子観察中に繰り返し溶液を交換する必要があることから、専用のマイクロ流路と溶液の還流装置を開発した。最高で 20 種類の溶液を扱うことの出来るオートサンプラや温度制御機構つきインジェクタ、ノズル洗浄装置、送液ポンプなどを組み合わせ、マイクロ流路に全自動で反応溶液を還流する装置を開発した。さらに、DNA リガーゼの至適温度である 16℃と制限酵素の至適温度である 37℃とを高速に切り換えるため、マイクロ流路周りに温度調整用の流路を設け、目的温度の液を環流させてマイクロ流路の素早い温度制御を行えるようにした。また、プローブの非特異的吸着を抑制するために、ガラス基板の様々なコーティングと DNA の固定化方法を検討した。その結果、エポキシシランと PEG、ビオチン、ストレプトアビジンを組み合わせたコーティングが最も頑強で且つ吸着の少ないことが明らかになった。こうしたコーティングをプリズムの底面に行うことで、上記のマイクロ流路に任意の DNA を固定し、DNA 解読反応の 1 分子観察が可能となった。このような実験系を用い、1 分子レベルでの DNA 解読に成功した(図2)。

蛍光脂質ナノプローブによるDNA解読反応の可視化

チャルマーズ工科大学のフック教授らとの共同研究から、脂質ベースの蛍光ナノプローブを用いて DNA 解読反応を可視化する試みを行った。当初用いていた量子ドットなどのプローブと比較して蛍光脂質プローブはガラス基板への非特異的吸着が非常に少なく、本技術との親和性が高いことが明らかになった。また、DNA 解読反応を連鎖的に行うことに加え、各種酵素を交互に作用させることで段階的な DNA 解読反応の観察も試みた。非特異的吸着の激しい量子ドットなどではこうした観察は不可能であったが、蛍光脂質ナノプローブを用いることで段階的な DNA 解読反応に成功した。これにより、複数酵素による各反応を 1 段階ずつ詳細に解析することが可能となり、DNA 解読反応の一層の効率化に向け、有用な技術を確立することが出来た。

全自動DNA組換え反応技術の開発

DNA 解読反応で用いた各種

酵素による連鎖反応は、DNA 断片の組換えにも応用出来ることを見だし、全自動で DNA を組換える技術の開発を行った。通常の type IIP 制限酵素で処理したインサート断片とベクター断片を DNA リガーゼで結合させると、切断面がパリンドローム配列であるため目的の産物以外にも様々な組合せの産物が生じてしまう。Type IIS 制限酵素を用いることで、目的の産物のみを結合させることのできる非パリンドローム切断面を設計することが可能である。このような反応系においては、最終産物に至る酵素反応が方向性を有するため、これを応用した高効率で迅速に DNA を組換える新しい技術の開発に成功した。Type IIS 制限酵素の認識部位を付加したプライマーでインサートとベクター断片を増幅し、制限酵素と DNA リガーゼを同時に反応させると制限酵素の認識部位が切断と結合を繰り返す平衡反応が起こる。この時、ベクターとインサートが結合すると、この産物には制限酵素の認識部位がもはや存在しないため、平衡反応から最終産物への 1 方向の反応が起こる(図 3)。さらに、PCR 産物中に存在する DNA ポリメラーゼの残存活性を抑制する薬剤や、テンプレート DNA を特異的に切断する *DpnI* を添加することで、「混ぜるだけ」で最終産物に組換えることの出来る技術開発に成功した。

5. 自己評価

本技術を実用研究に進めるためには解決すべき課題がいくつか存在するが、さきがけ研究で当初提案した方法の原理を実証することに成功し、1 分子レベルでの可視化も達成することが出来た。また、本技術を実用化する上で大きな問題となるプローブの非特異的吸着についても、蛍光脂質ナノプローブを応用することで解決の糸口を見いだした。本技術を用いてゲノム DNA を解読するなど、実用化に向けた研究には残念ながら到達することは出来なかったが、1 分子観察と

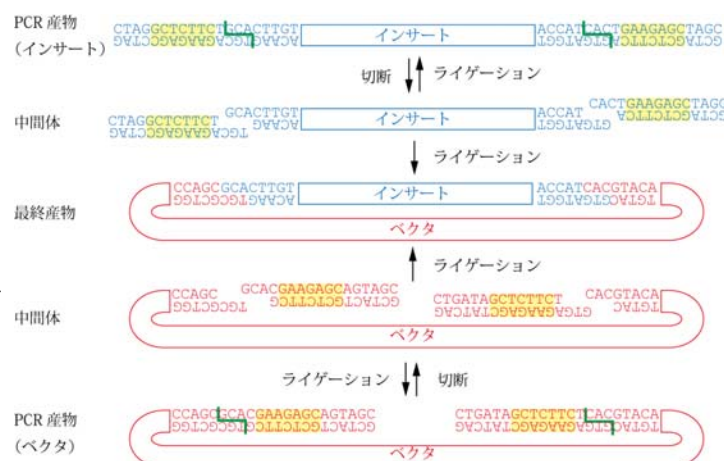


図 3 DNA 組換え反応の原理

DNA 解読反応を組み合わせた新しい方法論の可能性を示すことが出来たと考える。今までに、DNA の連鎖的な削除反応を最適化するための先行研究は少なく、本研究で得られた知見は、今後 DNA に関する様々な技術に応用されることが期待できる。さらに、本技術から派生した新しい DNA 組換え法については成功し、当初の目的外であった DNA の迅速な組換えを、DNA 解読反応の新しい応用例として示すことが出来た。

6. 研究総括の見解

従来の方法と比較して飛躍的に高速なDNA解読技術の実現を狙う研究である。制限酵素とDNAリガーゼを用いたDNA解読反応を1分子蛍光観察により高速かつ並列的に解読するという独創的な方法を考案し、これを実現するための基礎技術の確立に挑戦した。

主たる成果は次の2点である。

- ①制限酵素とDNAリガーゼのバルク反応実験から解読反応の高効率性と正確性が両立する最適な組み合わせを導出し、一分子観察の基本技術を確立した。
- ②解読反応を可視化するため、酵素反応を最適化するマイクロ流路、ガラス基板の非特異的吸着を抑制するコーティング、プリズム型全反射照明装置などの技術開発に総合的に取り組み、塩基配列高速解読の基本システムを完成させた。

また、量子ドットプローブに代えて新規な蛍光脂質プローブに着目し、さらに高速解読が可能な反応系の開発に着手したことや、DNA解読反応と同じ反応系を応用して、DNAを全自動で組み変える興味深い技術開発を行ったことも高く評価できる。

これらの研究成果は2篇の原著論文、1件の学会招待講演にまとめられている。

チャレンジ性が極めて高い研究構想であったが、当初の手法の問題点を明らかにしつつ、最適な酵素反応系を探索した。ステップワイズな手法が行えるマイクロチップの開発まで行うことにより、この方法の実用性を明確なものとした努力は賞賛に値する。本技術は医療や生命研究など様々な分野に大きな変革をもたらす可能性があり、今後の更なる研究の深化が期待される。また、取り組み過程で得たノウハウをサイエンスに仕上げる努力も更に望まれる。

7. 今後の展開

これまでDNA解読反応に関する研究を、主に試験管内でのバルク反応系と基板表面での1分子観察を用いて行ってきた。これらを用いて反応の分析を相補的に行ってきたが、全く異なる2つの環境での結果を比較することは、しばしば困難が伴った。今後は、こうした実験系の中間的な要素を有する基板表面でのバルク反応系を用い、実際の測定に近い環境での解読反応の高効率化を目指す。具体的には水晶発信子マイクロバランス法や表面プラズモン共鳴法などを用い、DNA解読反応の詳細な解析を基板表面で行う。

本研究で検討した様々なプローブに関する知見を基に、新しい1分子蛍光プローブの開発も今後行う。量子ドットは1波長励起で4色の蛍光が得られる反面、基板表面への非特異的吸着が、困難な問題であった。脂質ナノプローブは吸着が大幅に減少するものの、光学的性能にやや難点があった。そこで、脂質ナノプローブに量子ドットを取り込ませ、DNA解読反応を可視化するた

めの新しい 1 分子プローブの実現を今後目指したい。

8. 主な論文等

(A)さががけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

・ Ippei Kotera, Takeharu Nagai, "A high-throughput and single-tube recombination of crude PCR products using a DNA polymerase inhibitor and type IIS restriction enzyme", Journal of Biotechnology, Oct 10;137(1-4):1-7, 2008

(2)特許出願

発 明 者:小寺一平、永井健治、谷知巳、米田悦啓

発明の名称:DNA塩基配列を決定する方法

出 願 人:北海道大学

出 願 日:2007 年 2 月 19 日

出 願 番 号:PCT/JP2007/053461

発 明 者:小寺一平、永井 健治

発明の名称:組み換え DNA の調整方法

出 願 人:北海道大学

出 願 日:2007 年 8 月 21 日

出 願 番 号:特願 2007/215238

(3)著書

・ 小寺一平、永井健治、" ワンステップ&シングルチューブでの全自動プラスミド構築方法"、細胞工学/秀潤社、2009

(4)学会発表

口頭発表(国際)

・ Ippei Kotera, "Novel DNA sequencing technique: single-molecule observation of stepwise nucleotide deletion", The SSF/JST-PRESTO joint symposium, 2008

・ Ippei Kotera, Takeharu Nagai, "Construction of multi-fragment plasmid by a rapid and spontaneous recombination reaction in a single tube", Hokkaido University/Seoul University Join Symposium, 2008

