

「光の利用と物質材料・生命機能」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成24年度終了研究課題－

研究総括 増原 宏

1. 研究領域の概要

本研究領域は光との相関を新しい光源から探ることにより、情報通信、ナノテクノロジー・材料、ライフサイエンス、環境・エネルギー等の諸分野において、これまでにない革新技術の芽の創出を目指す研究を対象とする。具体的には、光源として高出力、超短パルス、超長波長のレーザー、放射光、極微弱光、単一光子レベルの光も想定し、光の本質に迫る研究、光を使い尽くす研究、光でのみ可能になる合成・物性・機能の研究、光によって実現するプロセス、光が関わる細胞機能、光で初めて解き明かされる生体組織、光でのみ制御できる生命機能、これに加えてリアルな材料や生物を対象とした光計測法、イメージング法の研究などが含まれる

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数: 14 件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「光の利用と物質材料・生命機能」領域に委嘱された領域アドバイザー12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) 選考に当たっては、さががけ共通の選考基準(URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info666/shiryou4.html>)の他、以下の点を重視した。

光科学技術の研究は、光そのものに関わる科学技術を発展させるだけではなく、新しい物質システム、生命機能を生み出すメカニズムに関する概念や発想を与える。この光科学技術の特徴を踏まえた、今までにない斬新なアイデアによる研究を求めた。具体的には、数年から10年で新しい「光の利用」のストリームを作る可能性があるか、その代表者になれるか、実現可能性を示す手がかり、経験、あるいは背景はあるかを問う一方、他の研究費では実現できない研究として差別化出来ているか、個人研究であることを自覚しているかを考慮した。さらに、国際的にもさががけていること、幅広い科学と技術の分野をカバーすること、年齢的にも地域的にもヘテロな分布とすることを重要と考えた。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー・外部評価者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、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会(書類選考会議)へ1課題を推薦した。

選 考	書類選考	面接選考	採択数			
			15 件	内 訳	3 年型	14 件(0 件)
対象数	189 件	31 件			5 年型	1 件(1 件)

()内は大挑戦型としての採択数。

備考:

- 1) 平成 21 年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。

・志賀研究者

研究期間が 5 年で、今年度終了しないため。今年度は中間評価を実施する(中間評価結果:
http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/evaluation/mid-term/34raisha_H24mid_ev.pdf..)

5. 研究実施期間

平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

6. 領域の活動状況

領域会議:以下の通り 7 回実施した。

- ・第 3 回領域会議 静岡、平成 22 年 1 月 9 日(金)～10 日(日)
ホテルアソシア静岡
- ・第 4 回領域会議 神戸、平成 22 年 6 月 25 日(金)～27 日(日)
チサンホテル神戸
* 25 日(金):SPring-8 見学
- ・第 5 回領域会議 東京、平成 23 年 1 月 6 日(木)～1 月 8 日(土)
チサンホテル浜松町
- ・第 6 回領域会議 新竹(台湾)、平成 23 年 5 月 28 日(土)
台湾国立交通大学
- ・第 7 回領域会議 東京 平成 24 年 3 月 8 日(木)～10 日(土)
東京大学・山上会館
- ・第 8 回領域会議 博多 平成 24 年 9 月 1 日(土)～2 日(日)
博多エクセル東急ホテル
- ・第 9 回領域会議 東京 平成 25 年 3 月 9 日(土)
東京大学・一条ホール

シンポジウム(本研究領域や研究者が直接企画に関わった事例)

- ・日本薬学会特別シンポジウム
「生体反応・細胞挙動のセンシング—光を使って何ができるのか？」
平成 23 年 3 月 29 日(静岡)
オーガナイザー:樋口ゆり子、秋田英万
講演者:須藤。西村。樋口
- ・AS(Academia Sinica)–JST 合同シンポジウム「Innovative Use of Light/Bio Materials」
台湾中央研究院と科学技術振興機構との合同シンポジウム
平成 23 年 5 月 26、27 日(台湾、台北)
11 名口頭発表(うち二期生 3 名)、全員ポスター発表
- ・シンポジウム「若手研究者が拓く光生物物理学」
平成 23 年 9 月 17 日(兵庫県立大学)日本生物物理学会
オーガナイザー:須藤、増田
講演者:増原挨拶、須藤、増田、永井
- ・光拠点第 4 回合同シンポジウム
平成 23 年 11 月 14 日(キャッスルプラザ、名古屋)
さきがけ「光の利用」からは、増原挨拶、研究者約 30 名がポスター発表
- ・シンポジウム「光学が切り拓く分野横断研究」
平成 23 年 11 月 29 日(大阪大学)日本光学会
JST さきがけ「光の利用と材料・生命機能」領域グループ企画
講演者:小関、佐崎、石坂、スミス、足立、新倉、岩倉、ハツ橋、志賀、増原挨拶
- ・JST さきがけ研究領域合同国際シンポジウム
「持続する社会を先導する光科学:環境・エネルギー・機能材料」
平成 24 年 3 月 26 日(月)、27 日(火)(慶応大学)日本化学会
本領域では、増原挨拶、研究者 3 名の口頭発表、特別講演外国人 AD ヴァイス UCLA 教授
研究者:口頭発表 3 件、ポスター発表が 15 件、計 18 名が発表
- ・第 5 回文部科学省「最先端の光の創成を目指したネットワーク研究拠点プログラム」シンポジウム
平成 25 年 1 月 11 日(日本科学未来館)
本領域からは研究者 19 名がポスター発表

・シンポジウム「光化学と光生物学のマリアージュ」

平成 25 年 3 月 22 日(立命館大学びわこ・くさつキャンパス)日本化学会

オーガナイザー:奥津、高木

講演者:高木、小笠原、奥津、増田、須藤

研究者自主企画による領域内研究交流会

・「レーザーと光利用の夢物語」 奈良先端科学技術大学院大学

平成 23 年 7 月 1 日(金)～2 日(土)

参加者:一期生 4 名、二期生 5 名、三期生 4 名、総括、技術参事、他 1 名

・第 1 回二期生研究交流会 NICT

平成 24 年 1 月 6 日(金)～7 日(土)

参加者 二期生 11 名 総括・技術参事、他 1 名

・第 1 回生物系研究交流会 理化学研究所(和光)

平成 24 年 6 月 2 日(土)～3 日(日)

参加者:一期生 2 名、二期生 3 名、三期生 3 名、総括、技術参事、他 1 名

・第 2 回二期生研究交流会 京都大学

平成 24 年 7 月 31 日(火)～8 月 1 日(水)

参加者:二期生 11 名、総括、技術参事、他 3 名

・第 3 回二期生研究交流会 京都大学東京オフィス(品川)

平成 24 年 12 月 3 日(月)～4 日(火)

参加者:二期生 11 名、総括、技術参事、他 3 名

・第 1 回化学系研究交流会 JST 東京別館 4F 会議室

平成 24 年 1 月 12 日(土)

参加者:一期生 3 名、二期生 2 名、三期生 2 名、総括、技術参事、他 3 名

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問などは以下の通りである。

- ・ サイトビジット:15 回 (総括、担当アドバイザー、両参事の研究実施場所訪問)
- ・ 総括面談: 1 回
- ・ 技術参事の研究実施場所訪問:26 回
- ・ 技術参事面談:2 回 (学会などで面談)

7. 事後評価の手続き

評価は、領域会議での発表内容(6 回実施)、アドバイザー・ミーティング(2 回実施)でのアドバイザーからのコメント、半期ごとの研究者から提出される半期報告書に対する担当アドバイザーからのコメント、さらには終了半年前に実施した「終了検討会」と、その後折りを見て実施した面談、および各研究者より提出された研究課題別評価を参照して研究総括が実施。

(評価の流れ)

平成 24 年 9 月 終了検討会を開催、最後の半年間における研究計画について議論、前日に開催したアドバイザー・ミーティングでのコメントを踏まえて、その後必要に応じて個別面談を行った。

平成 25 年 3 月 研究報告会開催後、担当アドバイザーからのコメント

平成 25 年 3 月 研究者より研究報告書(案)受理

平成 25 年 3 月 研究期間終了

平成 25 年 4 月 領域活動・評価報告書および研究報告書提出

8. 事後評価項目

- (1) 研究計画書の目標に対する研究課題の達成度
- (2) 研究遂行にあたり示されたさきがけならではの独自性
- (3) 外部発表(学術論文、口頭発表など)、特許など研究成果の発信状況
- (4) 学術賞、学会招待講演、新聞記事発表など外部からの評価状況
- (5) 得られた研究成果の科学技術への貢献度

9. 事後評価

今年度終了する研究者は、本さがけ研究領域の二期生 3 年型 14 名である。二期生の採用にあたっては、サイエンスあるいはテクノロジー一般としての評価、光科学技術としてのポテンシャル、さがけ研究としての新規性や独創性、個人研究の意味を十分検討した。また光の利用に関する新領域の数年から 10 年後のリーダーを発掘したいという想いも込め、5 年の大挑戦型研究を 1 件、3 年の通常型研究を 15 件選考したが、採択候補の外国人研究者 1 名が外国へ異動したため 1 件減り、最終的に 3 年型 14 名と 5 年型 1 名が研究活動を行ってきた。これら採択した 15 件の研究課題は、いずれもレベルの高いユニークな研究であり、チャレンジ度も高く、戦略目標、本研究領域の趣旨をよく理解しているものである。レーザー開発と応用が 4 件、レーザー捕捉応用が 1 件、光時計 (5 年型、中間報告参照)、X 線、理論、結晶化がそれぞれ 1 件、バイオ計測が 4 件、バイオ制御が 2 件と、前年度採択した一期生の課題とあわせ、「光の利用」の研究領域をさらに広げ、光科学技術研究の新しい可能性を探ることが出来た。

レーザー開発と応用では、放射光、自由電子レーザー、大型レーザー装置などとの補完性を意識し、足立研究者、財津研究者、畑中研究者はデスクトップの新しい光源の開発に挑み、ハッ橋研究者は高強度レーザーならではの分子科学応用を試みた。石坂研究者はレーザー捕捉技術を駆使した単一微小液滴の物理化学分析を行い、玉作研究者は放射光のビームラインの X 線光源を用いて独自の発想による X 線非線形光学分野の開拓に挑んだ。当研究領域 40 名のなかでただ一人の理論家である岡研究者は化学反応制御における量子相関の果たす役割を明らかにすることに挑戦し、奥津研究者はタンパク質の光反応誘起による結晶化手法を提案した。バイオ計測では、樋口研究者は生物個体内での幹細胞動態の可視化を可能とし、小関研究者は独自に提案した無染色で細胞や生体を観察することのできる顕微法の確立を図り、雲林院研究者は金属ナノワイヤーによる細胞内のリモート誘起ラマン分光の先鞭をつけ、スミス研究者は局所プローブの狙った位置への配置を目指して生細胞内での金ナノ粒子の作製を試みた。小笠原研究者は mRNA 翻訳を光によりタンパク質の生成を制御する手法を、増田研究者は発生に関する遺伝子を光照射で制御する方法を提案し実証した。

光の利用研究は物質材料から生命機能に広がっているが、光科学技術として伝統的な光源開発や化学への応用は、具体的かつ直接的な研究成果が望まれ、厳しい展開となった。しかし液滴、X 線、量子相関、結晶化など新規研究対象を選べば、光科学技術の持つ新しい可能性は広がり、バイオ計測では光のポテンシャルはいかなく発揮され、生細胞における mRNA の翻訳から個体の発生までの光制御も実証されることとなった。光科学技術の際立った特徴は、科学技術一般として方法論、概念を与えるところにあると主張してきたが、まさにその通りのすばらしい展開となっている。

1. 足立 俊輔研究者「真空紫外域の低次数高調波による超高速分光」

レーザー研究では、より短波長、より短パルスを求めて、世界中の研究グループが開発競争を行っている。しかしながら物質材料の視点からみると、最も重要な分光研究にとって、必要な波長を自由に発振し、自らの研究室に置いて簡便に使えるレーザー光源は、必ずしも開発されていない。特に、近紫外から真空紫外領域は、有機・生体分子の研究に有益であることから、それらの分光に必要なパルスレーザー光源の開発が重要である。

足立研究者は、これまでのレーザー開発経験を活かし、この課題に対するソリューションを探索した結果、波長 810nm のレーザー光を基本波とし、結晶による 3 次波、さらにクリプトンガスによる 3 次高調波、と基本波の 9 次高調波に相当する波長 90nm のみを、50fs パルス巾で、しかも高効率で発生させることに成功した。また、可視 5fs レーザーパルスを厚さ 50mm のシングルプレート BBO 結晶を用いることで、深紫外域 (260~380nm の波長範囲で可変) の 10fs パルスの発生にも成功した。

深紫外域光源を用い一期生の須藤研究者や他の研究者との共同研究を開始できたことは、開発された光源の有用性を示すものである。一方、波長 90nm の光源は、実際に分光に使用できる段階まで辿り付いたところで研究期間が終了となった。この開発した光源が分光研究に多大な貢献を果たすことを期待する。

2. 石坂 昌司研究者「エアロゾル微小水滴のレーザー捕捉・顕微計測法の開発と展開」

飛躍的なコンピューターの性能向上により、地球規模の気候シミュレーションの精度も向上してきた。しかしながら、気候変動への影響が最も大きいと言われる雲に関しては、雲粒の基本的な物理・化学測定法はいまだ確立されておらず、報告されているデータの信頼度の検討も必要である。

これに対し、石坂研究者は雲粒に相当する水滴を一粒ずつレーザーで捕捉し、様々な物理・化学データを直

接取得することを試みた。その結果、捕捉した液滴一粒のサイズその他、ラマンスペクトル計測により温度や含まれる硫酸アンモニウムの濃度などが計測可能となった。さらに、零下 100 度Cまで冷却できる実験装置を開発し、零度以下の過冷却状態の水滴が氷る凝固温度の硫酸アンモニウム濃度依存を得ることに成功した。

すべての計測値が捕捉された水滴一粒から直接得たものであり、これまでの手法では得られない信頼度と新しい視点を提供する。今後、単一の微小水滴レベルでの分光計測・解析する分析技術としてさらに発展させるとともに、気候変動の研究者と共同チームを組んで、雲の中の物理化学と単一水滴レベルの情報を関連させる研究を展開し、この分野における光技術のポテンシャルを示してほしい。

3. 雲林院 宏研究者「リモート励起ラマン分光を用いたナノ計測法の開発とその展開」

雲林院研究者自身が提案したプラズモン導波路を用いたリモート励起表面増強ラマン法による「単一細胞内視鏡法」の実現を目指した。

プラズモン導波路用の銀ナノワイヤーを化学合成により作製し、プラズモン導波路として機能させるための光カップリング効率を検討し、リモート励起表面増強ラマン法の実現が可能であることを実証し、銀ナノワイヤー表面上の単一分子蛍光観察にも成功した。さらに径 100 ナノメートル以下の銀ナノワイヤープローブを4軸マニピュレーターに装着し、生きた He-La 細胞内に挿入実験を行った。細胞外部の銀ナノワイヤー中心部にある光カップリング部にレーザー光を照射することにより、生細胞内に存在するプロテインなどからのラマン散乱を位置選択的に観測することに成功した。

様々な技術的課題に対し、一つずつ光技術を駆使して解決して当初の目的に目処を付け、生細胞内の狙った位置毎の分光情報を与えるこの新しい光計測法を世界に先駆けて実現したのは見事である。今後は実際に生命機能の研究分野で使われていく事を期待する。

4. 岡 寿樹研究者「量子相関光子による光化学反応制御」

光子間の量子論的性質「量子相関」や、「非局所的な量子相関」が示す「量子もつれ光子」についての研究が精力的に行われ、量子情報通信技術への応用が進められている。しかしながら、このような光の量子特性の化学反応に果たす役割や、化学反応制御への応用はいまだ未開拓分野である。

これに対し岡研究者は、量子相関が化学反応の効率化に役立つかどうかを明らかにする「分子制御理論の構築」や、光合成における量子もつれの役割を明らかにする「量子論に基づく光化学反応場」と「エネルギー移動制御理論」の構築を目指した。その結果、量子相関制御により 2 光子励起の高効率化や選択性向上が可能であることを明らかにした。さらに、光合成に関しては、エネルギー移動に量子もつれが存在し、高速なエネルギー移動に寄与していることを明らかにした。

これは分子間エネルギー移動を説明する従来の Förster メカニズムを超える画期的な成果を示唆するものであり、今後の量子相関光の分子科学、分子技術への応用について新たな活用指針を提供することが期待できる。一人の理論屋が多く先進的異分野研究者と必死でコミュニケーションする中から新しい手掛かりが生まれる、さきがけスタイルの成果と言える。今後量子もつれ光によるエネルギー移動制御理論を構築や、様々な物理系での人工デバイス化の可能性などに対するさらなる研究の発展を期待する。