口頭発表(国内)

・ 小寺一平、"DNA連鎖削除反応によるDNA配列の解読と組換え"、第11回生命化学研究会、2008

- ・ 小寺一平、永井健治、”迅速プラスミド構築法: type IIS 制限酵素と DNA ポリメラーゼ阻害剤を用いた DNA の自動組換え技術(FASTR)”、第 31 回日本分子生物学会年会、2008

ポスター発表(国際)

- ・ Ippei Kotera, Takeharu Nagai, ”Versatile strategy for high-throughput multi-fragment DNA recombination by a spontaneous partner-seeking reaction in a single tube”、The 9th RIES-Hokudai International Symposium、2008
- ・ Ippei Kotera, ”Novel DNA sequencing techniques: single molecule observation of a spontaneous enzymatic reaction.”、The 2008 Bioanalytical Sensors Gordon Research Conference、2008

(5) 招待講演

招待講演(国際)

- ・ Ippei Kotera, ”Novel DNA sequencing techniques: microscopic observation of an autonomous chain reaction.”、NATURE METHODS-FUJIFILM SYMPOSIUM: METHODOLOGICAL CHALLENGES OF THE POST-GENOMIC ERA、2006

(B) その他の主な成果

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

- ・ Wataru Tomosugi, Tomoki Matsuda, Tomomi Tani, Tomomi Nemoto, Ippei Kotera, Kenta Saito, Kazuki Horikawa and Takeharu Nagai, ”An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity”、Nature Methods、Accepted、2009

(2) 特許出願 なし

(3) 著書

- ・ 永井健治、小寺一平、”FRET プローブ - 蛍光分子の組合せ選択から分子間距離の計算法まで”、蛍光・発光試薬の選び方と使い方 三輪佳宏編/羊土社出版、2007
- ・ 永井健治、小寺一平、”共鳴エネルギー移動(FRET)の基礎”、生細胞蛍光イメージング/共立出版、2007

(4) 学会発表

口頭発表(国内)

- ・ 小寺一平、”3 フィルタセット法を用いた FRET シグナルのセンシタイゼーション”、第 12 回細胞生物学ワークショップ、2008

研究課題別評価書

1. 研究課題名

リポソームアレイによる膜タンパク質の機能解析法

2. 氏名

竹内 昌治

3. 研究のねらい

本研究の目的は、マイクロ流体デバイスを利用して、膜タンパク質の導入された単一直径の巨大リポソームを形成し、基板上にアレイ化する方法を確立し、膜タンパク質の効率的な機能解析への可能性を探ることである。単一直径リポソームは、医薬品、食品、化粧品など多くの産業分野への活躍が期待されているため、大量の単一直径リポソームを効率的に生産する方法が渴望されている。また、膜タンパク質は、細胞の内外の物質輸送・排出に重要な役割を果たしているため、各種の膜タンパク質の機能や特性を一つ一つ解明することが、次世代の治療、創薬法、あるいは超高感度生体イオンセンサーの実現に重要な研究課題となっている。ここでは、マイクロ流体デバイスを利用して単一直径の巨大リポソームを作成する方法を検討し、一種類の膜タンパク質が導入されたリポソームをアレイ状に固定化する方法を探る。これにより、狙った膜タンパク質の物質輸送効率を定量的かつ効率的に評価するシステムへの展開を図る。

4. 研究成果

(1) リポソーム生成法

(i) エレクトロフォーメーション法

エレクトロフォーメーション法とは、リン脂質膜で覆われた基板に電圧を印加することによって、膜を剥離させ、一層の脂質 2 重膜で構成されたリポソームを得る方法である。他の一般的な方法に比べ、数ミクロン以上の巨大リポソームが作れる、一枚膜構造を得られやすい、比較的大きさが揃っているなどの特長があるが、一方で、サイズの制御は課題であった。そこで、ここでは、まず、脂質を基板上にパターンすることから検討した。あら

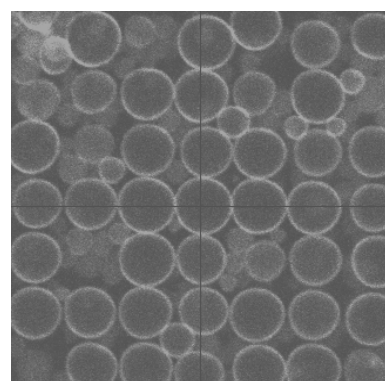


図1：脂質膜のパターニング後にエレクトロフォーメーションを行なった様子。

かじめ ITO 基板にパリレン樹脂を蒸着し、部分的にエッチングすることで、ITO が一部露出したパターンを用意する。次に、この基板上へ脂質が分散した有機溶媒を垂らし、乾燥させる。すると基板が脂質で覆われる。その後、パリレンを引き剥がすことで、ITO の露出した部分にのみ、脂質をパターンニングできた。この状態で、水溶液を加え、電圧を印加しエレクトロフォーメーションを行った。その結果、図1のように脂質膜が膨潤してリポソーム形状が現れた。ばらつきは約7%程度(小径のリポソームは除く)でリポソームの直径を制御することができることが分かった。

(ii) 接触法による脂質 2 重膜の形成

ここでは、リポソーム形成の初段階として重要な脂質 2 重平面膜を安定して再現性良く形成する方法について検討した。脂質 2 重平面膜の形成法の歴史は長い。テフロンシートに 100 ミクロン程度の孔を針で開け、そこに膜を形成する「はけ塗り法」などは一般的である。その一方で、膜形成は熟練したノウハウによるものが多く、自動化が困難であった。そこで、ここでは微小溶液の操作や並列化が得意なマイクロ流体デバイス技術を利用した方法を考案した。すなわち、水と油（有機溶媒）の界面にできる脂質の単分子膜を接触させて 2 分子膜を形成する「接触法」である。この方法の概要を図 2 に示した。まず、有機溶媒中に脂質を分散させる。そこに水滴を導入する。脂質は、親水基と疎水基からなるため、水と有機溶媒との界面には脂質の単分子膜が形成される（図 2 左）。こうした水滴を 2 つ用意し、双方をマイクロ流体デバイス内で動かし接触させることで、脂質 2 重膜を再構成できる（図 2 右）。実際、交差する 2 つのマイクロ流路の上下方向に脂質を含む有機溶媒、左右の流路に水溶液を導入し、それらをシリンジポンプで中心部に押し出すことによって、左右の水溶液が接触し 2 重膜が安定してできることが分かった。

(iii) マイクロジェット法（シャボン玉法）

次に、上で紹介した接触法で形成した脂質 2 重膜にジェット流を当て、膜を球状に変形させる方法（シャボン玉法）を検討した。接触法では、大きな水滴を用いると、数ミリ程度の大きさまで膜を形成することができる。このシャボン玉法では、まず先端直径を約 60 ミクロン程度に加工した微小ガラス管を近づける。ガラス管は電磁弁を介して圧縮空気ポンプに接続した。ガラス管の先端から数センチの部分は、ベシクルに内包したい水溶液を満たしておく。膜の近くで一気に電磁弁を数 ms 幅で開くことで、ポンプの圧力により水溶液が押し出されジェット流を発生させた。この流れによって、膜が変形し、ちょうどシャボン玉ができるように球状の膜を作成することに成功した（図 3）。電磁弁の開閉幅、ノズルと平面膜との距離、および、ジェット圧などを制御することによって、直径を揃えることができるようになった。

(iv) 脂質膜チャンバ形成法

ここでは、上に提案した接触法を利用して並列に脂質 2 重膜を形成し、マイクロ流路内に設計し

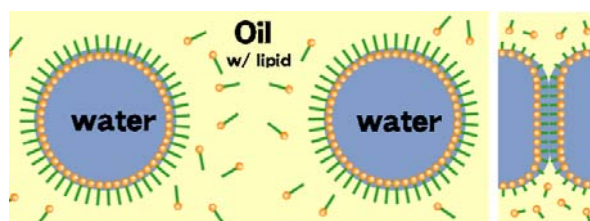


図 2：接触法による脂質二重膜形成の概念図。形成前（左）と後（右）。

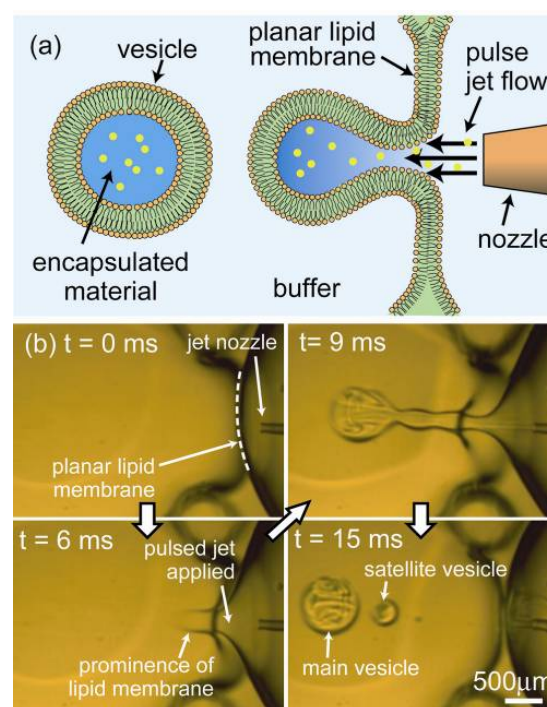


図 3：マイクロジェット法によるベシクル形成の様子。シャボン玉のように平面膜を変形させ球状の膜にすることによって、均一直径ベシクルによる効率的なカプセル化を行なえることを示した。