5. 小笠原 慎治研究者「光応答性核酸による単一細胞内での光遺伝子制御」

細胞内では、必要に応じて特定のタンパク質が特定の場所や時間、さらには周期的に発現する。このような生命活動のメカニズムを解明するには、細胞内のタンパク質発現を時間的空間的に操作する手段の開発が必要である。これに対して、小笠原研究者は光の照射により、タンパク質発現を自由にコントロールできる手法の開発を試みた。

タンパク質の発現は翻訳開始因子(eIF4E)が mRNA の 5' 末端にある7-メチルグアノシン(cap)に結合することから始まる。eIF4E と結合できないトランス体と結合できるシス体があるが、波長の異なるレーザー光を照射することによりトランス体からシス体へ、またその逆へと可逆的に変化させることのできる cap 分子の開発に成功した。この cap 分子により、蛍光タンパク質の発現量を周期的に制御することや、細胞内の特定の場所へのみ発現させることが光制御により可能であることを実証した。

応答波長の改善など課題など様々な解決すべき課題はあるものの、他に例のない生きた細胞内でタンパク質発現の可逆的光制御法を提案し実証したことは、「さきがけ」研究にふさわしいチャレンジであったと考えており、今後の生命科学研究に寄与できる手法として発展させていくことを期待する。

6. 奥津 哲夫研究者「光化学反応を駆使した分子結晶成長過程の制御」

タンパク質の機能解明にとって立体的構造の解明はその基本であり、X線構造解析には結晶化が必要である。タンパク質の多くは結晶化が困難であるが、奥津研究者は光誘起反応による結晶成長法を開拓してきた。

本さがけ研究では、タンパク質自身の光反応による結晶の核生成と成長のメカニズムを解明し、光照射によるタンパク質結晶の作製に関する方法論の確立を目指した。その結果、光誘起の化学反応により結晶核となるタンパク質二量体が生成され、その二量体がテンプレートとして働くことにより結晶が成長するメカニズムを明らかにした。また、プラズモンを利用した結晶成長技術を開発し積極的に特許を出願し、さらに製品化を目指す一方、脂質膜の光相転移を利用した膜タンパク質の結晶化法を提案した。

このように基礎研究、特許出願、製品化と展開してきた奥津研究者のアプローチは、「光の利用」研究を体現したモデルケースであり、今後もこのような研究活動を継続発展させ、我が国ならではのタンパク質研究に関する光技術開発の一大潮流を作り出してほしい。

7. 小関 泰之研究者「誘導ラマンによる高感度光学活性検出及び高分解能イメージング」

小関研究者は、生体を染色せずに高コントラストかつ高感度な3次元イメージングを可能とする誘導ラマン散乱顕微法の着想を独自に得て、誘導ラマン散乱顕微鏡を立ち上げ、実際に顕微法として優れた機能を有することを実証した。

本さがけ研究では、この実績をもとに、誘導ラマン散乱顕微法の極限性能を追求し、生体のイメージング技術の革新を目指した。その結果、理論限界感度を達成するとともに高速分光イメージングを実現し、誘導ラマン散乱顕微法が高速性と分子識別機能を兼ね備えた染色を必要としない生体顕微法として優れた手法であることを示した。この成果は高く評価され、多くの国際会議から招待講演の依頼を受けている。

同時期に米・独グループからも誘導ラマン散乱顕微法が提案されているが、本さがけ研究で実現した性能と分子識別能は世界最高レベルにあるものと判断しており高く評価する。この顕微法には更なる高性能化、高機能化の余地があると考えられ、一層の努力によりこの顕微法の開発をリードすることを期待する。

8. 財津 慎一研究者「非振器位相整合非線形光学の開拓と新光源への応用」

非線形光学にもとづく光源開発はこれまでも活発に行われてきたが、今後は物質材料を積極的に制御することにより、さらに新しい可能性が開かれると考えられている。財津研究者は、群速度分散が厳密に制御された光共振器、「分散補償型高フィネス共振器」により実現される新規共振器内非線形・量子光学的現象の観測、および、それらのデバイス・光源・計測法としての新しい応用を目指した。

共振器に充填する気体の正の分散と、負の分散を持つ共振器鏡とにより、分散を打ち消すように設計した「分散補償型高フィネス共振器」を独自に提案し、「位相整合条件」を満たした非線形光学により、最も周波数の高い連続発振光波変調器や最も繰り返し周波数の高い超短光パルス列が得られることを実証した。さらに、共振器内の極微量分子を検出することが可能な「共振器増強位相整合ラマン分光法」を試み、従来法に比べ1000倍もの高い感度が得られる事を示した。

オリジナリティーのあるアイデアを提案し実現に成功している。おしむらくは、原理の実証と様々な応用に関するアイデアが残されたので、今後はこの手法が持つ特性を明らかにし、魅力を端的に示す応用、デモンストレーションをお願いし、役立つ技術へと発展させていただきたい。

9. N. Smith 研究者「生きた細胞内での生命機能分析用プローブのレーザーを用いたその場作成」

スミス研究者は、かつて細胞内の金微粒子より、細胞内部の分子を検出できることを示したが、細胞外部から導入する金微粒子を細胞内の所望の場所に誘導することは困難であった。これを解決するため、レーザー照射により生細胞の任意の場所に金微粒子を作製する着想を得た。この新しいナノ加工技術を用いて細胞内部の加工、細胞のより深い理解、細胞のより正確な観察や、さらには、細胞活性の光制御も可能にする手法の開発を目指した。

これを実証することが本さがけ研究の目的であるが、実施に、金イオンを含む分子を生きた細胞内に分散させ、波長532nmの半導体レーザーを細胞内の任意の場所に照射し作製することを試みた。実際金微粒子を局所に作製できる事はできたが、トライした細胞は死んでしまい、生きた細胞の情報を得ることはできなかった。この手法は細胞内部に様々な構造物を作製できることを意味している。また作製した金微粒子からの表面増強ラマン散乱スペクトルの計測にも成功し、分析手法を検討した。

細胞を生かしたまま細胞内加工を実現する条件を見いだせなかったもので、この新しい手法が、生細胞のより深い理解、細胞のより正確な観察に役立つ有益な手段であることを実証するデモンストレーションには至らなかった。検討中の課題を解決して、光を用いた新規手法の有益性を明らかにすることを期待する。

10. 玉作 賢治研究者「X線非線形回折を利用した局所光学応答解析」

極端紫外～真空紫外光に対する電子の局所光学応答を計測できれば、結晶内の性質の異なる電子の分布が得られる。しかしながら、空間分解能は波長程度であるため、原子レベルでの分解能で計測することは困難であった。

これに対し玉作研究者は、波長1 Å程度の硬X線領域における非線形光学現象の一つであるX線パラメトリック下方変換を利用して局所光学応答を解析する新しい研究手法を提案した。この方法では、照射する波長1 Å程度の空間分解能と、非線形光学現象により放出される極端紫外～真空紫外光の光学応答を得ることができる。この着想を理論計算により確認するとともに、ダイヤモンドを用いた実験を行い、原子の荷電子と原子間の結合電子のそれぞれの分布を求めることにより実証した。

アイデアの新規性とその実証実験に成功したことは高い反響を呼び、論文発表後、10件を越す国際会議での招待講演依頼を受けている。大型放射光ならではのX線光源を個人研究に駆使したこの研究は、まさに大型設備を使う研究者の個人研究「さがし」の成功例としてインパクトを与えるものであり、今後の「光の利用」研究のさらなる広がりが期待される。

アイデアの新規性とその実証実験に成功したことは高い反響を呼び、論文発表後、10件を越す国際会議での招待講演依頼を受けている。大型放射光ならではのX線光源を個人研究に駆使したこの研究は、まさに大型設備を使う研究者の個人研究「さがし」の成功例としてインパクトを与えるものであり、今後の「光の利用」研究のさらなる広がりが期待される。

11. 畑中 耕治研究者「微小液滴と超短光パルスの構造制御による超広帯域光変換」

高強度レーザーパルスと液体や固体と言った凝縮系との相互作用では、多様な非線形過程が関与しており、多くの研究者にとって興味深い研究対象である。畑中研究者は、フェムト秒レーザーパルスを金ナノコロイド溶液に照射することにより、「近赤外パルス光→電子→パルスX線/THz波」の高次非線形過程が関わる超広帯域光変換をめざした。

立ち上げた装置を用いて、金イオンあるいは形状やサイズの異なる金ナノ微粒子を含む液滴試料に対し、パルス幅内の周波数変化を制御したフェムト秒レーザーパルスを照射し、パルス状のX線からTHz光までの超広帯域の電磁波を発生させた。同量の金を含む場合、金イオン溶液に比べ金ナノコロイド溶液をレーザー照射すると、X線発生強度が600倍から800倍も高いことを示したが、コロイドのサイズや形状には大きな依存性は見られなかった。一方、照射するレーザーパルス幅内の周波数変調により発生するX線を制御できる事も見いだした。

フェムト秒レーザーパルスを金ナノコロイド溶液に照射することにより、X線からTHz光までの高帯域のパルス光源を開発するという目的は、そのアイデアの基本的可能性を確認した段階である。さらにX線発生のような実験的・理論的課題を明らかにし、新しい光源としての可能性や魅力を示していただきたい。

12. 樋口 ゆり子研究者「蛍光イメージングによる幹細胞挙動解析法の創成」

幹細胞を血流に乗せて特定部位に届けることにより新しい治療分野が開拓できる可能性がある。樋口研究者の目標は、細胞内の分子発現機構を利用し、幹細胞の接着や分化などの挙動にตอบสนองしてスイッチがon/offするように設計した蛍光標識法を開発し、幹細胞が、いつ、どこで、どのように分化するかを可視化することである。

そのため、まず、生きたマウスの組織内に体外から幹細胞を導入しその挙動をリアルタイムでイメージングする手法の開発を目指した。これを実現するため、マウス体内に導入する細胞を識別できるようにするための細胞の蛍光標識法と生きたマウスを顕微鏡下で固定する方法の開発が必要である。前者に対しては、約1ヶ月もの長期間にわたって蛍光機能が維持できる標識法を開発し、後者に対してはマウスの観察部位を固定する治具を考案して特許も出願した。これにより、マウスの臓器に細胞が運ばれていく動態の直接イメージングに成功した。

細胞、薬学、医学に強く、ノウハウの蓄積もあり、本さがし研究者に対する情報提供や技術提供などを通して、新しい課題を設定し、研究チームの組織を広げていくアプローチが印象的であった。永井研究者との共

同研究、生きたマウスの癌部の化学発光イメージングはその成功例である。これらの成果と活動を基に、光を駆使して幹細胞の体内動態制御および分化制御を実現し、新規細胞療法の開発につなげていかれることを期待する。

13. 増田 真二研究者「モジュールの組み合わせによる光機能蛋白質の創出」

受光による光受容体蛋白質の構造変化は、別のタンパク質により認識され、情報が伝わり、最終的に具体的な機能をもった蛋白質の活性を調節する。この光情報伝達は、いくつかの蛋白質の部品(モジュール)の組み合わせで多様化していることが知られている。

増田研究者は各モジュールの機能を組み合わせることにより、任意の酵素活性と遺伝子発現を自在に制御できる技術の確立を目指した。これらの成果の集大成として、PICCORO と名付けた光依存的転写因子制御法を開発し、具体的応用例として、ゼブラフィッシュの尻尾を形成する転写因子に適用して光の照射により尻尾の形成不全が起こることを示すことに成功した。この手法は、個体発生などの段階にも応用可能で、転写因子の活性を光で制御することが可能となった。

この成果は、個体発生においてどの段階で何がどう働いて発生が制御されているかという発生学における最も基本的な課題の解明に寄与できる手法を開発できたことを意味している。外国人アドバイザー研究者からも注目を集めており、当領域の所期の目標の一つである光による個体発生の制御を実現したことは、新しい「光の利用」研究フィールドを開拓したものと高く評価できる。

14. ハッ橋 知幸研究者「高強度レーザーによる超多価イオン生成と新規化学反応の開拓」

超多価イオンは、未知の化学反応を誘起できる可能性がある新規活性種である。高強度レーザー照射により、物質から瞬時に多数の電子を脱離させ、超多価状態を創り出す事ができる。ハッ橋研究者は、様々な超多価イオンを試み、生成された方向性を持った高エネルギー超多価イオンによる新規な化学反応の開拓を目指した。

価数の大きな超多価分子イオンを生成させるため、照射レーザーの波長や超多価イオン生成に有利と思われる分子の選択など、様々な試みを検討した。その結果、4原子分子の4価の超多価イオンが安定して存在することを見いだした。少数原子の分子であることから理論的な検討も行うことができ、その安定性を理論的に説明する事にも成功した。その他にも、種々の超多価イオンの生成に成功した。

しかし、当初の目的であった超多価イオンによる新規化学反応の開拓については、これからと言うところで研究期間の終了を迎えた。超多価イオンの気相、液相、固相における化学反応を研究する準備が整いつつある段階であり、研究を継続し、当初の目標を達成して「光の利用」をさらに広げていただきたい。

10. 評価者

研究総括

増原 宏 台湾交通大学 応用化学系及び分子科学研究所 講座教授

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成25年3月末現在)

石原 一 大阪府立大学大学院工学研究科 教授

伊藤 繁*1 名古屋大学 名誉教授

小原 實 慶應義塾大学理工学部 教授

熊野 勝文 東北大学マイクロシステム融合研究開発センター 客員教授

小杉 信博 自然科学研究機構分子科学研究所 教授

佐々木 政子 東海大学 名誉教授

七田 芳則 京都大学大学院理学研究科 教授

中島 信昭 豊田理化学研究所 フェロー

三澤 弘明 北海道大学電子科学研究所 所長

美濃島 薫 産業技術総合研究所 イノベーション推進本部 事務局長

三室 守*2 京都大学大学院人間・環境学研究科

宮脇 敦史 脳科学総合研究センター 副センター長

吉原 経太郎 自然科学研究機構分子科学研究所 名誉教授

Frans Carl De Schryver*3 Katholieke Universiteit Leuven, Emeritus Professor

Din Ping Tsai*4 台湾中央研究院應用科學研究中心 センター長

Shimon Weiss*5 University of California, Los Angeles, The Dean Willard Chair



Johan Hofkens*6 Katholieke Universiteit Leuven, Department of Chemistry, Professor

*1 平成 22 年 6 月～現在

*2 平成 20 年 6 月～平成 23 年 2 月

*3 平成 21 年 12 月～現在

*4 平成 23 年 4 月～現在

*5 平成 22 年 4 月～現在

*6 平成 24 年 2 月～現在

(参考)

件数はいずれも、平成25年3月末現在。

(1) 外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	7	58	65
口 頭	221	98	319
その他	20	1	21
合 計	248	157	405

(2) 特許出願件数

国 内	国 際	計
4	3	7

(3) 受賞等

- ・足立 俊輔
レーザー学会 奨励賞(2011.5.25)
- ・石坂 昌司
日本エアロゾル学会 エアロゾル計測賞(2010.8.4)
- ・小関 泰之
応用物理学会 講演奨励賞(2010.9.14)
光学論文賞(2011.3.25)
- ・樋口 ゆり子
第 5 回日本 DDS 学会 奨励賞(2013)
- ・増田 真二
平成 23 年度東工大挑戦的研究賞(2011.8.15)
- ・ハッ橋 知幸
The APA Prize for Young Scientists(2010.11.15)