たマイクロチャンバを脂質膜で閉じる実験を行った。そもそもリポソームは、脂質膜で閉じられた閉空間であるため、チャンバの上を脂質膜で覆うことでリポソームと同様の実験が行えることに注目した。実際、図4のような流路を作成し、メイン流路に水溶液、有機溶媒、水溶液を導入することで、凹部を脂質膜で覆うことができた。これが2重膜であることは、(3)で述べる、透過実験によって明らかになった。



図4: マイクロチャンバの出口付近に脂質膜を形成した様子。接触法を応用し、水、有機溶媒、水を交互に流すことによって、安定して大量に膜を形成できることがわかった。

(2) リポソームのハンドリングおよび固定化法

上記のマイクロジェット法で、所望の物質が内包された均一直径のベシクルが形成できるようになれば、次の段階として、マイクロアレイ化し、ベシクルを介した輸送や、内部でのタンパク質発現機構の解析などを高速で行なうハイスループットスクリーニングへの展開が期待できる。たとえば、まずランダムに配列を調製したDNAをベシクルに内包し、そこから膜タンパク質を発現させる。それらのベシクルをアレイ状に配置し、薬剤を導入する。その結果、いくつかのベシクルの薬剤輸送が観察された場合、膜には、特異的なトランスポーターが発現している可能性が高い。そこで、そのベシクルを実験後に取り出し、発現しているタンパク質や内包されていたDNAの配列を明らかにすることで、どのようなタンパク質が輸送に関わっていたのか知ることができる。このような実験を可能にするマイクロアレイとして、図5のようなデバイスを考案した。図5ABのように直線の流路とそれを迂回するような流路が交差したマイクロ流路を設計し、それぞれの流路抵抗を調整することで、対象物を効率的に捕捉できる。すなわち、図5AのPath1の流路抵抗よりもPath2のほうが大きく設計しているため、最初に粒子は、Path1を通るが、途中で狭窄しているため、トラップされる。Path1に粒子がトラップされると、抵抗はPath2の方が下がり、後続の粒子は、Path2を通過する。さらに、図5Bのようにトラップされている位置に、金属薄膜をパターンしておけば、この薄膜に光ピンセットのレーザーを照射することによって泡を発生させ、対象物を押し出すことができる。流れが緩やかな場合は、光ピンセットで直接粒子を捕獲し、Path2の流れに押し出すことも可能である。こうして押し出された粒子は、下流で捕獲できる。これまでのマイクロアレイは、観察スポットが固定化されたものが一般的であったが、このアレイは、実験中にスポットの位置を変

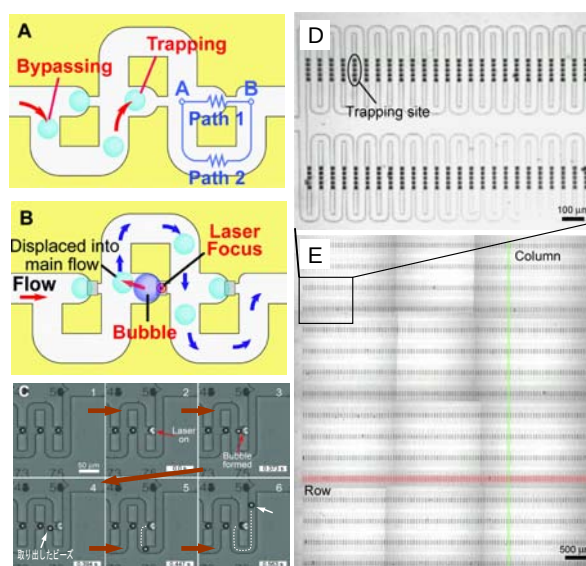


図5: 均一直径の物体の固定および選択的に取り出しに適したダイナミックマイクロアレイ。

化できるため、「ダイナミックマイクロアレイ」と名づけた。実際、この流路を利用して、これまでに、1 万個レベルのビーズや細胞を高速でアレイ化し、生化学実験後に、アレイの中から一つだけビーズを回収できるようになった(図 5C,D,E)。

(3) 計測評価

(i) 脂質膜のチャンネル電位計測

接触法は、膜形成の再現性も良いため、多チャンネルの膜形成も可能になってきた。複数同時に膜形成が行なえれば、そこに複数種の膜タンパク質を導入し、同時に多くの機能解析を行なうことができる。膜タンパク質の機能計測のうち、イオンチャンネル電流計測は比較的簡単に行うことができる。実際、接触法により形成した膜に、チャンネル性の膜タンパク質などを導入し、膜の両端にかかる電圧を固定した条件でのイオンチャンネル電流の計測に成功した。実験では、膜タンパク質の中でも、比較的分子量が小さい α -ヘモリシンなどを利用した。これらは、多量体化によりナノポアを形成し、チャンネル電流を発生させる。実際の膜タンパク質の再構成は、一般的に膜融合法が用いられる。これは、膜画分やリポソーム中に精製した膜タンパク質を平面膜上にばら撒くことによって融合をさせる方法である。この融合により、スパイク状のチャンネル電流を計測できることが分かってきた。また、これらの方法を利用して多チャンネル膜形成用のデバイスを製作し、実際に接触法によって形成された膜から、図 6 ようにペプチドなどのイオンチャンネル電流を複数同時に計測できることが分かった。

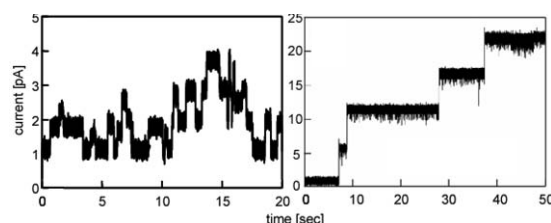


図 6:再構成された脂質二重膜から計測されたイオンチャンネル電流。グラミシジン A (左) と α -ヘモリシン (右)。

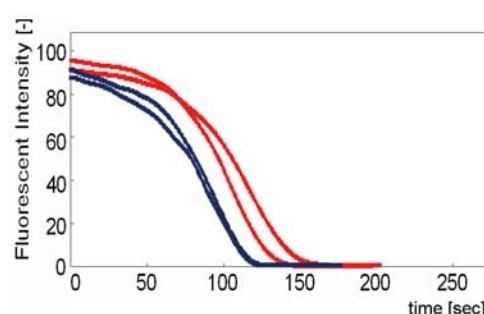


図 7:膜チャンバによる膜を介した透過の評価実験結果。

(ii) 透過実験

(1)の(iv)で作成した、膜チャンバに α -ヘモリシンを導入し、膜透過実験を行うことに成功した。カルセインを閉じ込めたチャンバに脂質膜を形成後、 α -ヘモリシンの混入した水溶液を導入した。すると、膜形成に成功した各チャンバから、膜を通してカルセインがメイン流路へと拡散する様子が観察された。図 7 は、各チャンバの輝度変化をグラフにしたものである。青線と赤線は、ヘモリシンの濃度を 1 mg/mL および 1 μ g/mL に変化させた場合の結果である。各々の条件で 2 つのチャンバから計測したものをグラフにした。濃度が濃くなるにつれ拡散速度が上がっている様子から、膜にヘモリシン(膜タンパク質)が再構成されたことがわかる。ここから、(1)の(iv)で考案した方法によって形成した膜は、確かに脂質 2 重膜であること、また膜チャンバ法がトランスポーターなどの非イオンチャンネル型膜タンパク質の機能解析に有用であることが示唆された。

5. 自己評価

本研究を通じて、均一直径のリポソームを生成する場合、微小流体の特性を活かすマイクロ流体

デバイスを利用した方法が適していることを示すことができた。接触法による脂質 2 重膜の形成は、安定して再現性のよい膜形成法であった。また、そこからシャボン玉のように球体膜を形成する方法は、効率的なカプセル化を実現するための有効な手段であった。ここで形成した脂質 2 重膜に簡単な膜タンパク質を導入し、機能活性を計測することができた。当初の目標である、単一直径リポソームの形成およびアレイ化に関して、マイクロ流体デバイス技術を利用することで一つの解決策は見出せたと考えている（一部の成果は非公開）。膜タンパク質の導入に関しては、比較的分子量の小さい α ヘモリシンを用いて実験を進めることはできたが、実際に創薬に関連しているイオンチャンネルやトランスポーターなどへの適用は、今後の課題である。本研究によって提案された様々な技術が、創薬スクリーニングのみならず、超高感度センサや DDS、食品、化粧品産業など様々な分野への要素技術として展開可能であると確信している。

6. 研究総括の見解

細胞の内外の物質輸送に重要な役割を果たしている膜タンパク質に関する機能解析法の研究である。膜タンパク質を含んだ直径の等しいリポソームの作成とこれをアレイ状に基板に固定する技術の確立を目指した。主たる成果は次の 2 点である。

- ①均一径リポソームを作成するエレクトロフォーメーション法、接触法による脂質 2 重膜形成法、脂質 2 重膜を球状にするマイクロジェット法などリポソーム形成の基本技術の開発に成功した。
- ②マイクロ流路中のチャンバに脂質 2 重膜を形成しリポソームと同様の実験を効率的に行うことができる脂質膜チャンバ形成法、1 万個以上のリポソームを測定基板の任意の位置に高速で輸送するダイナミックマイクロアレイ技術、接触法によって形成した膜によるイオンチャンネルの複数同時計測技術などマイクロ流路技術を活用した実用技術開発に成功した。

また、脂質膜チャンバ形成法で作成した脂質膜に膜タンパク質を導入してカルセインの膜透過実験を試み、解析結果から脂質 2 重膜の形成を確認している。

これらの成果は 5 篇の原著論文、6 件の学会招待講演にまとめられている。また、平成 20 年度文部科学大臣表彰・若手科学者賞を受賞している。

独創的なリポソームアレイによる膜タンパク質の機能解析法を発想し、MEMSを巧みに利用して均一径リポソームの作成技術を完成させ、計測分析への可能性を提示したことは高く評価される。今後は、幅広い専門分野の方々と共に用途別の課題に取り組むことも必要となる。次世代の治療、創薬法、あるいは生体イオンセンサー開発などへの波及効果はきわめて大きい、幅広く利用される基盤技術としてぜひ発展させて頂きたい。

7. 今後の展開

本研究では、実用的な膜タンパク質に関しての検討までにいたらなかったが、今後は、実際に創薬支援企業などと連携することによって、実用的なデバイスとしての検討を重ねる予定である。創薬や高感度センサに利用する膜タンパク質としては、イオンチャンネルや薬剤トランスポーターなどが注目されているが、これらを人工の脂質 2 重膜へ導入し、計測を行っている研究は最近盛んに行われ出している。現在はシングルチャンネルでの計測が主流であるが、今後ここで提案したマ

ルチチャンネル計測法を利用できる可能性は大いにある。

8. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

- ・ .Kei Funakoshi ,Hiroaki Suzuki, Shoji Takeuchi, “Lipid bilayer Formation by Contacting Monolayers in a Microfluidic Device for Membrane Protein Analysis”, Analytical Chemistry, vol. 78, pp. 8169–8174, 2006
- ・ W-H. Tan and Shoji Takeuchi, “A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 104, no. 4, pp. 1146–1151, 2007
- ・ Kei Funakoshi ,Hiroaki Suzuki, Shoji Takeuchi, “Formation of giant lipid vesicle-like compartments from a planar lipid membrane by a pulsed jet flow”, J. Am. Chem. Soc., vol. 129, issue 42, pp. 12608–12609, 2007

(2)特許出願 なし

(3)受賞

- ・ 平成 20 年 4 月 平成 20 年度文部科学大臣表彰・若手科学者賞受賞

(4)著書

- ・ 竹内昌治, “生体分子モーターデバイス”, バイオセンサーの先端科学技術と応用(民谷栄一監修), CMC 出版, pp. 92–97, 2007
- ・ 竹内昌治, “リポソームアレイ, マイクロ・ナノ化学チップと医療・環境・バイオ分析(北森武彦監修)”, 技術教育出版社, 2008
- ・ 竹内昌治, “バイオアクチュエータ”, 次世代センサーハンドブック(藍光郎監修)培風館, pp. 440–443, 2008

(5)学会発表

口頭発表(国際)

- ・ W. H. Tan and S. Takeuchi, “An optical retrieval microfluidic system for microarray applications”, microTAS2006, vol. 1, pp. 509–511, 2006
- ・ K. Funakoshi, H. Suzuki, S. Takeuchi, “Blowing Vesicle: a Simple Method for Direct Microencapsulation in Lipid Vesicles”, microTAS2006, pp. 534–536, 2006
- ・ Sadao Ota, Wei-Heong Tan, Hiroaki Suzuki, and Shoji Takeuchi, “Microfluidic Formation of Lipid Bilayer Array for Membrane Transport Analysis”, MEMS2008, pp.18–21, 2008

ポスター発表(国際)

- ・ K. Kuribayashi, B. L. Pioufle, S. Takeuchi, "Hydrodynamic Manipulation and Selective Immobilization of Giant Liposomes", microTAS2006, pp. 1534-1536, 2006
- ・ Kaori Kuribayashi, and Shoji Takeuchi, "Electroformation of Solvent-Free Lipid Membranes over Microaperture Array", MEMS2008, pp.296-299, 2008

(6)招待講演

招待講演(国際)

- ・ Shoji Takeuchi, "Membrane Protein Chips", The Second International Symposium on Biomolecular Chemistry (ISBC2006), Kobe, 2006
- ・ Shoji Takeuchi, "Microfluidic technologies for membrane protein analysis", BioKOREA2007, Seoul, 2007
- ・ Shoji Takeuchi, "MEMS technology for Artificial Cells", IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science 2007, Nagoya, 2007
- ・ Shoji Takeuchi, "Dynamic Fluidic Microarray for Biological Cell Analysis", CIMTEC2008, Italy, 2008
- ・ Shoji Takeuchi, "Microfluidic Devices for Biochemical Applications", International Symposium for Young Organic Chemists (ISYOC2009), Tsukuba, 2009

(B) その他の主な成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

- ・ Bruno Le Pioufle, Hiroaki Suzuki, Kazuhito Tabata, Hiroyuki Noji, and Shoji Takeuchi, "Lipid Bilayer Microarray for Parallel recording of Transmembrane Ion Currents", Analytical Chemistry, vol. 80, pp. 328-332, 2008
- ・ H. Suzuki, B. Lepioufle, and Shoji Takeuchi, "96-well Parallel Ion Channel Recording Chip Fabricated by Hybrid Stereolithography", Biomedical Microdevices, vol. 11, pp. 17-22, 2009

(2)特許出願 なし

研究課題別評価書

1. 研究課題名

インフルエンザウィルスを計測・除去可能な「スーパー抗体酵素」

2. 氏名

一三三 恵美

3. 研究のねらい

抗体は免疫系の働きを担うタンパク質である。これまでの理解では、抗体は異物(抗原)を認識して結合することで他の免疫系を活性化し、これを除去するとされてきた。ところが 1990 年代になって、単独分子として酵素作用を示す抗体や抗体軽鎖(Bence-Jones protein)の存在が報告されるようになった。これらの多くは自己免疫性疾患の患者サンプルから精製した抗体(あるいは抗体軽鎖)である。我々はマウスに抗原を免疫して作製したモノクローナル抗体や抗体鎖にも抗原に対する特異的な分解活性を持つものが存在することを見出した。そして、これを「スーパー抗体酵素」と名付けて作製方法の確立を進めてきた。一連の研究では、完全抗体・重鎖・軽鎖の中では軽鎖型の「スーパー抗体酵素」の割合が高く、軽鎖型では抗原認識部位をコードしている遺伝子に特徴があることを見出した。具体的に述べると、ある特殊な V κ germline gene を持つ抗体鎖の場合に、酵素活性を示す確率が高くなると推定している。

これらの知見をもとに、本研究では2つの研究項目を柱にインフルエンザウィルスを特異的に計測・除去する性能を持つ「スーパー抗体酵素」の作製に取り組んだ。第1の項目は、全ての A 型インフルエンザウィルスに対して効果的な「スーパー抗体酵素」を作製すること、第2の項目は、酵素活性作用のメカニズムを解明するとともに、酵素活性を向上させて、実用に近い「スーパー抗体酵素」を作製することである。

4. 研究成果

(1) A 型インフルエンザウィルスに対する「スーパー抗体酵素」の作製

「スーパー抗体酵素」の作製方法としては、これまでの研究結果から最も効率的であると考えられる方法、すなわち、先ず標的分子に対する特異的なモノクローナル抗体を作製し、その中から着目する遺伝子(V κ germline gene)を持つものを抽出する方法をとった。

A型インフルエンザウィルスを計測するために、ウィルス表面に存在するタンパク質を認識する抗体を得る必要がある。A型インフルエンザ

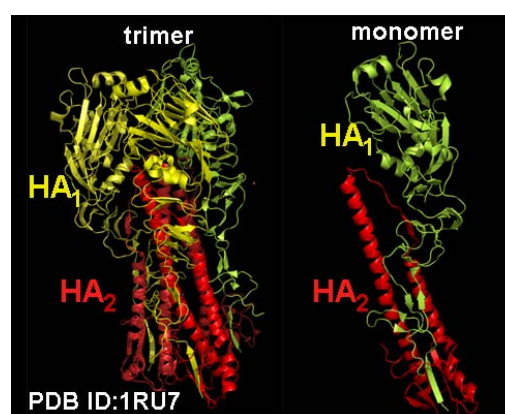


図1 インフルエンザウィルス H1 型ヘマグルチニンの構造, 左: 三量体, 右: 単量体

ウィルス外膜上のヘマグルチニンはHA₁(図中黄で示した)とHA₂(図中赤で示した)の2つのサブユニットから成る三量体として存在している。

ウィルスの場合、外膜タンパク質としてHemagglutinin(HA)とNeuraminidase(NA)の 2 種類が存在しており、本研究ではウィルスの感染時に主要な役割を担うHAを標的とした。このHAは、HA₁とHA₂の2つのサブユニットから成る分子で(図 1)、16 種類(H1～H16)の亜型が存在する。そこで、Flu database(NCBI)に登録されている配列データを用いて各亜型のconsensus配列を抽出し、亜型間の相同性と立体構造を考慮して 4 種類の抗原を用意した。まず初めに、HA₁サブユニットとHA₂サブユニットのそれぞれについて、H1 からH16 の亜型間で保存されている配列を選び、これを繋いだ 19 merのペプチド(IH peptide)を合成してペプチドハプテンとした。次に、これまでに大流行を起こしたH1 型(スペイン風邪)、H2 型(アジア風邪)、H3 型(香港風邪)と鳥インフルエンザのH5 型の間で高度に保存されている配列を選び、それぞれのペプチド(InfA, InfB, InfC peptide)を合成してIH peptideと同様にペプチドハプテンとして用いた。