(4) 招待講演

国際 41 件

国内 37 件

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成25年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
足立 俊輔 (兼任)	真空紫外域の低次数高調波による 超高速分光 (京都大学大学院理学研究科)	京都大学大学院理学研究科 准教授 (東京大学物性研究所)	53
石坂 昌司 (兼任)	エアロゾル微小水滴のレーザー捕捉・ 顕微計測法の開発と展開 (広島大学大学院理学研究科)	広島大学大学院理学研究科 准教授 (北海道大学大学院理学研究院)	50
雲林院 宏 (兼任)	リモート励起ラマン分光を用いた ナノ計測法の開発とその展開 (カトリック ルーバン大学・ベルギー)	カトリック ルーバン大学化学学部 准教授 (同上)	72
岡 寿樹 (兼任)	量子相関光子による光化学反応制御 (新潟大学研究推進機構超域学術院)	新潟大学研究推進機構超域学術院 准教授 (大阪大学大学院工学研究科)	23
小笠原 慎治 (兼任)	光応答性核酸による単一細胞内での 光遺伝子制御 (北海道大学研究創成機構)	北海道大学研究創成機構 特任助教 (理化学研究所)	50
奥津 哲夫 (兼任)	光化学反応を駆使した分子結晶成長過程 の制御 (群馬大学大学院工学研究科)	群馬大学大学院工学研究科 教授 (同上)	52
小関 泰之 (兼任)	誘導ラマンによる高感度光学活性検出及び 高分解能イメージング (大阪大学大学院工学研究科)	大阪大学大学院工学研究科 助教 (同上)	52
財津 慎一 (兼任)	非振器位相整合非線形光学の開拓と 新光源への応用 (九州大学大学院工学研究院)	九州大学大学院工学研究院 准教授 (同上)	52
N. Smith (兼任)	生きた細胞内での生命機能分析用 プローブのレーザーを用いたその場作成 (大阪大学免疫学フロンティア研究センター)	大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 特任准教授 (大阪大学大学院工学研究科)	52
玉作 賢治 (兼任)	X線非線形回折を利用した局所光学 応答解析 (理化学研究所播磨研究所)	理化学研究所播磨研究所 専任研究員 (同上)	47
畑中 耕治 (兼任)	微小液滴と超短光パルスの構造制御による 超広帯域光変換 (東京大学大学院理学系研究科)	東京大学大学院理学系研究科 准教授 (同上)	58
樋口 ゆり子 (兼任)	蛍光イメージングによる幹細胞挙動解析法 の創成 (京都大学大学院薬学研究科)	京都大学学際融合教育推進センター 特定講師 (京都大学大学院薬学研究科)	54
増田 真二 (兼任)	モジュールの組み合わせによる 光機能蛋白質の創出 (東京工業大学 バイオ研究基盤支援総合センター)	東京工業大学 バイオ研究基盤支援総合センター 准教授 (同上)	61
ハッ橋 知幸 (兼任)	高強度レーザーによる超多価イオン生成と 新規化学反応の開拓 (大阪市立大学大学院理学研究科)	大阪市立大学大学院理学研究科 教授 (同上)	58

研究報告書

「真空紫外域の低次数高調波による超高速分光」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 足立 俊輔

1. 研究のねらい

高次高調波発生技術の進展により、レーザーによってアクセスできる波長領域は既に軟X線領域(波長 1-10nm)にまで及び、発生する光パルスの時間幅はアト秒(10^{-18} 秒)の領域に入っている。レーザー研究にはベンチマーキング的な側面があり、より短い波長領域で、より短いアト秒パルスを用いて発生させるかを、世界中のレーザー研究グループが競い合っている。一方、近紫外から真空紫外領域(100-400nm)の超短光パルスは分光研究者にとって非常に有用である。多くの有機・生体分子は、最外殻電子の励起に必要なエネルギーが近紫外～真空紫外領域に対応している。ところが技術的ハードルの高さから、分光研究者にとってはこのような紫外域超短パルスを用いて測定を行うことは困難であった。

可視域では、5fs パルスが超高速分光におけるマイルストーンとなった。ポンププローブ測定においては、ポンプとプローブどちらかパルス幅の長い方によって測定の時間分解能が決まることを考えれば、近紫外～真空紫外領域においても同じく 5fs パルスを得て、それらを自在に組み合わせることで、多彩な系に対して極限的な時間分解能での分光測定を行いたいと考えるのは自然である。そこで本さきがけ研究では、可視域に加えて近紫外～真空紫外領域においても5ないし10fs 程度のパルス幅を実現することを目標として研究を行った。可視～真空紫外領域の3オクターブ以上に渡り、フェムト秒化学が対象にする波長領域をほぼ全て、極限的な時間分解能の下でカバーしようという、世界にも類を見ない試みである。とりわけ真空紫外領域は、波長変換のための非線形光学結晶が存在せず、技術的なハードルが一段と高い。そこで、まず非線形光学結晶を用いて近赤外光を深紫外光に波長変換し、その深紫外光を基本波として低次数の高調波を発生させることで高効率に真空紫外光を得るという、2段階アプローチを採った。

2. 研究成果

(1) 概要

高強度深紫外パルスを基本波とした高調波発生を行い、90nm 真空紫外高調波パルスを得た。更に、同パルスを用いた時間分解光電子分光測定への足がかりとして、基底状態にある分子を1光子遷移によりイオン化し、発生した光電子の運動量分布イメージングを行った。可視 5fs パルスレーザーを開発し、その二倍波を非線形光学結晶により発生させることで、深紫外 10fs パルスを得た。可視 5fs パルスレーザーはそれ自体で非常に有用であり、それを光源として過渡吸収測定を行った。

(2) 詳細

研究テーマA「真空紫外高調波パルスの発生と、時間分解光電子分光測定への応用」

おおむね 30–200nm の波長領域が真空紫外と呼ばれる。なかでも 160nm 以下の短波長領域では、波長変換に用いることのできる非線形光学結晶がないため、光パルスの発生手段は非常に限られる。1つは、大型加速器施設による自由電子レーザー(FEL)であり、もう1つは、本さがけ研究で開発を行ったような、パルスレーザーを基本波とした高調波光源である。両者それぞれに長所・短所があるが、FEL はその高いパルスエネルギーを生かして、シングルショットのコヒーレントイメージングや、多光子イオン化等の非線形光学現象の解明に寄与している。一方、レーザー高調波光源は扱いやすいテーブルトップのシステムであり、また繰返し周波数が高い点を生かして、超高速分光や分子反応ダイナミクス の解明への寄与が期待される。また、FEL は放射光と異なり線形加速器を利用するため、同時に利用できるユーザー数に制限がある。従って、真空紫外域から軟 X 線領域の超高速分光には、今後も(レーザーベースのテーブルトップ光源を含め)様々な光源開発が必要である。レーザー高調波のスペクトルは多数の奇数次高調波成分から成り、分光に用いるには特定の波長成分のみを何らかの形で取り出す必要がある。この単色化の過程で、ただでさえ非常に弱い高調波パルスの強度は更に大きく低下する。私は、深紫外光を基本波として低次数の高調波を発生させることで高効率に単一次数真空紫外光を得られるという着想を得、それを実現した。

真空紫外高調波パルス発生系を図 1 に示す。チタンサファイア(Ti:Sa)レーザー(波長 810nm)の出力パルスを高効率三倍波発生系に導入することで、波長 270nm の高強度深紫外パルスを発生させ、このパルスを基本波として高調波発生を行った。高調波発生ターゲットガスには、非線形感受率の大きさや位相整合条件等を考慮してクリプトン(Kr)を用いた。発生させた高調波は、基本波に対してブリュースター角入射になるように配置した SiC 基板により分離した。分光器によって測定された高調波スペクトルを図 2 に示す。Ti:Sa レーザーの 9 次高調波に対応する 90nm のスペクトル成分のみが得られた。パルスエネルギーはターゲットガスの圧力に依存し、最適条件下で 0.2μJ(平均出力に直すと 0.2mW)であった[3]。90nm パルスと基本波 270nm パルスとを真空チャンバー中の Kr 原子に同時に照射し、両者の遅延時間を掃引しながら Kr イオンの信号強度を測定することにより、相互相関測定を行った。その結果、90nm パルスのパルス幅は約 50fs 程度と見積もられた。

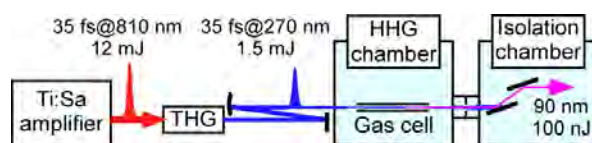


図 1

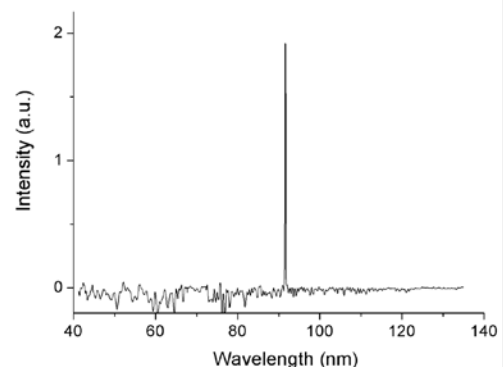


図 2

90nm パルスを対象試料(超音速分子線として真空チャンバー内に導入される)に集光し、基底状態にある分子(もしくは原子)を 1 光子遷移により基底状態からイオン化させた。その際に発生する光電子は、イオン化点の周囲に配置された複数の電極が作る静電場によって加速され、光電子の運動量に応じて二次元検出器上に投影される。それを CCD カメラによって撮影した。図 3 はそれぞれ(a)キセノン原子、(b)ベンゼン分子を試料とした場合の光電子の運動量分布を示すイメージである。例えばキセノン原子のイメージの場合、外側・内側のリングがそれぞれ

れ 1.7eV、0.3eV の光電子エネルギーに対応している。先行するポンプパルスにより分子を励起した上で、遅延時間を掃引した 90nm プローブパルスにより分子をイオン化し、同様の光電子イメージングを行うことで、光化学反応途上における電子状態の変化を実時間で追跡することができる。

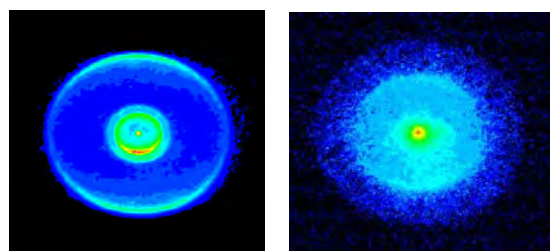


図 3 (a)

(b)

研究テーマB「可視 5fsパルスレーザーによる深紫外 10fsパルスの発生と、過渡吸収分光への応用」

従来、可視域で極限的に短い 5fs パルスを実現するためには、プリズム対やグレーティング対、更には空間位相変調器等による最適化制御を駆使した、複雑なパルス圧縮法を用いる必要があった。本さきがけ研究では、負分散素子としてチャープ鏡のみを使用した、従来よりも大幅にシンプルな可視 5fs パルスレーザーを新たに開発した。

Ti:Saレーザーの二倍波をポンプ光、基本波をサファイア板に集光することで発生させた白色光をシード光として非線形光学結晶に入射し、520～760 nm の広帯域非同軸パラメトリック増幅(NOPA)を行った。過渡吸収測定での試料位置においてパルス幅が最短になるように、チャープ鏡での反射回数を調整した。この可視 5fs レーザーパルスを非常に薄い非線形光学結晶に集光することで、深紫外域の二倍波スペクトルを得た(260～380nm の波長範囲で可変)。二倍波への変換効率とそのスペクトル幅とは互いにトレードオフの関係にあるが、厚さ 50 μ m のシングルプレートBBO結晶を用いることで、分光応用に十分な 10nJ のパルスエネルギーと、10fs に相当するスペクトル幅とを両立させることができた。

開発した可視 5fs レーザーを用いて過渡吸収測定を行った。ラピッドスキャン法によるオンザフライ高速データ取得と、ロックインアンプによる同期検波とを併用することで、高い信号雑音比を実現した。岡本博教授(東京大学大学院 新領域創成科学研究科)との共同研究により、銅酸化物試料の光励起後、数 fs～数 10fs の時間スケールで起こる、光誘起相転移初期過程のダイナミクスを観測することに成功した。また、須藤雄気准教授(名古屋大学大学院 理学研究科)との共同研究により、生体分子試料(センサリーロドプシン)の光励起後の光異性化に伴う構造変化を、分子振動の瞬時周波数の変化を通して実時間で観測した。

3. 今後の展開

可視～真空紫外領域の、フェムト秒化学が対象にする波長領域のほぼ全てを、極限的な時間分解能の下でシームレスにカバーする。

(A)可視・近赤外領域(500–800nm): 受動素子のみによる簡便な可視 5fsパルス (開発済)

(B)深紫外領域(250–350nm): 深紫外 10fsパルス(可視 5fsパルスの二倍波) (開発済)

(C)近紫外領域(350–500nm): Ti:Sa三倍波ポンプNOPAによる近紫外 5fsパルス (開発中)

予備実験により、三倍波ポンプ光のNOPAにより350–500nmの波長領域において5fsに相当する広帯域増幅スペクトルを確認している。

(D)真空紫外領域(30–200nm): 波長可変の真空紫外 5fsパルス

(構想中)

本さがけ研究においては、発生波長は 90nmに限られ、パルス幅も 50fs程度であったが、NOPAで得られる可視もしくは近紫外短パルスを基本波とした高調波発生により、波長可変の真空紫外 5fsパルス発生を目指したい。また、この波長領域の有用性を示す好例として実験を進めている、有機分子の時間分解光電子分光を引き続き行う。ベンゼン分子の S_2 励起状態を生成し、内部転換後にできる S_0 **状態(高振動励起の基底状態)からの異性化過程を実時間で観測することが、当面の目標である。

4. 自己評価

研究開始時に目標としていた波長領域(100–400nm)を越えて、可視域(520–760nm)、真空紫外域(90nm)といった幅広い波長領域でも光源開発を行った。一部の光源は既に、多くの分光研究グループとの共同研究に利用されており、レーザー研究と分光研究とをつなぐ、という大目標には沿って研究を行えたのではないかと自負している。今後の展開でも述べたが、さがけ研究期間中には着手できなかった近紫外域での光源開発を今後行いたい。また、90nm 真空紫外光源の有用性の実証、分光需要の掘り起こしにも力を入れていきたい。

5. 研究総括の見解

足立研究者は、これまでのレーザー開発経験を活かし、波長 810nm のレーザー光を基本波とし、結晶による 3 次波、さらにクリプトンガスによる 3 次高調波、と基本波の 9 次高調波に相当する波長 90nm のみを、50fs パルス巾で、しかも高効率で発生させることに成功した。また、可視 5fs レーザーパルスを厚さ 50mm のシングルプレート BBO 結晶を用いることで、深紫外域 (260–380nm の波長範囲で可変) の 10fs パルスの発生にも成功し、この光源を用い一期生の須藤研究者他との共同研究を開始した。しかしながら、波長 90nm の光源は、実際に分光に使用できる段階まで辿り付いたところで研究期間が終了となった。開発した光源は化学反応の分光学的研究に大いに貢献できると思うので、ぜひ実証してもらいたい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. S. Adachi, N. Ishii, Y. Kobayashi, Y. Nomura, J. Itatani, T. Kanai, and S. Watanabe, “Carrier-envelope phase control of few-cycle parametric chirped-pulse amplifier”, Japanese Journal of Applied Physics 49, 032703 (2010)
2. S. Adachi, N. Ishii, Y. Nomura, Y. Kobayashi, J. Itatani, T. Kanai, and S. Watanabe, “1.2-mJ, sub-4-fs source at 1 kHz from an ionizing gas”, Optics Letters 35, 980–982 (2010)
3. S. Adachi, T. Horio, and T. Suzuki, “Generation of intense single-order harmonic pulse in the vacuum ultraviolet region using a deep ultraviolet driving laser”, Optics Letters 37, 2118–2120 (2012)
4. N. Ishii, S. Adachi, Y. Nomura, A. Kosuge, Y. Kobayashi, T. Kanai, J. Itatani, and S. Watanabe, “Generation of soft x-ray and water window harmonics using a few-cycle, phase-locked, optical parametric chirped-pulse amplifier”, Optics Letters 37, 97–99 (2012)

(2)特許出願

該当なし。

(3)その他の成果

受賞

1. 第35回レーザー学会賞(奨励賞)、パラメトリックチャープパルス増幅による2サイクル・マルチミリジュール・搬送波位相制御光源の開発、2011年5月

招待講演

1. S. Adachi, “Few-cycle parametric chirped-pulse amplifier”, Symposium on the development of ultrashort pulse lasers and ultrafast spectroscopy, Chofu, Japan, 2010年9月
2. S. Adachi, “Few-cycle parametric chirped-pulse amplifier for attosecond pulse generation”, Workshop of Consortium for Photon Science and Technology, Okazaki, Japan, 2010年10月
3. S. Adachi, “Vacuum-UV single-order harmonic pulses for molecular science”, 5th Asian Workshop on Generation and Application of Coherent XUV and X-ray Radiation, Kashiwa 2012年6月

研究報告書

「エアロゾル微小水滴のレーザー捕捉・顕微計測法の開発と展開」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 石坂 昌司

1. 研究のねらい

気候変動に関する政府間パネル(Intergovernmental Panel on Climate Change: IPCC)は、2100 年までの気候変動の見通しを報告している。IPCC の第 4 次レポートには、将来の気候予測における最大の不確実性は「雲」に起因していると述べられている。つまり、雲の中で起こる物理・化学過程には未解明の問題が数多く残されているのが現状である。雲は、ミクロな水滴または氷の粒の集合体である。レーザー捕捉法を用いると、「マイクロメートルサイズの単一水滴を空中の一点に非接触で静止させる」ことが可能である。レーザー捕捉法を駆使し、雲粒の発生・成長・消滅に関わる水滴の相転移を光学顕微鏡下において誘起し、単一微小水滴レベルで分光計測することが出来れば、これまで困難であった大気中の水滴に関わる物理化学現象の解明につながり、その意義は大きい。