これらの抗原を Balb/c マウスに免疫すると、InfA peptide >> InfB peptide > IH peptide の順で抗ペプチド抗体が誘導された。特に InfA peptide は、タンパク抗原に匹敵する強さでペプチド特異抗体を誘導するという大きな特徴があった。そこで、IH peptide 免疫マウスと InfA peptide 免疫マウスについて PEG 法による細胞融合を行い、前者からは 3 種類(IHB1, IHB2, IHK)、後者からは 6 種類(InfA-3, -6, -9, -10, -15, -18)のモノクローナル抗体産生細胞株を樹立した。

続いてこれらの抗体について可変領域のアミノ酸配列を解析し、Ig BLAST(NCBI)による相同性検索によって V_K germline gene を推定するとともに、分子モデリング(ソフトウェアは AbM, プラットフォームは SG 社のワークステーション Octane2)によって立体構造を予測した。各抗体軽鎖の V_K germline gene を表 1 に示した。これらの中で着目する遺伝子型を示したのは、InfA-3, -6, -9, -10 および-15 抗体の 5 種類であった(表 1)。

各抗体の免疫学

的反応性を調べる

と、IHシリーズでは

IHB1 抗体がH1N1

型ウィルスのHAに

弱く反応したものの、

H3N2 型ウィルスに

は反応しなかった。

一方、InfAシリーズ

については、InfA15

抗体がH1N1 型ウィ

ルスとH3N2 型のウ

ィルスHA(HA₂サブ

ユニット)に反応し、

他の 5 種類の抗体

は H1N1 型の HA

(HA₂サブユニット)

表 1 各抗体軽鎖が属していた V_K germline gene

clone	IHB1	IHB2	IHK, InfA-18	InfA-3, 6, 9, 10	InfA-15
V _K germline	ce9	19-23	8-21	cr1	bl1

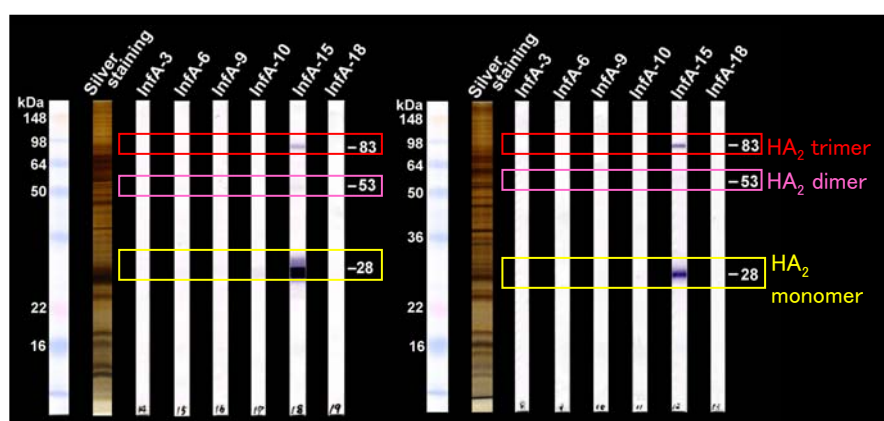


図 2 InfA 抗体のインフルエンザウィルスに対する反応性
左: H1N1 型ウィルスに対する反応性, 右: H3N2 ウィルスに対する反応性

InfA15 抗体は H1N1 型ウィルスHA, H3N2 型ウィルスHAの両方に反応し、その他の抗体は H1N1 型ウィルス HA にのみ弱く反応した。

にのみごく僅かに反応した(図 2)。

A 型インフルエンザウィルスの HA は、構造の特徴から系統的に H1 グループと H3 グループに分けられ、H2 型と H5 型は H1 グループに含まれる。HA に対するモノクローナル抗体では両方のグループに渡って反応するものの報告は無く、InfA15 抗体は特徴的な反応性を有していた。ウィルスの取扱い規制により H2N2 型ウィルスに対する反応性を調べることは出来なかった。しかし、H2 型は H1 型との相同性が最も高く、InfA15 抗体は recombinant の H5 型 HA とも反応することを確認しているので、本抗体は重要なウィルスの全ての型に反応するものと考えている。

一方、超高感度カロリーメーターで抗原に対する親和性を測定すると、InfA15 抗体は他の抗体と比較して抗原ペプチドに対する親和性が1桁低いことが分かった。このことが、免疫に用いたペプチド抗原のみならず、タンパク抗原との反応も可能にしたのであろう。

この InfA15 抗体については、完全抗体・重鎖・軽鎖について酵素活性の検討を進めており、予備的な段階ではあるが良好な結果を得ている。

(2)「スーパー抗体酵素」の活性向上

当初は、新規な「スーパー抗体酵素」の作製と並行して、既已取得している「スーパー抗体酵素」を精製抗体から調製し、高い酵素活性を発揮させるための条件の絞り込みを進める計画であった。しかし、研究環境の変化により、十分量の抗体を得るために必要となるマウス大量飼育が困難になった。大腸菌を用いる発現は以前から手掛けていたテーマではあったが、機能する形で十分量の抗体鎖を得ることには成功しておらず、加えて、将来的には遺伝子工学的な抗体タンパクの改変も必要になることから、本格的に大量発現系の検討に入った。

発現用ベクターは 2 種類使い、発現の形態も軽鎖完全長に His-tag を付けものと、さらに Protein A-tag を付加した形の 2 通りを試した。遺伝子は InfA15 抗体軽鎖(InfA15L)を用いた。

InfA15L 遺伝子、もしくは InfA15L-ProteinA 遺伝子を組み込んだ発現用プラスミドベクターを使って、大腸菌 BL21(DE3)pLysS(Novagen)を形質転換した。それぞれについて複数のコロニーを拾い、各コロニーの発現量を比較しながら培養条件を最適化した。その結果、抗体鎖単独、ProteinA 付加分(InfA15L-ProteinA)ともに、培養液 1 mlあたり約 40 µg を可溶化した状態で発現させることが可能となった。

次に、より高い発現効率を示した InfA15L-ProteinA について、培養スケールを拡大して調製を進めた。まず、培養液から大腸菌を回収して、菌体を破碎後、可溶性画分を調製した。InfA15L-ProteinA の精製は、抗体(マウスまたはウサギ製)をリガンドとするアフィニティー精製により実施した。これは、リガンドとして用いた抗体の Fc 部分と発現タンパクの ProteinA 部分との特異的な結合を用いる方法である。これにより 200 mlの培養液から約 10 mg(濃度 1.5 mg/ml)の発現タンパク質(recInfA15L-ProteinA)を得ることが出来た。完全抗体から軽鎖を分離・精製する従来法と比べると、1 回の調製で得られる抗体鎖は濃度・量ともに 10 倍以上、向上した。

酵素免疫測定法によって、精製した recInfA15L-ProteinA の免疫学的反応性を、抗体や抗体から分離・精製した InfA15 抗体軽鎖と比較した。図 3 に示すように、InfA15 抗体軽鎖の抗原ペプチドに対する反応性は検出限界以下であったのに対し、recInfA15L-ProteinA は抗原ペプチドとも反

応し、これと同等の親和性で組み換え H3 型 HA(recH3/HA)とも反応した。従来の方法では完全抗体から分離した抗体鎖を変性条件下のサイズ排除クロマトグラフィーによって精製するので、変性過程を経ずに調製した recInfA15L-ProteinA の方が、より高い免疫学的反応性を発揮したものと考えている。

recInfA15L-ProteinA についてはさらに精製度を上げるための第二段階のアフィニティー精製システムを構築中である。

参考文献

1. Paul S et al., *Science*, **244**,1158(1989)
2. Shuster AM et al., *Science*, **256**,665(1992)
3. Matsuura K et al., *Biophys. Res. Commun.*, **204**, 57-62(1994).
4. Paul S et al., *J. Biol. Chem.*, **270**, 15257(1995)

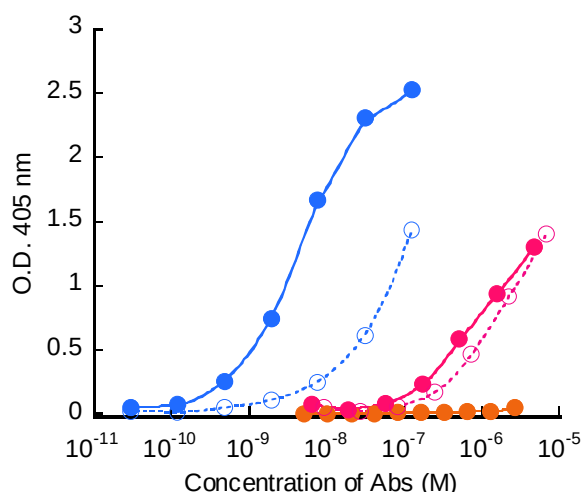


図3 InfA15 抗体および軽鎖の免疫学的反応性

- : 完全抗体の抗原ペプチドに対する反応性
- : 完全抗体の recH3/HA に対する反応性
- : recInfA15L-proteinA の抗原ペプチドに対する反応性
- : recInfA15L-proteinA の recH3/HA に対する反応性
- : InfA15L (抗体から調製) の抗原ペプチドに対する反応性

【謝辞】

本研究を進めるにあたり、インフルエンザウィルスの取扱いについてご指導・ご協力頂きました大分大学医学部・西園晃教授、広島県総合技術研究所保健環境センター・高尾信一博士に厚く御礼申し上げます。