気相中に存在する微小な水滴は容易に蒸発してしまうため安定に保持することが極めて難しく、単一エアロゾル水滴のレーザー捕捉は、1975 年に A. Ashkin らが初めて成功して以来、今日までに数グループが成功しているのみである。本研究では世界に先駆けて、零度以下の温度条件において、気相の温度と湿度を同時制御可能なレーザー捕捉・顕微ラマン分光法を確立し、降雨・降雪の初期過程(図 1)である過冷却水滴が凍結するメカニズムを明らかにすることを目指した。

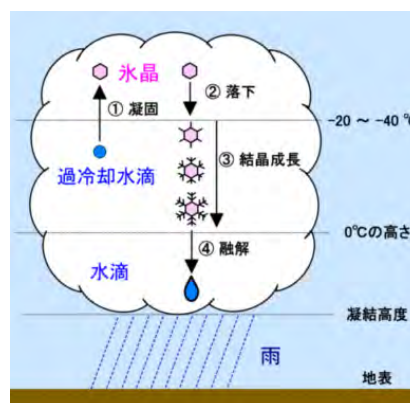


図1. 降雨・降雪のメカニズム

2. 研究成果

(1) 概要

本さがけ研究では、水滴に働く重力と反対の向きにレーザー光の放射圧を作用させ、水滴を気相中に非接触で保持し冷却する新規計測法の開発に成功した(図2)。本手法を駆使し、マイクロメートルサイズの過冷却水滴が気相中で凍結する瞬間を世界で初めて直接観測することに成功した。また、過冷却微小水滴を非接触で気相中に保持し、そのラマンスペクトルを計測することによって、水滴ごとに溶質濃度、温度を評価することが可能となった。本手法を用いて、過冷却水滴の凝固温度の硫酸アンモニウム濃度依存性を

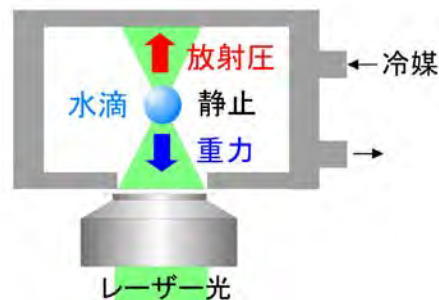


図 2. 過冷却水滴のレーザー捕捉

精密に計測したところ、エアロゾル水滴は従来の予想よりも凍結しにくいことを見出した。本計測法は、雲粒形成・成長・降水過程の詳細な機構解明の有力な分析手法へと発展することが期待される。

(2) 詳細

研究テーマ A「エアロゾル水滴のレーザー捕捉・顕微ラマン分光システムの構築」

レーザー捕捉顕微分光システムを図3に示す。超音波式ネブライザーを用いて溶質（硫酸アンモニウム）を含むエアロゾル微小水滴を発生させ、倒立型光学顕微鏡のステージ上に設置したチャンバー内に導入した。レーザー捕捉光として CW-Nd:YVO₄ レーザー光(532 nm)を対物レンズ(60 倍、N.A. = 0.70)を用いてチャンバー内に集光し、水滴に働く重力とレーザー光の放射圧のバランスをとることにより、微小水滴を空気中において捕捉することに成功した(図

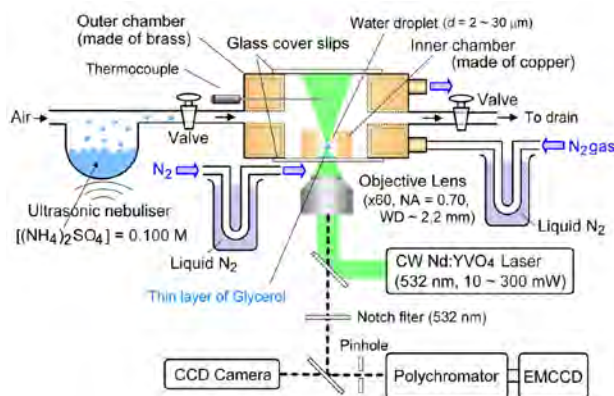


図3. レーザー捕捉・顕微分光システムの模式図

4)。尚、このレーザー捕捉光はラマン励起光源としての役割も兼ねており、捕捉した水滴から発せられる散乱光を同一対物レンズで集光し、捕捉光(532 nm)の散乱をノッチフィルターで除去し、EMCCD光検出器を用いて検出することにより、単一微小水滴のラマンスペクトルの計測が可能である。また、液体窒素を用いて冷却した窒素ガスをチャンバー内部に循環させて、チャンバー内の温度を低下させた。冷却した窒素ガスを対物レンズとカバーガラスの間に吹き付け、水滴近傍の温度勾配を制御することにより、零度以下の温度条件において、気相の温度と湿度の同時制御を実現した。本システムを用いて、室温から-100 °Cの範囲で、雲粒の大きさに相当する直径 2~30 μmの微小水滴を重力に逆らって気相中に浮遊させ、非接触で静止させることが可能となった。

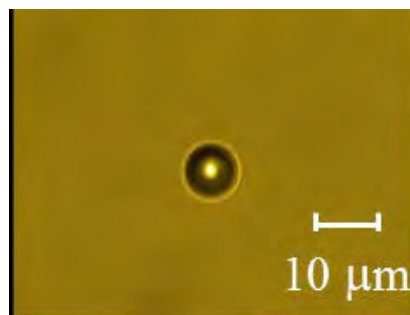


図4. 気相中においてレーザー捕捉された水滴の顕微鏡像(25°C)

研究テーマ B「単一エアロゾル水滴のラマンスペクトルによる溶質濃度の直接計測」

本研究では、自然界の雲粒に含まれる最も代表的な無機化合物の一つである硫酸アンモニウムに着目した。硫酸アンモニウム水溶液を超音波式ネブライザーを用いて気相中に噴霧し、その一粒を気相中においてレーザー捕捉し、ラマンスペクトルの計測を行った(図5参照)。980 cm⁻¹付近に硫酸イオンの対称伸縮振動に帰属される鋭いピークが、3420 cm⁻¹付近

に水のOH伸縮振動に帰属されるブロードなピークが観測される。これらのピーク強度比を用いて、レーザー捕捉した水滴に含まれる硫酸アンモニウム濃度を決定することができる。図5から明らかなように、水滴のラマンスペクトルと母液のラマンスペクトルは必ずしも一致しない。このことは、エアロゾル水滴に含まれる溶質濃度はチャンバー内の相対湿度に依存し、発生に用いる母液濃度には寄らないことを意味する。本システムは、実際にレーザー捕捉したエアロゾル水滴そのものの溶質濃度を水滴個々に直接計測し評価できる大きな特徴を有している。

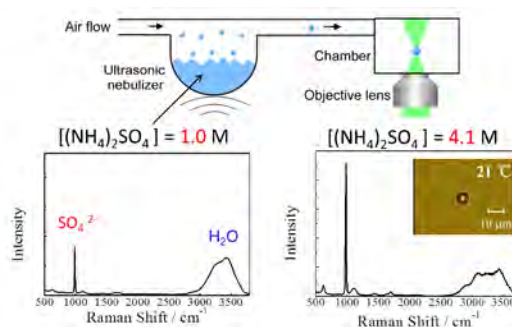


図5. 硫酸アンモニウム水溶液(母液)とレーザー捕捉した水滴のラマンスペクトル

研究テーマ C「レーザー捕捉法を用いた単一過冷却水滴の凍結過程の直接観測」

レーザー捕捉法を用いて硫酸アンモニウムを含む微小水滴を空中の一点に非接触で静止させ、室温から徐々に水滴を冷却したところ、過冷却微小水滴が気相中に浮遊したまま凝固する様子をリアルタイムで観測することに世界で初めて成功した(*Chem. Phys. Lett.*, 2011)。また、凝固後に氷晶が成長し形態が変化する様子も観測出来た(図6)。このように、大気上空の雲の中で実際に起こっている過冷却水滴の凝固と、その後の結晶成長(図1)のモデル実験系を、レーザー捕捉法を用いて光学顕微鏡下に構築することに成功した。

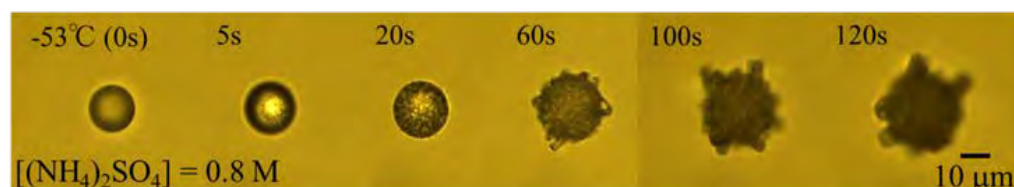


図6. 気相中における過冷却微小水滴の凝固と氷晶の成長

研究テーマ D「過冷却水滴の凝固温度の硫酸アンモニウム濃度依存性」

零度以下の温度条件において湿度を制御し、過冷却水滴の凝固温度の硫酸アンモニウム濃度依存性を調べた(図7)。比較対象として自由落下型の実験手法を用いて報告されている文献値も合わせてプロットした。レーザー捕捉した過冷却水滴のラマンスペクトルから硫酸アンモニウム濃度と凝固温度を精密に計測したところ、エアロゾル微小水滴は従来の予想よりも凍結しにくいことが明らかとなった。過冷却水滴は固体表面と接触した瞬間に凍結してしまうため、従来は、冷却チャンバー内に水滴を落下させ、落下中に水滴を凍結させる実験手法が主に用いられてきた。自由落下型の実験手法は、水滴そのものを直接観測していないために、冷却チャンバー内に水滴を吹き入れた際の水蒸気の凝縮に伴う溶質濃度の低下を評価することが不可能であった。一方、レーザー捕捉・顕微ラマン分光法は、過冷却微小水滴を空中の一点に非接触で静止させ、そのラマンスペクトルから溶質濃度と温度を水滴ごとに直接

評価することが可能である。そのため、真の過冷却水滴の凝固温度の溶質濃度依存性を計測することに成功したと言える。

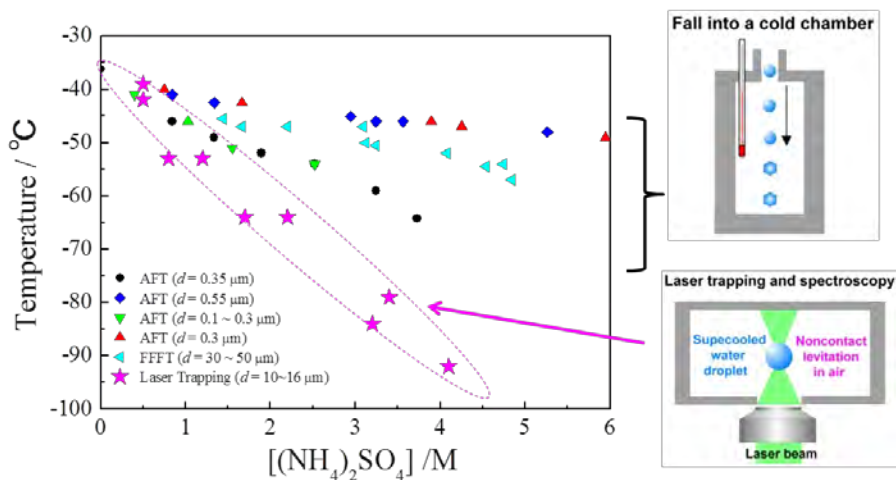


図 7. 過冷却微小水滴の凝固温度の硫酸アンモニウム濃度依存性

3. 今後の展開

雲の中で起こる物理化学過程には未解明の問題が数多く残されている。雲中の水滴には硫酸アンモニウム以外にも様々な溶質が溶解しており、これらの溶質濃度が、降雨の初期過程である過冷却水滴の凝固に影響を与えることが知られている。今後は、過冷却微小水滴の凝固温度を様々な溶質濃度の関数として明らかにすべく研究を展開する予定である。また、溶質濃度が一定の場合、過冷却水滴の凝固温度は水滴のサイズに依存するはずである。レーザー捕捉法を用いれば、単一水滴ごとに凝固温度を計測することが可能であり、水滴サイズ依存性を実験的に明らかにすることが出来ると考えている。水滴の凝固温度が水滴の体積に依存するのか、表面積に依存するのかを調べることが出来れば、氷の核発生が水滴のどの部分から優先的に起こるのかに関する重要な知見を与えることができるものと期待される。

レーザー捕捉・顕微分光法を駆使し、雲物理化学のモデル実験系を構築し、自然界の雲の中で起こる複雑な現象を、反応素過程ごとに理解することは極めて重要であると考えている。今後は、気圧も含めた大気上空の環境を実験室レベルで再現することができれば、本計測法は、雲粒形成・成長・降水過程の詳細な機構解明への有力な分析手法へと発展することが期待される。本研究で開発した気相の温度と湿度を自在に制御する実験手法を駆使して、エアロゾル水滴の物理化学の解明に貢献したいと考えている。

4. 自己評価

零度以下の温度条件においてエアロゾル微小水滴のレーザー捕捉を達成した前例は存在しない。本さがけ研究では、世界に先駆けてレーザー捕捉法を駆使して雲物理化学のモデル実験系を光学顕微鏡下において実現することを目指して研究を進めてきた。気相中に存在するマイクロメートルサイズの微小な水滴は、周りを取り巻く空気の相対湿度や温度を鋭敏に反映し速やかに蒸発してしまうため、冷却チャンバー内の湿度を如何に制御するかが最大の難関であった。冷却チャンバーの改良と実験条件の最適化に3年半の研究期間の大半を費や

したが、零度以下の温度条件において温度と湿度の同時制御可能なレーザー捕捉・顕微ラマン分光システムを新たに構築できたことは最大の収穫であったと考えている。データ数は少ないものの、本システムを用いて計測した過冷却水滴の凝固温度が硫酸アンモニウム濃度に対して明確な依存性を示したことは、本システムの有用性を示す結果であるものと自負している。一方、実験データを蓄積する十分な時間が確保できなかったため、過冷却水滴の凝固温度の水滴サイズ依存性に関する検討は、今後の課題として残された。この点に関しては、今後さらに研究を進めて明らかにしていきたいと考えている。

5. 研究総括の見解

石坂研究者は、雲粒に相当する微小水滴をレーザーで捕捉し物理・化学データを直接取得することを試み、捕捉した液滴の大きさ、含まれる硫酸アンモニウムの濃度、温度などが計測可能となった。さらに、零下 100 度Cまで冷却できる実験装置を開発し、過冷却状態の水滴が氷る凝固温度の硫酸アンモニウム濃度依存を得ることに成功した。すべての計測値が捕捉された水滴一粒から直接得たものであるが、従来の報告値と合わない結果も含まれている。今後は、単一の微小水滴レベルで分光計測・解析する分析技術としてさらに発展させるとともに、得られる物理化学量の意味をよく吟味してほしい。さらに共同研究により、実際の雲の中の水滴ダイナミクスを実験室で実現し、光技術のポテンシャルを示してほしい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. S. Ishizaka, K. Yamauchi, and N. Kitamura, “Laser Trapping and Raman Spectroscopy of Single Aerosol Water Droplets.”, *Bunseki Kagaku*, in press (2013).
2. S. Ishizaka, T. Wada and N. Kitamura “In Situ Observations of Freezing Processes of Single Micrometer-sized Aqueous Ammonium Sulfate Droplets in Air”, *Chem. Phys. Lett.*, **506**(1-3), 117-121 (2011).

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【招待講演】

1. 石坂昌司, “単一エアロゾル微小水滴のレーザー捕捉・顕微分光”, レーザー学会学術講演会第 33 回年次大会, 姫路, 2013 年 1 月.
2. 石坂昌司, “光ピンセットを用いた単一エアロゾル水滴の顕微分光計測—雲や雨の発生機構解明を目指して—”, 日本分析化学会中国四国支部第 49 回分析化学講習会, 徳島, 2012 年 8 月.
3. 石坂昌司, “光ピンセットを用いたエアロゾル微小液滴の物理化学特性の計測”, フロンティアセミナー「粒径別に見るエアロゾル計測」～新研究領域および計測市場の創出を目指して～, 東京, 2012 年 3 月.
4. 石坂昌司, “過冷却微小水滴のレーザー捕捉・顕微分光”, 文部科学省・科研費特定領域研究「高次系分子科学」第 14 回ミニ公開シンポジウム, 北海道大学低温科学研究所共同

利用研究集会合同研究会, 札幌, 2012 年 1 月.

5. 石坂昌司, “レーザー捕捉・顕微分光法のエアロゾル微粒子系への応用”, 長崎ナノダイナミクススクール, 長崎, 2010 年 2 月.