5. 自己評価

1996 年に所有していたモノクローナル抗体の軽鎖が抗原特異的な分解活性を持つことを見出し、以来、『狙ったタンパク質を特異的に分解する「スーパー抗体酵素」』を作製するための手法の確立に取り組み、遺伝子型に着目して酵素活性を示す抗体鎖を抽出するという現在の方法を見出した。この考え方に基づいて酵素活性の検討はまだ不十分であるものの、特徴的な反応性を示す InfA15 抗体 (軽鎖) を得た。研究目標の 1 つの柱であった「A 型インフルエンザウィルスに対するスーパー抗体酵素」の作製については、おおむね目標を達成したと考えている。

一方、「スーパー抗体酵素」の活性と構造の関係については、計画を変更せざるを得なかった事情もあり、材料の調製方法の確立に留まった。しかし、完全抗体から抗体鎖を分離・精製する従来法と比較して、原材料の調製期間が 10 分の 1 になり、収量は絶対量、濃度ともに約 10 倍向上した (濃度はまだ上限に達してはいない)。tag として ProteinA を共発現させたことで、結果的に軽鎖を可溶化した状態で安定に保つことが出来たものと考えている。

免疫学的に機能する構造を取った状態で mg/mL オーダーの抗体鎖を得たことの意義は大きく、当初の目的であった活性や構造の検討に本格的に着手する環境が整った。

6. 研究総括の見解

抗体でありながら抗原を特異的に分解する「スーパー抗体酵素」の創製を目指す極めて独創性の高い研究である。インフルエンザウィルスを標的とし、酵素性を有する抗体の系統的な導出に挑戦した。主たる成果は次の2点である。

- ①インフルエンザウィルスのHA抗原のコンセンサス配列を基にいくつかの抗原モデルを見出し、A型インフルエンザウィルス全般に反応可能な抗体酵素の導出に成功した。
- ②抗体酵素を大量に取得できるベクターを見出すとともに、これを用いた大量発現系により抗体酵素の効率的調製法を確立した。

また、上述のように抗体酵素-インフルエンザウィルスの反応性を確保するとともに、軽鎖の特殊な配列から酵素活性の高い抗体酵素を選択するプロセスを創案し、これにも予備的な見通しを得ている。

これらの研究成果は1篇の原著論文、1件の学会招待講演にまとめられている。

免疫工学、タンパク質工学、遺伝子工学的手法を駆使して、数多くの試行錯誤から広範囲のインフルエンザウィルスに対応できる抗体酵素を作成したことは高く評価できる。また、新しいベクターにより研究開発を加速するなどの基盤技術を着実に蓄積する努力も高く評価できる。近年大きな話題となっているエイズウィルス、ピロリ菌なども対象とする研究であり、実現した場合、科学技術のみならず産業へ与えるインパクト、また日本発の「分析試薬」として意義は大きいと考えられる。今後、酵素活性のメカニズムを明らかにする研究をさらに深化させ、この成果が「スーパー抗体酵素」に結実することを強く期待する。

7. 今後の展開

さきがけ研究以前には、様々なスーパー抗体酵素の作製に取り組んできたものの、抗体酵素そのものを大量に得ることが出来なかったことに加え、病原性の細菌やウィルスの取り扱いに制限があったため、酵素活性の評価を *in vivo* に近い状態で行うことは困難であった。本報告書には記載していないが、研究期間中に recombinant HA タンパクの発現系の構築と、インフルエンザウィルスを使う実験系を立ち上げることが出来たので、これまでより一歩進んだ *in vivo* に近い実験系を用いる酵素活性の評価が可能となった。実用に近い条件で酵素活性を評価しながら、活性を向上させるための条件検討を行い、構造解析に着手したいと考えている。

また、今回免疫に用いた InfA peptide は非常に高い抗体誘導能を持っていた。得られた抗体には H1 型と H3 型のウィルス HA と反応するものが含まれていたことから、このペプチド配列をもとにワクチン化を視野に入れた抗原設計を進めて行きたい。

8. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国内)

- ・ 一二三恵美, 宇田泰三, “酵素活性と抗体機能を持つ分子ナノマシン アンチゲナーゼ”, 現代化学, No.8, 43-50(2007)

(2)特許出願

発 明 者:一二三 恵美, 宇田泰三
発明の名称:抗原ペプチドおよびその利用
出 願 人:科学技術振興機構
出 願 日:2007 年 7 月 18 日
出 願 番 号:特願 2007-187324

(3)学会発表

口頭発表(国内)

- ・ 一二三恵美, 吉田沙希, 宇田泰三, “インフルエンザウィルスの hemagglutinin に対するスーパー抗体酵素 (Antingease)”, 第 17 回バイオ・高分子シンポジウム, 2007

ポスター発表(国際)

- ・ Emi Hifumi, Kyoko Yamahiro, Shin-ichi Takao, Taizo Uda, “Antigenases (catalytic antibody subunits) cleaving hemagglutinin of influenza virus-type A”, The 21st European Conference on Biomaterials, 2007

(4)招待講演

招待講演(国内)

- ・ 一二三恵美, “アンチゲナーゼの機能と応用”, 第 3 回産業用酵素シンポジウム, 2008

(B) その他の主な成果

なし

研究課題別評価書

1. 研究課題名

電子増強振動分光法の開発と応用

2. 氏名

由井 宏治

3. 研究のねらい

振動分光法は分子骨格や置換基レベルでの構造・環境情報を鋭敏に反映するため、化学の分野ではもちろんのこと、材料や生物の分野でも必須な計測・分析ツールとなりつつある。近年とりわけ細胞中の生体関連分子や、水中における材料表面における化学種や水そのものの構造・状態分析が求められているが、水系試料の計測に適したラマン散乱は、赤外吸収に比べて信号が 10^{-10} 倍程度と大変微弱であり、一般にはさほど普及していないのが現状である。しかし今後の生命科学や環境・材料化学において、類似の化学種を識別できる振動分光法の重要性は一層増すことは違いなく、ラマン散乱の信号増強法の開発が強く望まれている。しかしその増強法としては、1974年に報告された、特殊処理した金属表面で観測される表面増強ラマン効果(SERS)があるのみで、しかもその適用は金属表面の吸着分子に限られていた。本研究では、電子のもつ局所電場を利用した新たなラマン増強法の開発と応用をねらいとする。特に研究期間中は、大変重要でありながらSERSでも信号増強効果の得られない不均一環境の水分子をその測定対象の中心に据えた。また将来における水中の生体関連物質や材料表面の化学種分析への応用も目指し、信号の取得に時間が要求される既存の偏光変調赤外振動分光手法への適用も検討した。また電子による信号増強機構そのものについてもより知見を深め、総合的な電子増強振動分光法の応用にむけて、その基盤を築くことを本研究のねらいとした。

4. 研究成果

1. 電子増強機構の検討

水中の固体ナノ粒子をパルスレーザーで誘電破壊させてプラズマ化した際、周囲の水分子のラマン散乱が特異的に強く観測され、この増強に水中に過渡的に多量発生した電子が寄与していることを突き止めたのが本研究の発端である[*Phys. Rev. Lett.* **85**, 3512 (2000)]。しかし、電子増強機構と表面増強ラマン散乱(SERS)機構との類似点や相違点はこれまで不明であった。そこで、電子増強効果のより詳細な描像を得るため、信号増強時の過渡的なラマンスペクトルの変化を時間分解分光により追跡した。その結果プラズマ再結合輻射が観測される前に本増強効果が観測されていることから、電子がLUMOに入り安定なアニオンを形成した後の現象ではなく、電子がまだ高い運動エネルギーをもって液体中を拡散しながら電子親和力の高い置換基と相互作用した結果、置換基そのものの分子分極率が飛躍的に増加し、ラマン散乱や赤外吸収の過渡的な増強に至っていることが判明した。すなわち、表面増強ラマン効果の化学機構(金属から分子への共

鳴的電子移動)のように、分子全体がアニオン化されているわけでもなく、また物理機構のように励起光電場が局所的に増大しているわけでもない。本増強効果は、電子が電子親和性の高い置換基そのものの固有の分子分極率を高めている点で、従来の表面増強ラマン効果の物理機構や化学機構とは一線を画する第三の増強機構と考えられる。また液体中の水分子の代表構造である5員環、6員環水素結合ネットワークモデルを用いて、中性のものと電子を付加させたもので電子の広がりを考慮して理論計算し、ラマン散乱活性ならびに赤外吸収活性を比較した(図1、表1)。実験の波数シフトを良く再現した6員環のモデルでは、電子付加により赤外・ラマンともその活性が $10^2 \sim 10^5$ 倍近く、直接OH基に結合すると、最大で 10^7 倍程度まで増強すると見積もられた。

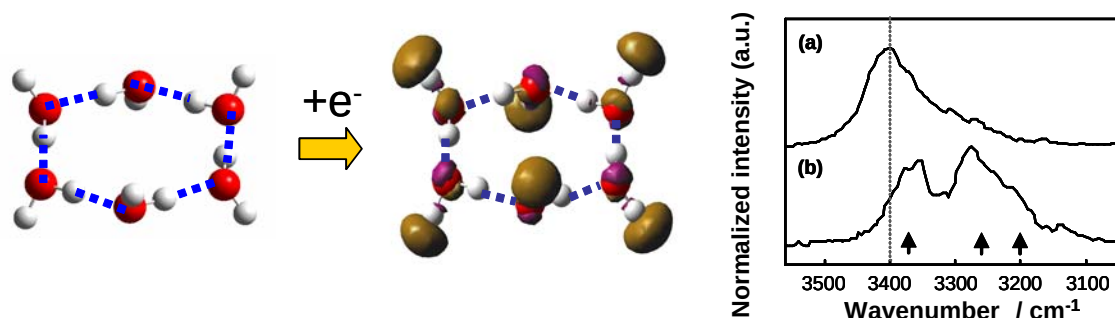


図1 電子付加に伴う水分子6員環構造と電子付加による実測のスペクトルの特徴的变化。電子は水素結合していないフリーなOH基を好んで局在化する傾向があり、その場合、通常の水のスペクトル(右図(a))には見られない特徴的な3つのピークが観測されることが分かる(右図(b)中矢印)。

表1 電子付加に伴うラマンならびに赤外活性の増強度比較

Wavenumber (cm ⁻¹) and assignment	Raman E.F.*	IR E.F.*
3800** OH stretching (free)	2.4×10^2	4.9×10^3
3400*** OH stretching (Hydrogen-bonded)	2.0×10^2	1.2×10^3
1600 Intermolecular Scissoring	2.7×10^3	5.6×10^2
600 Libration	2.4×10^3	7.7×10^2
200 Intramolecular stretching	3.9×10^4	9.4×10^2
60 Intramolecular scissoring	2.3×10^4	2.7×10^3

*E. F. : Enhancement factor compared to the band intensity of neutral species.