【受賞】

エアロゾル計測賞 (日本エアロゾル学会),
「エアロゾル微小水滴のレーザー捕捉・顕微分光法」
第 27 回エアロゾル科学・技術研究討論会(名古屋), 2010 年 8 月

【解説・総説】

1. 石坂昌司, 山内邦裕, 喜多村昇 “レーザー捕捉法を用いた単一過冷却水滴の凍結過程の直接観測”, 低温科学, **71**, 15-21 (2013).
2. 石坂昌司, “単一エアロゾル微小水滴のレーザー捕捉・顕微分光”, エアロゾル研究, **27**(4), 365-370 (2012).
3. 石坂昌司, “単一エアロゾル水滴のレーザー捕捉・顕微分光”, 光化学, **43**(3), 152-155 (2012).
4. 石坂昌司, “レーザー捕捉法を用いた単一エアロゾル水滴の分光分析”, ぶんせき, **11**, 628-633 (2012).
5. 石坂昌司, “光ピンセットで単一微小水滴を気相中に浮遊させる”, 化学と工業, **64**(3), 230-231 (2011).

研 究 報 告 書

「リモート励起ラマン分光を用いたナノ計測法の開発とその展開」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研 究 者: 雲林院 宏

1. 研究のねらい

生体の様々な巨視的性質を理解するためには、ミクロな世界での化学現象を解明する必要がある。なぜなら細胞全体の機能は個々のタンパク質や各構成組織内及び組織間で起こる化学反応の協同的現象として現れるからである。顕微鏡はミクロな世界での生命現象を可視化する有効な手段であるが、その分解能は「回折限界」により数百ナノメートル(1ナノメートルは10億分の1メートル)に限られる。対照的に、先鋭化したピペットや光ファイバー(導波路)などを細胞内に差し込む「単一細胞内視鏡法」は、細胞に直接触れて調べる(分光する)方法として有力な方法である。この方法は遺伝子導入や薬物輸送の手段としても用いられている。その空間分解能は光学的に露出した先端部のみに依存し、50～100ナノメートル程度が達成される。ところが、ガラスなどを材料に用いた場合、導波路部の径はマイクロメートル(1マイクロメートルは1000分の1ミリ)程度必要であり、プローブの挿入に伴う顕著な細胞損傷が問題となる。近年、半導体ナノワイヤーやカーボンナノチューブを用いた径100～200ナノメートルのプローブが報告され、蛍光分析や生理電気学測定が単一細胞レベルで行われている。これは単一細胞研究の重要性が見直されて来ていることと、ナノスケールの細いプローブを作製する技術が確立してきた結果に他ならない。しかしながら、特に分光に関しては、未だ回折限界に縛られており、分光感度も非常に低い。

本さがけ研究では、細胞の損傷を最小限に抑え、かつ回折限界を超える超高感度な「単一細胞内視鏡法」を、本研究者が2009年に提案したプラズモン導波路を用いたリモート励起表面増強ラマン(RE-SERS)を応用して実現することを目的とした。本手法では、径50ナノメートル程度の銀ナノワイヤーをプラズモン導波路として用いる。表面プラズモンを利用した光導波路は原理的には回折限界に縛られることなく、容易にナノメートルスケールでの光伝搬および集光を可能にする。またプラズモンによる光増強効果により、最大で単一分子を検出する高感度ラマン分光が可能になり、通常のラマン分光では検出できない量の化学物質を細胞内で同定するポテンシャルを有する。そのようなプラズモン光導波路を用いて、単一細胞内での3次元リモートラマン分光を可能にするプラズモン導波路型内視鏡法を開発することを目的として研究を進めた。

2. 研究成果

(1)概要

「単一細胞プラズモン導波路型内視鏡法」の確立を目指し、本研究ではまず、化学合成を用いて質の高いプラズモン導波路の作製を行い、その導波路への光カップリング方法及び効率を評価した。また、作製した導波路を内視鏡プローブに導入する方法を開発した。そのプラズモン導波路プローブを用いたリモートラマン分光顕微鏡を作製し、単一細胞内でのリモートラ

マン分光を実現した。また、本手法をラマン分光のみならず単一分子蛍光分光へも展開した。

(2) 詳細

研究テーマ A 「プラズモン導波路の作製」

本研究では、化学合成で作製した直径50～100ナノメートル、長さ10～20マイクロメートルの銀ナノワイヤーをプラズモン導波路として用いた。化学合成を用いることで、表面が原子レベルで滑らかでかつ格子欠陥の少ないナノワイヤーを作製でき、故に伝搬効率の高い導波路が容易に得られる。本さきがけ研究では、反応の初期段階で反応溶液に可視光を照射することで、ワイヤーへと成長する核形成の収率を高めることに成功した(論文1)。可視光は銀イオンの還元反応には寄与せずに核形成に影響する。また、金属粒子の形状制御のみならずその成長方向をも光をうまく利用することにより制御可能であることも示した(論文2)。これらの結果は光反応の有用性を示す良い例である。

研究テーマ B 「プラズモン導波路の基礎研究」

プラズモン導波路を用いたリモート励起表面増強ラマンは、本研究者が2009年に提案した新たなリモートラマンの方法である(Uji-i et. al. Nano Lett. 2009, 9, 995-1001.)。光共鳴励起による貴金属表面での自由電子の集団電子振動を表面プラズモンという。即ち光エネルギーは電子振動として金属表面に閉じ込められる。表面プラズモンは金属表面を伝搬する性質を有するため、貴金属ナノ構造を光導波路として利用することが可能である。ガラスなどの誘電体物質で作られた導波路とは異なり、金属導波路は光の回折限界に縛られることがないため、その径を波長の10分の1以下(数十ナノメートル)まで減らすことが可能である。また、金属導波路に微細構造を施すと伝搬プラズモンはその構造に局在して、そこでの光強度は劇的に増強される(局在プラズモン)。リモート励起表面増強ラマンは、これらの性質をうまく利用したプラズモン導波路型ラマン分光である。(図1)。

本研究テーマでは、プラズモン導波路への光カップリング効率の向上をはかった。銀ワイヤーの表面プラズモンの光励起は通常ワイヤー先端に励起光を集光することで行われる。本研究で作製したプラズモン導波路プローブでは、銀ワイヤーの一端はタングステン線または他の銀ワイヤーと接触しており、他方の先端はラマン励起に使用されるため、ワイヤー先端からの光励起は不可能である(研究テーマD参照)。また、ワイヤーの中心部では分散関係を満たさないため伝搬プラズモンは励起されない。しかしながら、ワイヤーの中心部に新たに吸着させた銀粒子に励起光を集光することで伝搬プラズモンの励起、即ちプラズモン導波路への光カップリングが可能になる。本研究では、光カップリング効率を間接的に測定する実験手法を開発し、吸着銀粒子の影響を調べた。また、カップリング効率は粒径に依存することも理論的に示した。(論文3)

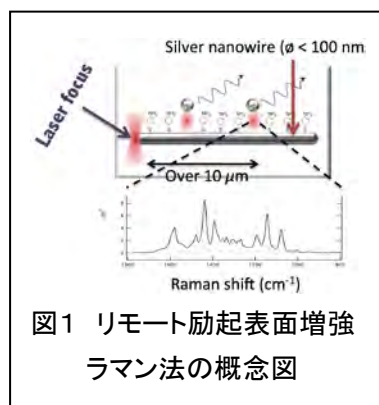


図1 リモート励起表面増強ラマン法の概念図

研究テーマ C 「単一分子蛍光分光への展開」

抗体や受容タンパク質などをプローブ表面に導入することで、細胞内の特定の物質を捉える「選択性を有するプローブ」の作製が可能である。しかし、表面増強ラマン散乱では金属表面近傍1ナノメートル程度に存在する分子のみが検出されるため、抗体や受容体の使用はラマン分光では現実

的でない。対して、表面増強蛍光では金属表面から10ナノメートル以上離れた蛍光分子からの蛍光が強く観測される。即ち、対象タンパク質を蛍光ラベルしておき、その上で「選択性を有するプローブ」を細胞内に挿入し、プラズモン導波路により蛍光励起を行うことで、高空間分解可能でかつ高感度蛍光検出が可能であると考えられる。

本研究では、「選択性を有するプローブ」を用いた「単一分子蛍光検出」の可能性を探るための検証実験を行った。銀ナノワイヤー表面を抗体で修飾し、蛍光タンパク質をナノワイヤー表面に捉えた。蛍光タンパクと金属表面の距離は抗体が間に入ることにより10ナノメートルほど離れている。その上でワイヤー全体を光励起する広視野蛍光顕微鏡法で蛍光検出を行った(図2)。この実験により、抗体で修飾した銀ナノワイヤー表面において、単一分子の蛍光検出が可能であることを実証した。また、金属表面による単分子蛍光の散乱空間分布への影響を理論計算と組み合わせることにより議論した。(論文4)

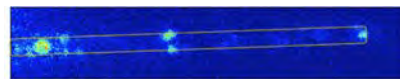


図2 銀ナノワイヤー上での蛍光タンパクの単一蛍光像

研究テーマ D 「プラズモン導波路型内視鏡の作製」

電気泳動法を用いることで、先鋭化した金属探針(例えばタングステン線)の先端に銀ナノワイヤーを捉えることが可能であることは知られているが、この手法ではナノワイヤーの付着力が弱く実用に堪えない。本研究ではワイヤーの付着強度を高める方法を開発し、バッファー溶液中でも銀ナノワイヤーを長時間保持でき、かつ光導波路の機能も完全に保持したプラズモン導波路プローブの作製に成功した。(図3a)

3次元リモートラマン顕微鏡法は、遺伝子操作などに使われるマイクロインジェクション用4軸マイクロマニピュレーターと倒立型共焦点ラマン顕微鏡を組み合わせで作製した(図3b)。リモートラマン分光では、導波路への光カップリングを行うレーザー焦点位置と、ラマン散乱を観測する位置は異なる。銀ナノワイヤープローブを操作する4軸マニピュレーター($X'Y'Z'$ 軸+I 軸)とサンプル位置を調整するピエゾ素子駆動3軸ステージ(XYZ 軸)を用いて、ワイヤー先端の観測点に対する位置とガラ

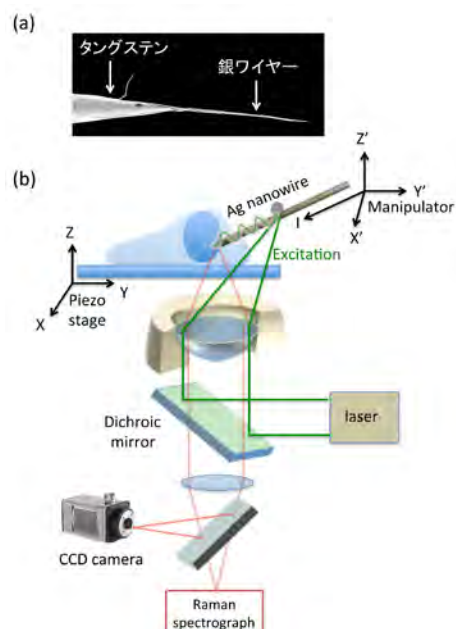


図3 (a) プラズモン導波路型内視鏡プローブ (b) 3次元リモートラマン顕微鏡の概要

基板表面からの高さを調整する。その上で、銀ナノワイヤー上の導波路光カップリング位置にレーザー焦点をあわせる。この時点での全軸の位置は記録する。 X' Y' Z' 及び Z 軸を保持したまま、ワイヤーを I 軸に沿ってガラス表面から遠ざけたうえで、観測したい細胞を観測点まで移動し、ナノワイヤープローブを I 軸に沿って記録位置まで戻すことでワイヤーを単一細胞内に挿入する。このような挿入方法により細胞への損傷は最小限に抑えられ、かつワイヤー先端の細胞に対する位置の制御も正確に行われる。径50ナノメートル程度の銀ワイヤーを用いた場合、挿脱入を繰り返しても、細胞膜の泡状化や細胞の縮小、形状変化、他細胞からの剥離などの顕著な細胞死の兆候は観測されなかった。また、挿入した状態で数時間放置した場合にも細胞死は観測されなかった。このことから細胞膜の損傷は最小限に抑えられており、細胞からのタンパク質や細胞構成組織の漏れも最小であると考えられる。反して径100～150ナノメートル以上の銀ワイヤーを用いた際には、細胞膜貫通が困難な場合が多く、挿入後1時間以内に細胞壊死が観測される場合もある。

研究テーマ E 「単一細胞におけるリモートラマン分光」

本研究で作製した銀ナノワイヤープラズモン導波路プローブを用いて、生きた He-La 細胞内でのリモートラマンを試みた。図4a は、He-La 細胞の核内に銀ナノワイヤーを挿入した状態の透過光像である。銀ナノワイヤーは、透過光像では黒い陰として現れている。ワイヤーが円錐状に見えるのは、ワイヤーはガラス表面に対して30度から40度程度の傾きをもって細胞に挿入されているためである。実際のナノワイヤー径は全領域にわたって100ナノメートル以下である。図4b は同領域のラマン像である。

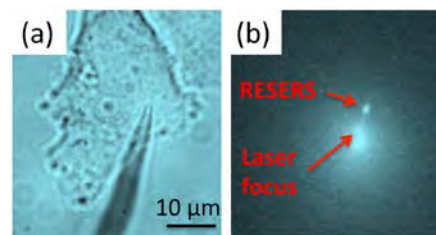


図4 He-La 細胞内におけるリモートラマン分光の透過光像(a)とラマン像

図に矢印で示した通り、銀ワイヤーへの光カップリングは、細胞の外側のワイヤー中心部にレーザー光を集光することで実現した。ワイヤーの先端部からのラマン散乱を観測した結果、細胞核内に存在するプロテインなどからと考えられるラマン散乱が観測された(論文発表予定)。細胞内で表面増強ラマンを行う際には、金属粒子のプラズモン由来の発熱の細胞への影響が最も懸念される。レーザー光を銀ワイヤー先端に集光してラマン散乱を同箇所から観測する直接励起ラマン(通常の励起方法)を細胞内で行うと、測定直後から直ちに細胞死の兆候がしばしば観測される。反して、リモートラマンを用いた場合には、細胞死が引き起こされる率は格段に低くなる。本研究での測定では多くの場合、細胞死は観測されなかった。

3. 今後の展開

本研究では、径100ナノメートル以下の金属ナノワイヤーを内視鏡プローブに導入する方法を最適化し、3次元リモートラマン計測法を確立した上で、生きた細胞内でのリモート励起ラマン分光を初めて実現した。今後は、リモートラマン計測法の応用展開として、ドラッグデリバリーシステムの基礎研究を行う。ドラッグデリバリーを内視鏡プローブで行うことで、ドラッグによる効果を導入量や導入箇所などの情報をもとにリモートラマンを用いながら評価することが可能となる。また、リモートラマンにとどまらず、「選択性を有するプローブ」を用いた細胞内での「リモート単一

「(生体)分子蛍光検出」の実現や、リモート励起を用いた局所プラズモン発熱などへ研究を発展させる。

4. 自己評価

近年、単一細胞レベルでの研究の重要性が見直され、かつそれを可能にする技術が確立してきた。本研究者は、貴金属ナノワイヤーを光導波路として利用したリモート励起表面増強ラマン分光法を2009年に提案し、その後さがけ研究においてプラズモンリモートラマンの単一細胞ラマン分光法の確立およびその応用展開を目標に掲げた。その結果、世界で最も細い導波路プローブを用いた非常に感度の高いリモートラマン内視鏡法を確立した。本研究で開発したプラズモンリモートラマン計測法は化学物質に関する情報を直接得ることが可能性であるため、これまで報告された手法以上のポテンシャルを有している。ラマン分光や蛍光分光などを組み合わせることで、本さがけ研究は単一細胞研究に新たな展開をもたらす可能性があると考えられる。

5. 研究総括の見解

化学合成により銀ナノワイヤー作製し、それをプラズモン導波路として機能させるための光カップリング効率を検討し、自ら提案したリモート励起表面増強ラマン法を実証した。径 100 ナノメートル以下の銀ナノワイヤープローブを4軸マニピュレーターに装着し、生きた He-La 細胞内に挿入し、細胞外部の銀ナノワイヤー中心部にある光カップリング部にレーザー光を照射して、細胞内に存在するプロテインなどからのラマン散乱を観測することに成功した。光技術の粋を集めたこの計測法が実際に生命機能の研究分野で使われていくものと期待する。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Lin, H., Ohta, T., Paul, A., Hutchison, J., Demid, K., Lebedev, O., Van Tendeloo, G., Hofkens, J., Uji-i, H. Light-assisted nucleation of silver nanowires during polyol synthesis. Journal of Photochemistry and Photobiology A, Chemistry, 2011, 221(2-3), 220-223.
2. Paul, A., Kenens, B., Hofkens, J., Uji-i, H. Excitation Polarization Sensitivity of Plasmon-Mediated Silver Nanotriangle Growth on a Surface. Langmuir, 2012, 28(24), 8920-8925.
3. Kenens, B., Rybachuk, M., Hofkens, J., Uji-i, H. Silver Nanowires Terminated by Metallic Nanoparticles as Effective Plasmonic Antennas. Journal of Physical Chemistry C, 2013, 117(6), 2547-2553.
4. Lin, H., Centeno, S., Su, L., Kenens, B., Rocha, S., Sliwa, M., Hofkens, J., Uji-i, H. Mapping of Surface-Enhanced Fluorescence on Metal Nanoparticles using Super-Resolution Photoactivation Localization Microscopy. ChemPhysChem, 2012, 13(4), 973-981.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

- (i) Energy Materials Nanotechnology (EMN) 2012 meeting (USA)
“ Mapping of Surface-Enhanced Fluorescence on Metal Nanoparticles using Super-Resolution Photoactivation Localization Microscopy (SEF-PALM)”
- (ii) European Materials Research Society 2012 fall meeting (Poland)
“Visualization of point spread function of single molecule fluorescence in the vicinity of metal nano-structure“
- (iii) BIT' s 3rd Annual World Congress of Nanomedicine-2012 (China)
“Light controlled silver nanoparticle growth and super-resolution fluorescence imaging in vicinity of metal surface”

口頭発表

- (i) 3rd EuChemMS Chemistry Congress 2010 (Germany)
“Sub-diffraction limited remote excitation surface enhanced Raman scattering (RE-SERS)”
- (ii) European Materials Research Society 2012 spring meeting (France)
“Excitation light coupling on metal nanowires via surface plasmons”
“Mapping of Surface Enhanced Fluorescence on Metal Nano-particles using Super-resolution Photo-activation Localization Microscopy”
“light-controlled silver nanoparticle growth direction”
- (iii) European Materials Research Society 2012 fall meeting (Poland)
“Optical Characterization of Silver Nanoparticle-Nanowire Hybrid Structure as a Plasmon Antenna”
“Visualization of point spread function of single molecule fluorescence in the vicinity of metal nano-structure“
- (iv) IUPAC photochemistry 2012 (Portugal)
“Measuring Surface-Enhanced Fluorescence on Metal Surface by means of Sub-diffraction fluorescence Microscopy”

研究報告書

「量子相関光子による光化学反応制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 岡 寿樹

1. 研究のねらい

光を量子論的な観点から見ると、その性質は大きく「量子コヒーレンス」と「量子相関」の二つに大別できる。量子コヒーレンスは光の「波」としての性質を特徴付けるもので、その最も良く知られた応用例はレーザーである。一方、「量子相関」は光の「粒子」的な性質を表し、光子間の相関を特徴付けるものである。近年、量子情報技術の発展に伴い、光の量子相関の重要性が注目されるようになった。特に、上記2つの性質を合わせ持つ「量子もつれ光子」は、量子テレポテーションなど、レーザー光では実現できない新奇な物理現象(とその応用)を提供してきた。しかし、そのほとんどが量子情報技術に特化されたものであり、物質材料や分子・生命科学への応用が議論され始めたのは、非常にごく最近のことである。実際、近年、分子科学の分野で注目を集めている量子制御・コヒーレント制御技術も、化学反応の制御等に大きな成果を上げているが、その理論はレーザー光に立脚したものであり、光の量子性の観点から言えば量子コヒーレンスだけを利用したものである。

本研究のねらいは大きく分けて2つあり、一つは(1)光のもう一つの自由度、量子相関を既存の光化学反応制御法に加味することで、量子制御の更なる高効率化を実現し、光の量子性の全てを利用する分子制御理論を構築することである。もう一つは(2)光の量子もつれ状態(量子もつれ光)を光反応制御法に応用することで、従来のレーザー光では実現できない(既存の制御法にはない)新しい光励起エネルギー移動制御法を確立することである。特に項目(2)に関連して、近年、光合成系における量子コヒーレンスや量子もつれの存在を示唆する研究結果が報告されており、その高速エネルギー移動への寄与が議論されはじめている。しかし、これらの先行研究ではエネルギー移動における量子もつれの役割は解明されていない。本研究では、光合成系における光励起エネルギー移動における量子もつれの役割を明らかにし、量子もつれ光を用いてその能動的な制御を試みる。これにより光の量子論に基づく新しい光化学反応場とエネルギー移動制御理論の構築を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

量子制御(あるいはコヒーレント制御)は、光による化学反応・分子過程制御の可能性を秘めており、近年注目を集めている制御法である。化学反応への応用における重要なポイントは、化学反応の引き金となるターゲットの電子状態を如何に選択的かつ効率的に励起できるかにある。一般的に緩和過程(例えば分子系の分子内振動再分配など)は分子内に励起された振動電子状態のコヒーレンスを破壊する原因となるため、それを回避するよう励起光として短パルス光を用いることが有効になる。しかしその一方で、不確定性関係により、短パルス化

はスペクトル広がりを引き起こす。この結果、超短パルスではターゲット以外の振動電子状態も励起してしまい、励起効率は上昇するが励起選択性は低下してしまう。このような不確定性に起因する制限を打破し、選択励起を増強させるため、2光子(多光子)励起を用いたコヒーレント制御法が提案され、これまで精力的に研究されてきた(光イオン化、光異性化反応など)。これらの制御法はいずれも物質量子状態における干渉効果を利用することで高い選択性を達成しており、入射光パルスの位相を制御することで実現される。しかし一般的には生成されるパルスの波形が複雑になるため、化学反応素過程の解明には向かないという欠点があった。

本研究では、光の量子相関を加味することでこの問題を解決し、分子振動電子状態の“効率的励起と選択的励起を同時に実現する”2光子励起が可能であることを明らかにした。具体的には、2光子吸収と分子内部転換を例に、その効率の増強と選択性の向上を実現する2光子状態の条件を明らかにした。また紅色光合成細菌における光捕集体 LH2 の B800-B850 間の光励起エネルギー移動の解析を行い、光合成系におけるエネルギー移動に「量子もつれ」が存在し、それがどのような寄与しているのかを明らかにした。この結果は、本研究のねらいである量子もつれを用いた新しいエネルギー移動制御理論の構築の可能性を示唆する大きな一歩である。

(2) 詳細

研究テーマA 「量子相関光子の「同時性」を利用した効率的選択2光子励起法の構築」

一般的にレーザー光源から放出される光子間には相関が存在しない。しかし、このような無相関な2光子を物質に作用させ、強い非線形光学過程を利用すると、負のエネルギー相関(同時性)を持つ量子相関光子対が生成できる。本研究テーマでは、このように生成された量子相関光子がどのような2光子量子状態を持つとき、効率かつ選択的な2光子励起を実現するかを解析し、その励起法の理論的枠組みを構築することに成功した。図1は2原子分子系における振動電子状態励起のダイナミクスを、レーザーパルス(図1b)と量子相関光子(図1c)をそれぞれ駆動光として同じ条件で計算した結果である。励起効率を比較した結果、量子相関光子による励起効率はレーザーパルスのそれより高いことが分かる。量子相関光は、通常のレーザー光と異なり、パルスの特徴付けるパルス幅が2つ存在する(成果リスト4)。2光子間の同時性が高く、かつパルス幅が長くなるように量子相関を制御することで、励起効率をレーザーパルスの10倍以上増強させ(原子系では100倍以上(成果リスト5))、かつ特定の分子振

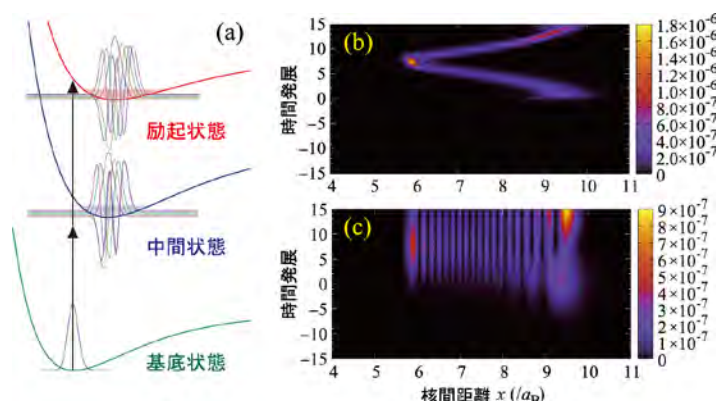


図1. 量子相関光による分子振動電子状態の選択2光子励起。(a) 振動電子状態励起の概念図。振動波束は振動電子状態の固有モードの重ね合わせ状態として生成される。(b) レーザーによる2光子励起。(c) 量子相関光子による2光子励起。(b)では分子振動の単一固有モードだけを選択的に励起されている。

動電子状態の固有モードだけを狙った選択励起が可能であることが分かった(成果リスト2, 3)。分子内振動波束は固有モードの重ね合わせ状態であることから、原理的には任意の振動波束を形成することが可能になる。光反応は分子励起状態が引き金となって引き起こされるため、本研究テーマで構築した励起法は、新しい光反応制御法へと繋がる重要な結果である。

研究テーマB「時間遅延量子相関光子による分子内部転換の効率的励起法の構築」

光合成系における光化学反応制御など、より複雑な分子系では、振動エネルギー準位が密になるため内部転換や系間交差のような非輻射過程を介した2段階励起の分子過程の制御が重要になる。このような過程では、研究テーマAで議論した2光子吸収において求められる2光子間の「同時性」よりも、むしろ時間遅延をもつ「段階的な」2光子励起が重要となる。本研究テーマでは、量子相関光子に時間遅延の自由度を加え、振動電子状態と量子相関光子との相互作用における分子振動緩和の影響を解析することで、その2段階励起法の構築に成功した。

図2は分子内部転換のダイナミクスを、レーザーパルスと量子相関光子をそれぞれ駆動光として量子相関以外は同一条件で励起した解析結果であり、形成される振動波束の形状が全く異なることが分かる。励起効率を比較した結果、研究テーマAと同様、量子相関光子が効率良く分子振動電子状態を励起することが分かった(増強はレーザーパルスの数倍程度)。この結果から、2光子吸収過程と比較するとやや効率は落ちるが、非輻射過程を介した分子過程においても量子相関による効率的選択励起が可能であることを明らかにした(成果リスト1)。

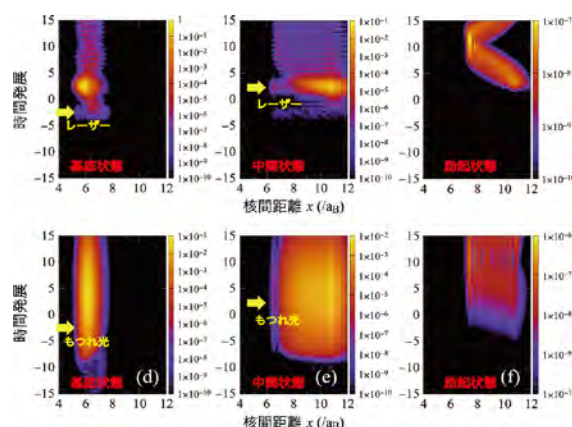


図2. 分子内部転換のダイナミクス。レーザーパルスによる励起(上段)と量子相関(もつれ)光による励起(下段)。量子相関により、2光子吸収同様、分子固有モードの効率的かつ選択的な励起が可能となる。

研究テーマA、Bで構築した2つの励起法を組み合わせることで、複雑な分子系における振動電子状態の励起制御への応用が可能となり、量子相関という自由度を加味した新しい量子制御法の可能性が拓けた。

研究テーマC「光合成系光励起エネルギー移動反応における量子もつれの役割」

本研究テーマにおける最終的な目標は、研究テーマA、Bで構築した制御法を応用して、レーザー光では実現できない光励起エネルギー移動の制御理論を構築することにある。一般的にエネルギー移動の時定数を解析する際には、フェルスターの公式(およびその拡張公式)が広く用いられる。しかし、フェルスター理論の枠組みの中には量子もつれは存在しない。そのため、まず光合成系光励起エネルギー移動における量子もつれの存在を示し、その役割を明らかにする必要がある。本研究テーマでは、2種類の紅色光合成細菌における光捕集体 LH2 の B800-B850 間の光励起エネルギー移動を解析し、量子もつれが存在すること、またその量子もつれが引き起こす高速エネルギー移動のメカニズムを明らかにした。

図3は、熱雑音のない理想的な状況における光励起エネルギー移動に形成される量子もつ

れ度(a,b)と準位数ダイナミクス(c,d)の解析結果であり、強い量子もつれが形成されている量子準位ほど、エネルギー移動が速いことが分かる。計算結果から、最も強い量子もつれが形成される準位では、約 100fs の時定数で高速にエネルギー移動が生じていることが分かる。さらに興味深いことに光学許容遷移である準位では、量子もつれがほとんど形成されておらず、光励起エネルギー移動に寄与しないことが分かる。この結果から、光合成系ではドナーのエネルギー準位において、光の吸収とエネルギー移動が機能的に綺麗に分離されていることが示唆される。さらに、エネルギー移動過程にも光学遷移のようなドナーアクセプター準位間選択則があることも分かった。これまでに光励起エネルギー移動に量子もつれが関与している可能性を示した研究はあるが、量子もつれ度、時定数、選択性を明らかにしたのは本研究が初めてである。本研究テーマで得られた結果は、エネルギー移動における量子もつれの役割を明らかにしており、エネルギー移動制御の可能性を示唆する大きな一歩である。

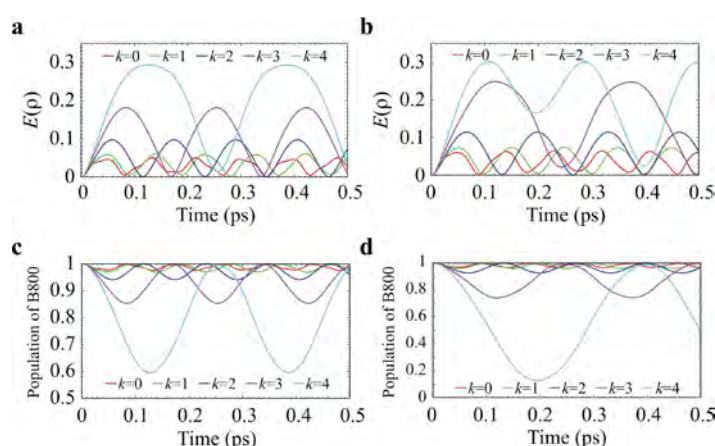


図3. 光合成系エネルギー移動における量子もつれ度(a,b)とエネルギー移動のダイナミクス(c,d)。a,cは紅色光合成細菌 *Rhodospseudomonas acidophila*、b,dは *Rhodobacter sphaeroides* に対する解析結果。ともに高い量子もつれ度 ($E \approx 0.3$) を示しており、約 100-200fs の高速でエネルギー移動が生じていることが分かる。

3. 今後の展開

光合成系に量子もつれが存在すること、またその量子もつれが引き起こすエネルギー移動の時定数を明らかにしたことから、量子もつれ光子を駆動光としたエネルギー移動制御の可能性が拓けた。また高速エネルギー移動における量子もつれの寄与とそのメカニズム(ドナーにおける吸収とエネルギー移動の機能分離、対称性に基づくドナーアクセプター間エネルギー移動の選択性など)を明らかにしたことから、人工光合成系など、工学的な応用に求められる物質デザインの指標も得られた。実際、高速エネルギー移動を実現するために物質に求められる条件は、本研究の解析からそれほど複雑なものではないことが明らかになり、量子ドットやその他のナノ構造体を用いての模倣が可能であることが分かる。今後の展開としては、まず、量子もつれ光によるエネルギー移動制御理論を構築することであり、さらには物質デザインを含め、様々な物理系での人工デバイス化の可能性を追求していきたい。

4. 自己評価

本研究の最終ゴールは、量子もつれ光による光励起エネルギー移動の高効率化とその制御法を構築することであった。残念ながら研究期間内にその構築までには至らなかったが、必

要な物理現象の解析とその解明はほぼ全て終わっている。また、本研究で取り扱った光合成系は、紅色光合成細菌の一種における B800-B850 間エネルギー移動機構の解明だけではないが、工学的応用の観点から言えば、分子系が持つべき構造、光学的特性、量子状態の対称性など、これまで知られていなかった物理が本研究で明らかになったのではないかと考えている。これによって、光合成系エネルギー移動の研究を従来の化学・生物学的な研究から、物理学者・工学者が参入できる研究対象へとその裾野を広げることにより寄与できたのではないかと考えている。そういった点までを考慮すれば、本研究成果には大きな意義があったと考えている。