** Average of the wavenumber region from 3640 cm⁻¹ to 4000 cm⁻¹

*** Average of the wavenumber region from 3000 cm⁻¹ to 3620 cm⁻¹

2. 電子増強ラマン分光法の不均一界面への応用

金属/水界面は電気化学、触媒化学、環境化学などで大変重要な反応場であり、吸着化学種の置換基レベルにおける構造・環境変化を追跡できる振動分光法の適用が広く望まれている。しかし表面増強ラマン効果では金属表面における吸着水分子のラマン散乱は増強されず、その原因は未だ解明されていない。本研究ではレーザー誘起プラズマ生成法で金属と水の界面に電子を発生、電子増強ラマン効果を起こし、さらに誘導ラマン効果と組み合わせることで、水中における金属表面固有の水分子の電子増強ラマンスペクトルを取得することに成功した(図2)。さらにレーザーアブレーションで金属ナノ粒子を作るような環境を金属表面で創りつつ電子増強ラマン信号を取得したところ、これまで報告例のない400cm⁻¹おきの信号を観測した。真空中での電子エネルギー損失分光法(EELS)測定で金属表面に吸着している水クラスターと金属表面との直接的な水素結合が上記振動数を与えることが報告されているが、EELSは水中には適用できなかった。本

手法を用いることで、表面吸着水のクラスターと金属表面との結合に基づく振動モードを水中で初めて捉えることができたと考えられ、金属ナノ粒子生成極初期過程を考察する上でも興味深い。

3. 電子増強ラマン分光法の超臨界水中分析への応用

超臨界水は、高い輸送性能と高い媒質密度を利用した化学反応場として注目を集めている。特に近年では、超臨界中でプラズマを発生させ、高エネルギー状態を利用した新しい材料合成反応や環境浄化技術が注目を集めている。このような反応場の計測として、従来の NMR、XRD、IR など手法が試みられているが、極限的な熱力学的環境、プラズマ反応そのものの時間・空間的制限から、このような反応場のその場計測が不可能であった。そこで我々は電子増強ラマン分光法の適用を着想し、超臨界水中に生成したプラズマ(特に電子)と相互作用する水分子の振動スペクトルを取得することに初めて成功した(図 3)。その結果、超臨界状態になると水分子の密度が減少し、水分子同士の水素結合が切れはじめたことで、電子と水分子の相互作用が相対的により顕著になる現象が初めて実験的に見出された。さらに測定された波数シフトと理論計算の比較から、測定した圧力・温度条件では、電子が平均として水分子3個と相互作用していると見積もられた。

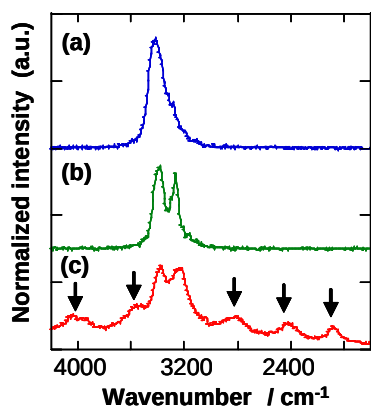


図2 不均一界面への電子増強ラマン散乱の適用。(a)バルク水中、(b)銀表面、(c)銀表面レーザーアブレーション条件。(c)における400cm⁻¹おきのピークが特徴的(図中矢印)。

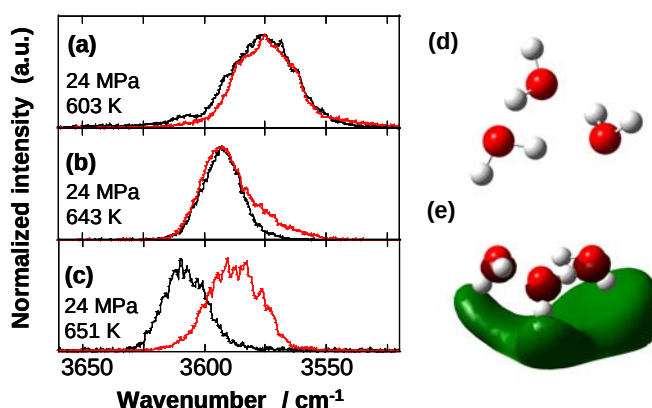


図3 超臨界水中での電子-水クラスターの増強ラマンスペクトル。(a)高温高圧水、(b)亜臨界水、(c)超臨界水。黒が通常の水のスペクトル、赤が電子と相互作用している水由来の増強スペクトル。超臨界で差が顕著に。(d)、(e)は(c)の黒線、赤線の波数を再現するモデル図。(e)の緑色の雲が電子の分布を表す。

4. 電子増強赤外分光法の不均一界面分析への適用

赤外吸収法はもともと高感度であるため、信号増強が分析化学的に意味をもつのは試料が特定の場所に局在して、かつ極微量であったり、測定原理から信号取得に大変な時間を要する場合等である。まず前者の例として大気中の金属表面に自然吸着している水分子を捉えることを目的とした。新しい電子供給法として高周波電源を用いたプラズマジェットの利用を着想し、大気中で金、銀、銅表面にプラズマジェットを照射し、自然吸着した水分子の増強振動スペクトルを取得した。大気中の三次元等方的な水蒸気成分をキャンセルするため、偏光変調反射光学配置を採用した(図4)。プラズマ照射前では有意なピークは観測されなかったのに対して、プラズマ照射数十分間で、いずれの金属からも吸着水に由来する有意なピークが観測された。スペクトルはバルク水や水蒸気とは異なり、銅を除いて低波数側に氷様のピークとして観測された。真空中での表面吸着水の計測例はあるものの、大気中では初めての測定となった。銅は金や銀とは異なりプラ

ズマ照射により表面が変色していたため、酸化銅表面への吸着水を捉えたものと考察した。

5. 電子増強赤外分光法の振動円二色性分光法(VCD)への適用

VCDはキラル分子の液体中における絶対配置だけでなく、立体配座も計測できる大変強力な可能性を秘めた分光手法である。しかし右・左回り円偏光の赤外吸収の差が通常の赤外吸収の 10^{-5} オーダーであるため、信号取得に数時間かかることは普通であり、生体反応などで重要な分子の動的過程の追跡には飛躍的な信号増強手法の適用が望まれる。そこで電子増強分光法のVCDへの適用を着想した。しかし研究を始めて、VCDは剛直な骨格をもつごく一部の分子でしか理論と実測が一致しないことが判明した。理論計算と一致しない場合、スペクトルから立体配座を決定できず、増強信号が得られても目的の情報まで還元できない。そこでまずVCD自体の適用範囲を拡張するため、自由回転するOH基を有する(-)-メントールを試料として、実験・理論両面から検討し、OH基の立体配座の違いがスペクトルパターンに劇的な影響を与えることを見出した。さらにOH基の回転に伴う各種の立体配座をボルツマン分布で重みづけし、その線形結合を取ることで実測と理論の一致度合いを大幅に改善することに成功し(図5)、従来のVCDの適用範囲を、構造が柔軟な分子へ拡張する道を拓いた。現在は新しい電子供給法としてインドールなど電子を放出し易い分子の添加と、ランプによる紫外光励起を組み合わせた方法を検討している。

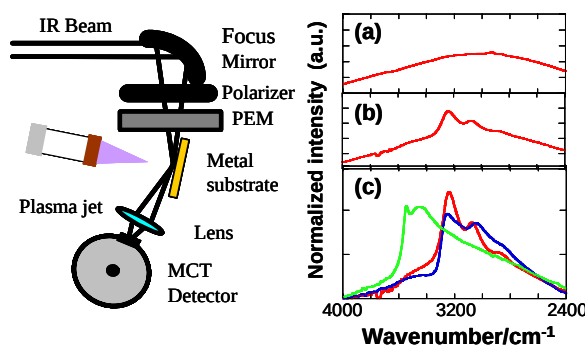


図4 偏光変調反射吸収赤外分光光学配置とプラズマジェットによる電子供給実験。(左図)装置の配置図。光弾性変調器(PEM)で高速に直交する偏光成分を生み出し差分を取ることで、水蒸気成分を除去。(右図)金表面のプラズマ照射(a)前、(b)20分後のスペクトル。(c)金属による違い。金(赤)、銀(青)、銅(緑)。