5. 研究総括の見解

量子相関が化学反応の効率化に役立つかどうかを明らかにする「分子制御理論の構築」や、光合成における量子もつれの役割を明らかにする「量子論に基づく光化学反応場」と「エネルギー移動制御理論」の構築を目指した。その結果、量子相関制御により 2 光子励起の高効率化や選択性向上が可能であることを明らかにした。さらに、光合成に関しては、エネルギー移動に量子もつれが存在し、高速なエネルギー移動に寄与していることを明らかにした。これは従来の Förster メカニズムによる理解を超える画期的な成果を示唆するものであり、今後の量子相関光の工学的利用への新たな活用指針を提供することが期待できる。さらなる研究の発展を目指してもらいたい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Hisaki Oka, “Two-photon process via internal conversion by correlated photon pairs,” Physical Review A 85, 013403 (2012)
2. Hisaki Oka, “Control of vibronic excitation using quantum-correlated photons,” The Journal of Chemical Physics 135, 164304 (2011)
3. Hisaki Oka, “Selective two-photon excitation of a vibronic state by correlated photons,” The Journal of Chemical Physics 134, 124313 (2011)
4. Hisaki Oka, “Efficient selective two-photon excitation by tailored quantum-correlated photons,” Physical Review A 81, 063819 (2010)
5. Hisaki Oka, “Real-time analysis of two-photon excitation by correlated photons: Pulse-width dependence of excitation efficiency,” Physical Review A 81, 053837 (2010)

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際学会 2 件、国内学会 12 件

【招待講演】

1. 岡 寿樹, “相関光子による電子状態の選択励起,”



2011 年秋季 第 72 回 応用物理学会学術講演会, 山形大学 2011 年 8 月

2. 岡 寿樹, “量子相関光子による2光子励起,”

2011 年春季 第 58 回 応用物理学関連連合講演会, 神奈川工科大学 2011 年 3 月

研究報告書

「光応答性核酸による単一細胞内での光遺伝子制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 小笠原 慎治

1. 研究のねらい

本研究のねらいは、新しい光応答性化合物を創生し、生きた単一細胞内でタンパク質の発現様態を自在に光操作する方法を開発することである。生命現象を単一細胞レベルでみると、タンパク質が発現するタイミングや場所さらには周期で巧みに制御されていることが分かってきた。例えば、発生初期段階の細胞において局所発現するタンパク質によって頭と尻尾の方向(体軸)が決定されたり、神経細胞において刺激を受けたシナプスだけで局所発現するタンパク質によって記憶が増強される。また、我々が24時間を感じられるのは24時間周期で発現するタンパク質があるからである。このようなタンパク質の発現様態が引き起こす生命活動をより詳細に調べ利用するには、細胞内で起こっているタンパク質発現様態を人工的に操作する方法が必要である。現在のようにただ遺伝子を入れるだけでもしくは完全に破壊するだけの操作では、タンパク質が細胞中で恒常的に発現するか全く発現しない状態しか作り出せない。近年急速に発展している光遺伝学をもってしても、原理上転写段階しか制御できないため、単一細胞内でタンパク質の発現様態を自在に操作することは困難である。ただ、時間空間制御をおこなうにおいて光が最も優れた外部刺激である、ということは間違いない。mRNA からタンパク質への翻訳段階を光制御した例が2001年に報告されているが、不可逆であったためタンパク質発現様態を操作するには不十分であった。そこで、本研究では、翻訳段階を可逆的に光制御するための新しい光応答性分子を創生し、生きた単一細胞内でタンパク質の発現様態を自在に光操作する方法を開発する。現段階で類似の研究を行っている研究者はおらず、この方法が確立すれば、世界で初めて生きた単一細胞内でタンパク質の周期的発現や局所的発現を人工的に操作することが可能になると期待された。

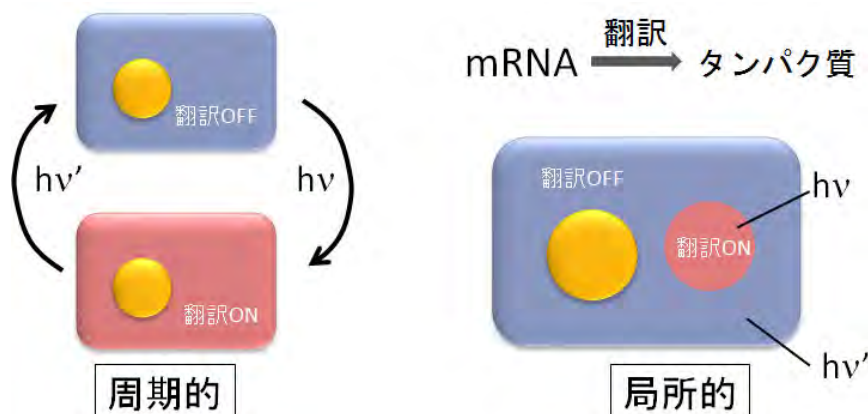


図1 本研究で目指すタンパク質発現様態の光操作

2. 研究成果

(1) 概要

mRNA からタンパク質への翻訳を光で可逆的に制御するための光応答性の7-メチルグアノシン (cap) を有機合成により創生し、細胞内でタンパク質の発現を光でスイッチングする方法を開発した。この方法を使い、これまでの方法では制御が困難であった生細胞内におけるタンパク質の周期的および局所的な発現を光で誘導することに世界で初めて成功した。また、本方法を細胞機能の光制御へ応用するため、可視光で制御できる新しい光応答性 cap を開発した。

(2) 詳細

研究テーマ A「研究テーマ翻訳を可逆的に制御するための新規光応答性分子(光応答性 cap)の創生」

mRNA の 5' 末端には cap が付加されている。翻訳が起こる最初のステップで cap に翻訳開始因子 eIF4E が結合する。その後、複数の因子が mRNA に連鎖的に結合し、最終的にリボソームが mRNA へ誘導されタンパク質が合成され始める。この翻訳初期過程で重要なのは最初の cap と eIF4E の結合であり、この結合なくして翻訳は起こらない。そこで図2に示すような光応答性 cap を考えた。この光応答性 cap は本課題が始まる以前に開発したフォトクロミック塩基(S. Ogasawara et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* (2008))を基に合成した。3D 分子モデリングから、光応答性 cap が trans 体の時は立体障害により eIF4E と結合できないが、cis 体では立体障害が解消され eIF4E と結合できるという知見を得た。光応答性 cap の X の部分にどの程度の大きさの芳香族化合物を導入すれば cis-trans 異性化で効果的な翻訳制御ができるのかを調べるため、フェニル基からピレニル基まで段階的に大きさを変えた4種類を合成した。合成した光応答性 cap を無細胞転写系で蛍光タンパク質(Venus)をコードする mRNA の 5' 末端に導入した。mRNA をマイクロインジェクションで HeLa 細胞へ注入し cis 体と trans 体の時に発現するタンパク質の量を蛍光強度から比較した。結果、3D モデリングが示唆したように trans 体より cis 体の方がタンパク質の発現量が多く、フェニル基を導入した光応答性 cap においてその差はおよそ 60 倍であった。また、ナフチル基以上の大きさになると、cis 体であっても嵩高すぎて eIF4E と結合できず翻訳が起こらないことが分かった(論文1)。

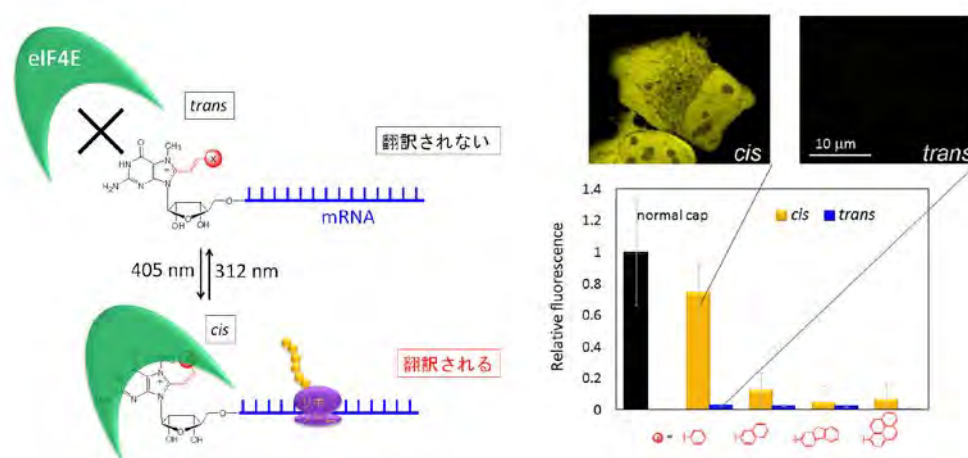


図2 光応答性 cap の異性化を利用した翻訳の光制御法

研究テーマ B「単一細胞内でタンパク質の周期的発現および局所的発現を光誘導」

研究テーマ A の結果を踏まえて以降はフェニル基を導入した光応答性 cap を用いることにした。まず初めにタンパク質の周期的発現を光操作することを試みた。周期的発現を見るために半減期が2時間程度になるよう特殊なアミノ酸配列を付加した蛍光タンパク質の発現を制御することにした。光応答性 cap が trans 体である翻訳されない状態の mRNA を HeLa 細胞へマイクロインジェクションし、405 nm の光を30秒、312 nm の光を20秒、2時間半の間隔で照射した。結果、405 nm の光を照射した直後から蛍光が増し、312 nm の光を照射すると徐々に減っていく様子が観察された。つまり、翻訳を可逆的に光制御し、タンパク質の発現を周期的に操作することに成功した(図3)。さらに、周期発現の間隔を容易に変化させられることも示すことができた。

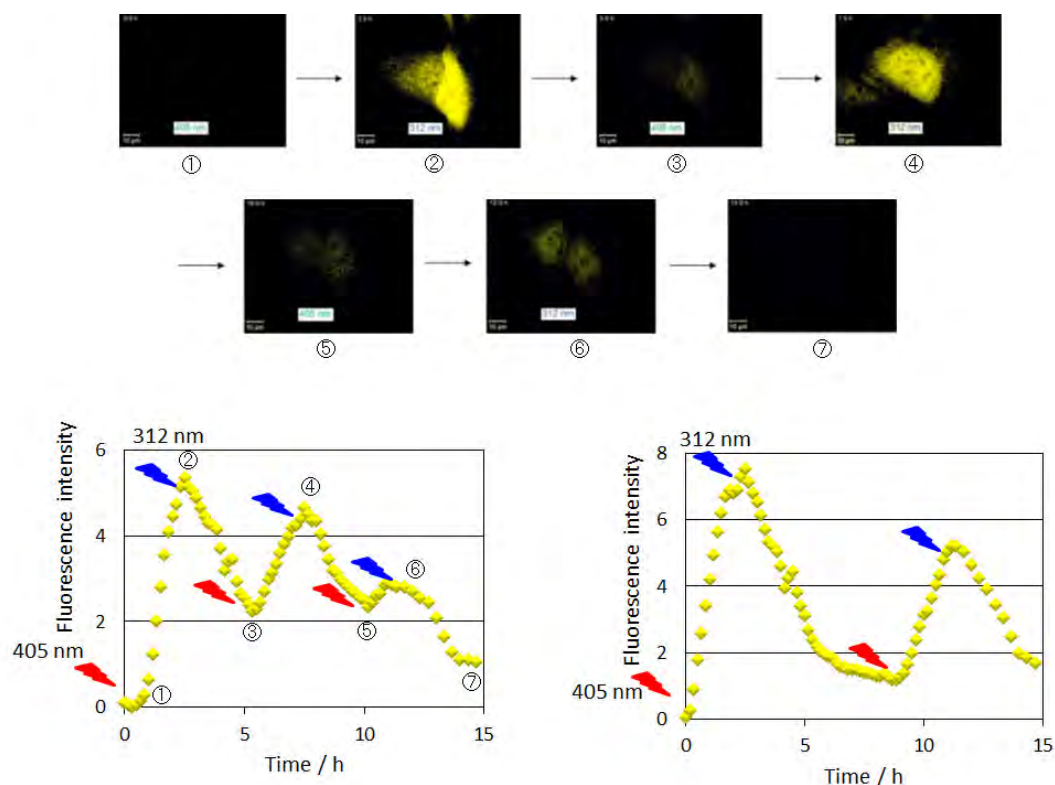


図3 翻訳の光制御法で蛍光タンパク質を周期的に発現させた例

続いて、単一細胞内でタンパク質の局所的な発現を光誘導する実験を行った。ただの蛍光タンパク質を局所的に発現させても瞬時に拡散してしまい、局所発現を観測できないため、微小管に結合する tau タンパク質を蛍光タンパク質に融合させることにした。こうすることで局所発現した蛍光タンパク質を発現場所付近の微小管に固定することができる。タンパク質を発現させたい場所に 405 nm のレーザーを10分間照射すると同時に細胞全体に 312 nm のバックライトを断続的(5分毎)に20秒間照射すると、405 nm のレーザーを照射した部位のみから新しい蛍光が観測された(特許1)。同様の実験を mRNA をインジェクションしていない細胞で行っても変化は見られないことから、新たに観測された蛍光が局所的に発現した蛍光タンパク質由来であると結論づけられた。

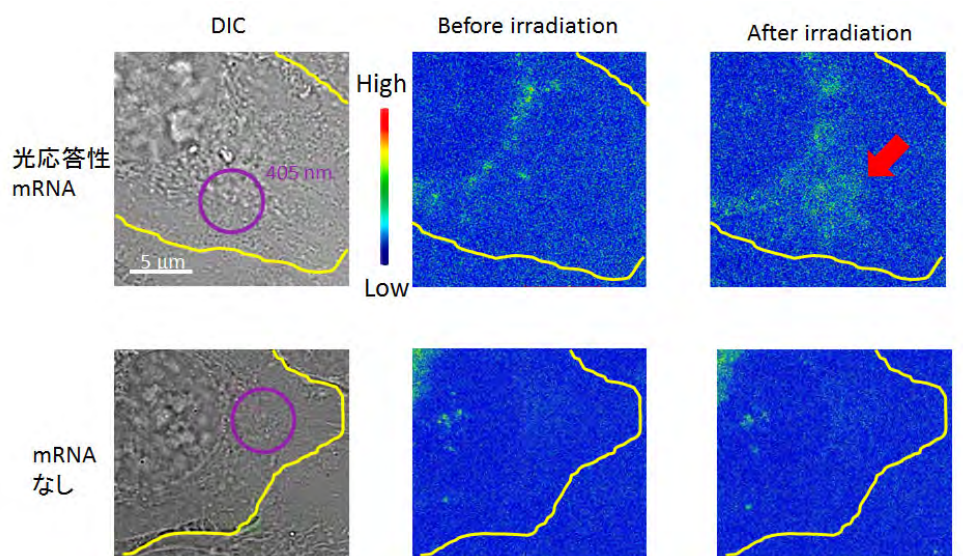


図4 翻訳の光制御法で蛍光タンパク質を単一細胞内で局所的に発現させた例

研究テーマ C「可視光に応答する光応答性 cap の創生」

翻訳の可逆的光制御法を用いてタンパク質の発現様態(周期的、局所的)を光操作することに成功したが、ここで用いた光応答性 cap は異性化に紫外光を必要とし、特に 312 nm の光は細胞にとって有害である。そこで、細胞に毒性の少ない可視光領域の光で異性化させられる光応答性 cap の開発に取り組んだ。具体的にはこれまでオレフィンリンカーで芳香族化合物を導入していたところをアゾリンカーに変更した。こうすることでより長波長を吸収する $n\pi^*$ 遷移によって異性化させられると考えた。実際に trans 体から cis 体へは 460 nm の光で、cis 体から trans 体へは 550 nm の光で異性化させられるようになった(論文2)。この光応答性 cap は cis 体の安定性が低く数秒以内に trans 体へ戻った。つまり、460 nm の光を照射している間だけ cis 体で存在し、翻訳が起こることになる。蛍光タンパク質の発現を光制御した結果、460 nm の光照射時間に依存して発現量が増していくことを確認した(図5)。