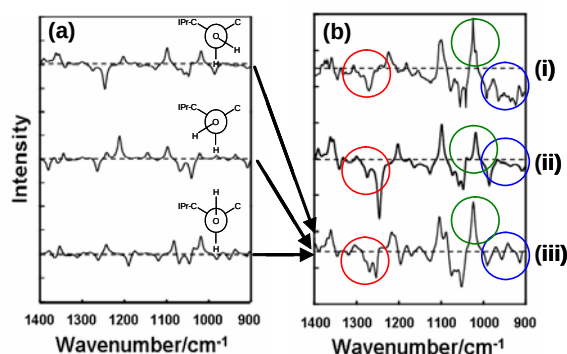


図5 (a) OH基の立体配座を変化させた場合のVCDスペクトルの変化と、(b) Boltzmann分布に基づく重みづけによる実測スペクトルと理論計算結果の一致度合いの改善。(i)実測。(ii)単一成分による解析。(iii)重みづけ解析。例えば赤、緑、青丸をつけたところなどを参照にされたい。

5. 自己評価

本研究では、総合的な電子増強振動分光法の開発として、以下の3つの目的を掲げた。

- (1)これまで見出された電子増強ラマン効果を実際の系に応用し、その有用性を検証する。
- (2)理論的に予測された電子増強赤外吸収効果を検証し、従来の赤外分光法に適用する。
- (3)電子増強機構そのものをさらに詳細に検討し、特に表面増強ラマン散乱との違いを明確にする。

(1)については、表面増強ラマン散乱ではその効果の発見以来なぜか信号が取得できないことで良く知られていた水中における金属表面の吸着水の計測に成功した。また本手法を応用することでXRD、NMR、IRなどでは特に局所環境の測定が難しい超臨界水の過渡種の計測に初めて成功し、本手法の新規性や有用性を界面計測や、極限的環境下にある実サンプルで示すことがで

き、今後さらに応用例を増やす必要はあるものの、当初の目的はおおむね達成できたものと考えている。

(2)については、真空中では既に様々な優れた計測手法が多数存在するため、妨害の多い大気中での計測にこだわり、偏光変調技術なども導入して、従来、真空中でしか選択的な測定が難しかった金属表面の吸着水の計測に大気中で初めて成功した。また生体系に多いキラル分子の水中における立体配座測定に有望な VCD への適用も試みた。後者は、まだ発展途上中の VCD そのものの計測・解析手法の適用範囲を広げる、という思わぬ成果を得ることができた。装置開発からスタートしたため、時間を要したが、赤外分光法への適用への道も拓けた点で、おおむね目標は達成されたものと考えている。

(3)については、増強したラマン信号そのものの高時間分解分光を実施し、プラズマ再結合輻射の前に増強効果が起こっていることを明らかにした。まだ高い運動エネルギーを持っている電子が直接分極した置換基そのものに相互作用し、置換基そのものの固有な分極率を改変している点で、表面増強ラマン効果の物理機構とも化学機構とも異なる増強機構であることを突き止めることができた。これは目標(1)で表面増強ラマン効果では得ることの出来なかった金属表面の吸着水の増強計測に成功していることから、裏付けられているといえる。逆に、電子増強法の効果が期待できるのが、もともと分極の大きな置換基であることが判明し、その適用範囲に制限がかかることも判明したが、表面増強ラマン効果との差異が明らかになってきた点で、おおむね目標を達成したものと考えている。

以上(1)－(3)について、今後の応用・発展へ向けての基盤固めの段階ではあり、さらなる検討が必要ではあるが、所定の成果が得られたものと思われる。

技術的には、特に一般に普及している赤外分光法への応用のため、高価なレーザーを用いない、新しい電子供給法として、表面・界面計測のための高周波電源を用いたプラズマジェットの利用、水中計測のためのランプ光源を用いた光化学的電子供給法の検討を平行して進めた。前者は成功し、後者は現在検討の段階である。これらの技術的課題については、測定対象に応じた物理的・化学的な最適な電子供給条件を今後も検討していく必要があると考えている。また細胞中などへの適用を考え、高空間分解計測を実現するための非線形レーザー分光法との組み合わせによる顕微鏡への適用、化学修飾による生体高分子の目的の部位のみの温和な電子発生方法等は、可能であれば期間中に同時に達成したい技術的項目として掲げていたが、これらは最終年度により研究をスタートさせた段階で、今後引き続き行う研究課題となった。

6. 研究総括の見解

極微量のサンプルの構造解析や反応追跡を飛躍的に向上させる電子増強振動分光法の研究である。新たに電子を分子に付加することで分子の分極率を変化させ、赤外吸収やラマン散乱能を飛躍的に高めるという独自の発想に取り組んだ。主たる成果は次の2点である。

①理論計算により水中での電子付加により赤外・ラマン活性が著しく増強される結果を導出し、このことから表面増強ラマン効果とは異なる第3の増強メカニズムが存在する可能性を証明した。

②本法を、金属表面と吸着水クラスターの不均一界面の振動分光、超臨界水中に生成したプ

ラズマと相互作用する水分子の振動分光の測定に適用し、従来技術で測定できなかった現象や増強スペクトルの測定に成功した。

また、レーザーの代わりに安価なプラズマジェットを用いる技術開発、円二色性分光法へ本法を応用した立体配座の計測技術など原理検討から応用まで精力的に研究展開した。

これらの研究成果は 3 篇の原著論文、4 件の学会招待講演にまとめられている。また平成18年9月に社団法人日本分析化学会にて奨励賞を受賞している。

水中の電子増強散乱という独自に見出した現象を基盤として独創的な成果を上げた。得られた成果は本法の多様な応用分野を示すとともに、電子増強振動分光法の理論を傍証するものとして高く評価できる。一方、未解明の部分も多いので着実に疑問点を整理しつつ現象解析を進めていきたい。この解明のために理論グループとのコラボレーションも重要と考えられる。本法は、局所環境における生体高分子などで分子の局所的な環境や構造情報を敏感に反映するため、反応追跡や構造決定の重要なツールとなると思われる。波及効果は極めて大きく今後の更なる発展を期待したい。

7. 今後の展開

電子増強ラマン散乱法の利点は、水中で、金属を用いずにラマン信号の増強を図れる点であり、この特徴を活かした応用展開をさらに発展させていきたい。具体的な応用先として、細胞中における局所化学環境の評価が挙げられる。これまでに表面増強ラマン効果を適用するため、金属ナノ粒子を細胞中に外部から導入する試みがあるが、本方法では、金属ナノ粒子の代わりに電子を用い、しかかもその電子を測定系の内部から外部の光刺激などにより供給し、目的の信号を取得し終えたらまた電子を系に戻すといった方法を検討したい。この目的の達成のため、以下の2点を今後の技術的目標として展開していきたい。

- (1) 顕微分光観測への適用。特に各種非線形ラマン過程と組み合わせた3次元高空間分解化
- (2) 温和な電子供給法の開拓。特に、計測目的部位への電子供給プローブの修飾。

電子増強赤外分光法は、特に VCD への適用を中心的に進めたい。これは、生体分子に多いキラル分子の水中での立体配座を、結晶化したり、化学修飾したりせずを得ることの期待できるほぼ唯一の分光法であるためである。従来の VCD では感度的に時間分解計測が難しいが、蛋白質の2次構造のダイナミックな変化、生体中のキラル分子の立体配座がないうる高度な分子認識過程のその場追跡などへの適用を可能にするべく、VCD の飛躍的な感度向上を目指して研究を進めていきたい。

8. 主な論文等

(A) さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

・Hiroharu Yui, "Electron Enhanced Raman Scattering and Its Applications in Solution Chemistry", Analytical Sciences (Vol.23, page 769-774), 2007

- ・ Hiroharu Yui、Takahito Nakajima、Kimihiro Hirao、Tsuguo Sawada、“Electron-Enhanced Vibrational Spectroscopy: A Theoretical Approach”、Analytical Sciences (Vol.24, page 111-114)、2008
- ・ Hiroharu Yui、Hisaya Kato、Yuu Someya、“Characteristic wavenumber shifts of the stimulated Raman scattering from interfacial water molecules induced by laser-induced plasma generation at air-water and water-silver interfaces”、(Vol.24, page 111-114)、Journal of Raman Spectroscopy、2008

(2)特許出願 なし

(3)受賞

平成18年9月 社団法人日本分析化学会 奨励賞受賞

(4)学会発表

口頭発表(国内)

- ・ 由井 宏治、“電子増強ラマン分光法を用いた水中における電子—水分子相互作用の研究”、第67回分析化学討論会、2006
- ・ 由井 宏治、 筈居 高明、 澤田 正美、寺嶋 和夫、“電子増強ラマン分光法を用いた超臨界水—プラズマ相互作用の解析”、第68回分析化学討論会、2007
- ・ 由井 宏治、“電子増強ラマン分光法を用いた気液・液固界面分光分析”、日本分析化学会第56年会、2007

(5)招待講演

招待講演(国際)

- ・ Hiroharu Yui、“Electron-Enhanced Raman Scattering and its Application to Solution Chemistry:(invited talk)”、International Conference on Raman Spectroscopy (The 20th ICORS)、2006
- ・ Hiroharu Yui、“Electron-Enhanced Raman Scattering and its Application to Solution Chemistry:(invited lecture)”、The first International Symposium on Surface-enhanced Raman Scattering (SERS-2006)、2006

招待講演(国内)

- ・ 由井 宏治、“電子増強振動分光法の開発と溶液化学への応用(学会シンポジウム招待講演)”、日本分析化学会第55年会、2006
- ・ 由井 宏治、“電子増強ラマン分光法の開発と溶液化学への応用(奨励賞受賞講演)”、日本分析化学会第55年会、2006

(B) その他の主な成果

なし