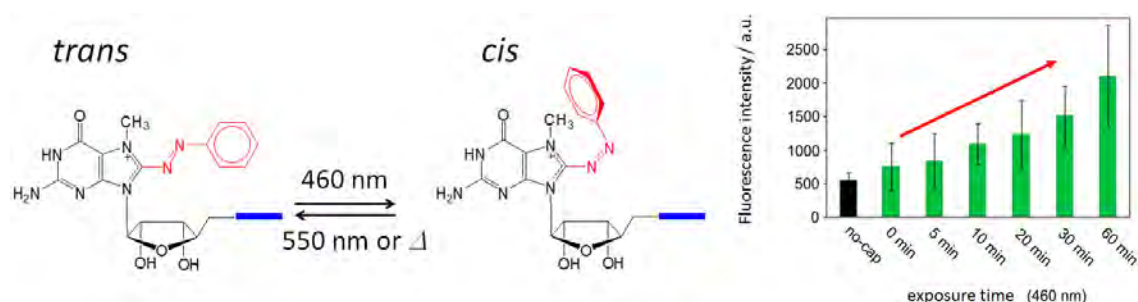


図5 可視光で異性化させられる光応答性 cap

3. 今後の展開

プロトタイプではあるが、現時点で単一細胞内でタンパク質の周期的発現、局所的発現を操作できる方法は本課題で開発した方法が世界唯一である。今後は光応答性 cap の改良と細胞機能操作への応用を並行して進めていく予定である。cis 体が熱的に安定なアゾ型光応答性 cap や二光子励起できる光応答性 cap を開発し、核酸などの生体分子や細胞に損傷を与えない領域の光でタンパク質の発現を操作できるようにする必要がある。応用先として再生医療や神経科学を考えている。試験管内臓器製造における難題の一つにいかにして複数種の細胞からなる細胞塊(組織)を作るかがある。本課題で開発したタンパク質発現の光操作法を用い、分化誘導因子を多能性幹細胞集団の個々の細胞ごとに異なったパターンで発現させ別々の細胞へと分化誘導し一つの多能性幹細胞集団から直接体内の組織と同じ組成の細胞集団を作りだせる可能性がある。また、未だにそのメカニズムが殆ど分かっていない記憶について、この光操作法を使えば、記憶が作られ増強される状況(タンパク質の局在)を人工的に再現することができ、より深い理解に繋がると期待される。もっと先を見据えれば、生きた細胞内で光応答性 cap を目的の mRNA のみに付加するシステムを構築し、光応答性 cap を培地に添加する(もしくは生体に注射する)だけで目的のタンパク質の発現を光操作できるようにしようと考えている。そうすることで、誰でも簡単にこの方法を使えるようにしたい。

4. 自己評価

本課題の目標は生きた単一細胞内でタンパク質の発現様態(周期的、局所的)を人工的に光誘導する方法の開発であった。研究期間内に新しい光応答性分子(光応答性 cap)の創生に成功し、世界で初めて mRNA からタンパク質を合成する過程を可逆的に光制御する方法を確立することができた。さらに、その方法を用い生きた単一細胞内でタンパク質の発現を周期的にまた局所的に光操作することに成功した。このことから当初の目標は達成したと言える。ただ、この方法はまだプロトタイプであり、応答波長の改善など課題は残った。また、この方法を神経細胞の突起伸長の光誘導に応用したが、再現性がとれず失敗に終わった。突起が目に見えて伸長するには数時間かかり、その間に局所的に発現させたタンパク質が拡散してしまった可能性があること、プロトタイプでは10分間しか局所的な発現を引き起こせず伸長を誘起するにはタンパク質の量が不十分であったこと、などの原因が考えられる。当初の目標のさらにその先へ到達することはできなかったが、生きた細胞内でタンパク質の発現を自在に操作できる方法はこの方法が世界唯一であり、今後あらゆる生命科学研究に寄与するものと考えられる。

5. 研究総括の見解

光の照射により、タンパク質発現を自由にコントロールできる手法の開発を試みた。タンパク質の発現は翻訳開始因子(eIF4E)が mRNA の 5' 末端にある7-メチルグアノシン(cap)に結合することから始まる。eIF4E と結合できないトランス体と結合できるシス体を波長の異なるレーザー光を照射することにより可逆的に変化させることできる cap 分子の開発に成功した。これにより、光制御によって蛍光タンパク質の発現量を周期的に制御することや、細胞内の特定の場所にのみ発現させることが可能であることを実証した。他に例のないタンパク質発現の可逆的光制御法を提案し実証したことは、「さきがけ」研究らしいチャレンジングな取り組みであった。今後は、生命科学研究に貢献できる小笠原手法として認知を得られるところまで発展させていってほしい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. S. Ogasawara, M. Maeda, "Photoresponsive 5'-cap for the reversible photoregulation of gene expression" <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> 21 , 5457-5459 (2011) |
| 2. S. Ogasawara, S. Ito, H. Miyasaka, M. Maeda, "Photochromic Nucleobase Photoisomerized by Visible Light" <i>Chem. Lett.</i> 39 , 956-957 (2010) |
| |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

1.

発 明 者: S. Ogasawara, M. Maeda

発明の名称: RNA CONTAINING NUCLEOSIDE COMPOUND, METHOD FOR CONTROLLING AMOUNT OF PROTEIN PRODUCTION FROM THE RNA AND NUCLEOSIDE COMPOUND

出 願 人: 独立行政法人理化学研究所

出 願 日: 2011/2/18

出 願 番 号: PCT/JP2011/053577

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<国際学会発表>

1. The 22nd CDB Meeting RNA Science in Cell and Developmental Biology II, June 11-13, 2012 (RIKEN CDB, Kobe)
○Shinzi Ogasawara, Mizuo Maeda
"Translation Control by Light"
2. The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, November 10-12, 2011(Hokkaido University, Hokkaido)
○Shinzi Ogasawara, Mizuo Maeda
"Reversible photoregulation of protein expression by photoresponsive mRNA"

<国内学会発表>

3. 日本化学会第 93 春季年会 特別企画講演(光化学と光生物学のマリアージュ)、2013 年 3 月 22-25 日 (立命館大学・滋賀)
○小笠原慎治
「光遺伝子制御」
4. 第 7 回ケミカルバイオロジー学会、2012 年 6 月 7-9 日 (京都大学・京都)
○小笠原慎治、前田瑞夫
「タンパク質発現を可逆的に光制御できる新規遺伝子操作法-単一細胞内におけるタンパク質

の局所的誘導-」

5. 日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月 26-30 日（神奈川大学・横浜）

○小笠原慎治、前田瑞夫

「光応答性 cap による翻訳の可逆的光制御」

6. 日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月 26-29 日（近畿大学・大阪）

○小笠原慎治、前田瑞夫

「生体への応用を指向したフォトクロミック塩基の開発」

研究報告書

「光化学反応を駆使した分子結晶成長過程の制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成9年10月～平成13年3月

研究者: 奥津 哲夫

1. 研究のねらい

タンパク質の結晶育成は、タンパク質の高次構造を X 線結晶構造解析により明らかにするために必要な工程である。解析されたタンパク質の構造の情報をもとに、創薬の分子設計が進められる。解析用の X 線源として放射光が利用されるようになり、結晶の解析技術は飛躍的に進歩し、結晶の育成技術のさらなる発展が求められるようになった。結晶育成の方法として、光の物理的あるいは化学的な摂動を利用する方法が近年見いだされた。光の物理的な摂動を用いた研究は、米国および大阪大学のグループが中心となり発展させてきた。大阪大学のグループはタンパク質の結晶化をベンチャービジネスとして事業化し、成功している。一方、光の化学的摂動を用いた結晶化の現象は本研究が見いだし、その機構の解明を進めている。光化学反応により結晶化が促進される機構は、反応で生成したタンパク質ダイマーが結晶核へと成長するためと推測されている。しかし、この現象を再現性よく高い確率で起こさせる方法は確立できておらず、実用に供する手法とするには不十分であった。

本研究では、タンパク質の光誘起結晶化の機構を詳細に調べ、結晶核を生成させる方法論を構築する。この方法論を、創薬の研究者が自ら使うことのできる技術に展開する。タンパク質の結晶化はハイスループットで行われることが多いが、光化学反応により核形成する瞬間をリアルタイムで観察し、一滴のタンパク溶液から結晶を得る方法を実現する。膜タンパク質は水に溶けづらく結晶化が難しいタンパク質であり、結晶化法の進歩特に期待されている。近年、膜タンパク質が溶けやすい媒質である脂質中で結晶化する方法が注目されてきた。脂質を用いた膜タンパク質の結晶化は脂質の相転移を利用して起こすものであるが、相転移を自由自在に起こさせる方法論の確立が望まれている。そこで、光化学反応を利用し相転移を空間限定して誘起させる方法論の構築を目指した。

これらの研究を通し、系に光子一個が与えられることにより、そこに存在する分子の集合状態を変化させる新しい光化学の研究を先駆けて展開することとした。

2. 研究成果

(1) 概要

光化学反応を応用し、タンパク質の結晶成長を誘起させる研究を行った。タンパク質の結晶育成はタンパク質の機能を明らかにするための工程であり、創薬の分子設計につながる。このため、タンパク質結晶化の技術としてすぐれた方法の開発が望まれている。この10年の間に光誘起結晶成長の現象が見いだし、研究が進んできた。本研究者は、この分野の開拓者の一人として光化学反応により結晶化が誘起される現象を見いだした。本研究では、機構の解明を行い、実用化検討を進めた。

本研究の研究期間内に、タンパク質の光化学反応により何が起こるのか明らかにし、

反応によりなぜ結晶化が開始されるのか明らかにした。また、より多くのタンパク質にこの方法が適用できるよう、光化学反応の仕組みを構築した。その結果、この技術を必要とする研究者が機構を納得し、自らの手で行える結晶化装置を開発した。また、膜タンパク質の光誘起結晶化を媒質中で行うことを試みた。

光誘起結晶化が、結晶へ成長するテンプレートとなる分子が生成される機構であることを示し、テンプレートの構造を明らかにした。タンパク質の光化学反応に頼らず、カルボニル化合物の光化学反応を用いてタンパク二量体を作り出し、テンプレートとして機能する仕組みを考案し結晶化を誘起させることに成功した。テンプレートの生成を検出する方法として、光散乱強度の変化を観測するアルゴリズムを考案した。得られた結晶を構造解析し、解析に値する結晶が得られることを確かめた。これらの機構を組み込んだ、光誘起結晶化プレートを作製した。現在実用化を進めている。

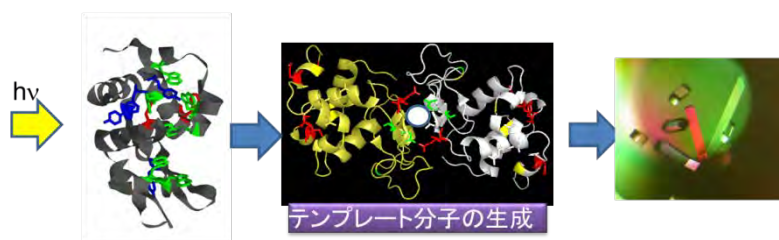
次に、膜タンパク質の光誘起結晶化の検討を行った。膜タンパク質の結晶化には、生体膜のモデル系である脂質の中で結晶化させる方法を検討した。脂質の相を自由自在に相転移させる方法があれば、膜タンパク質の結晶化は進歩が期待できる。本研究では光化学反応を応用して、脂質の相転移を起こすことを試みた。アゾベンゼンの光異性化反応を応用することにより脂質を相転移させることに成功した。膜タンパク質を用いて結晶成長させる実験を進めた。

(2) 詳細

研究テーマA「光化学反応による結晶化メカニズムの解明」

タンパク質の光化学反応により、なぜ結晶化が促進されるのか機構の解明を進めた。タンパク質のアミノ酸のうち、反応に関与するアミノ酸を特定し、反応生成物の構造を同定した。反応生成物は Tyr 残基間で結合したダイマーであることを解明した。結晶化が促進される機構は、結晶化を誘起する生成物が生成し、結晶成長のテンプレートとして機能する仮説を立て検証を進めた。テンプレートとは、結晶中で隣り合う二つの分子と似た配置をとるダイマーであると考えた。タンパク質の反応を解析し、生成するダイマーの構造を考察したところ、テンプレートとして機能する構造をとるものが生成することが判明し、光誘起結晶化の機構を明らかにした。

同時に、タンパク質の光反応でテンプレートが必ずしも生成しないことも明らかとなった。テンプレートを積極的に作り出す方法として、カルボニル化合物の光化学反応を応用することを考案し、デモンストレーションした。この方法で作製した結晶の構造解析を行い、光化学反応が関与して作られた結晶の構造は、結晶中にテンプレートを不純物として含むが、解析の結果定法で得られたものと同じであり、解析に値する結晶であることを示した。



研究テーマ B「創薬の現場で行える技術への展開」

光散乱観測による核形成のアルゴリズム作製

この現象を実用に供する技術として発展させるためには、我々が行った実験結果の中から成功した結果を用いてデモンストレーションするだけでは不十分であり、確実に結晶化を導く方法論が必要である。具体的には反応を起こさせながら散乱光の変化をリアルタイムで観察し、核形成の瞬間をとらえる実験方法を考案した。その結果、テンプレートの形成と続いて起こる結晶成長のプロセスが、散乱光が一旦減少し次に増加する観測結果とよく対応することを突き止めた。この変化のパターンを検出することにより、ハイスループットに頼らず、一つの溶液から結晶を得られる方法論を構築した。

光結晶化プレートの作製

光化学反応を促進する結晶化容器の製作を行った。(特許 1-3) これは容器に金のナノ構造を構築し、表面プラズモン共鳴を誘起し、可視光の多光子吸収によりタンパク質を励起し反応させて、テンプレートを生成させるものである。図 2 に製作した結晶化促進プレートの写真を示す。このプレート上のウェルにタンパク質溶液を滴下し、蛍光灯の光を当てながら保存すると結晶化頻度が高くなる。このプレートで作製した結晶と定法で作製した結晶の構造を調べたところ違いは見いだせなかった。このことから、実際に用いる方法として好ましいことを示した。現在企業が実用化を進めている。この方法の利点は、創薬の現場で用いられている実験方法を一切変更することなく、このプレートを用いるだけで、結晶化確率を高めることができる点にある。特許出願を行い、実用化との関連から早期審査を進め出願後一年で登録された。(特許第 5224306 号)



図 2 作製した結晶化プレート。シッティングドロップ結晶化容器に金ナノ構造を構築してある。このウェルにドロップされた溶液から結晶が出現しやすくなる。

研究テーマ C「膜タンパク質の光誘起結晶化の検討」

膜タンパク質は水に溶けにくく、結晶化が難しいタンパク質である。本研究では膜タンパク質を水中で結晶化するのではなく、脂質の中で結晶化させる方法を、光化学的に制御することを試みた。図 3 に概要を示す。脂質の中での結晶化とは、脂質立方相を膜タンパク質に対する媒質として用い、立方相が

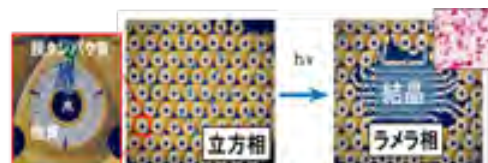


図 3 脂質を媒質として用いた膜タンパク質の結晶化

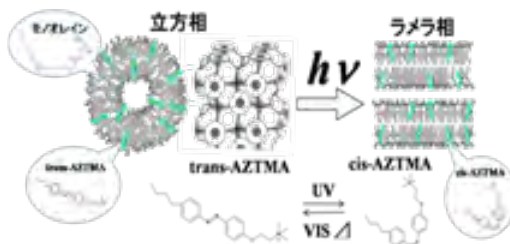


図 4 光誘起相転移のアイデア

ラメラ相に相転移するとき膜タンパク質を結晶化させるものである。

本研究では、光機能性分子を相転移の摂動として用い、光化学反応により相転移を誘起させることを試みた。図4に本研究のアイデアを示す。光機能性分子には trans-cis 光異性化反応を起こすアゾベンゼン部位を持つ界面活性剤を用いた。構造変化に伴い、膜タンパク質の核形成を制御することができると期待した。

実験を行った結果、立方相 (Ia3d) からラメラ相 ($L\alpha$) への光誘起相転移が確認された。次に、このサンプルにバクテリオロドプシンを加え結晶化実験を行った。光を当てないときに出現した結晶に対し、光を当てて相転移を起こした場合は出現した結晶の数が増えた。このことから相転移により核形成を誘起させることを示すことができた。この結果を踏まえて研究期間の最後に特許申請を行った。(特許4)

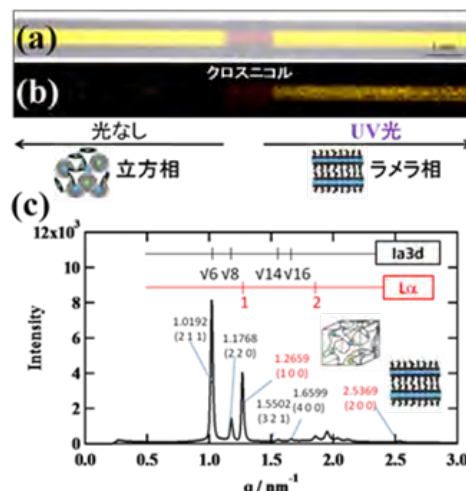


図5 (a) AZTMA/モノオレイン混合相のキャピラリー中の画像。右側のみ UV 光を照射した。 (b) 光照射後の偏光画像。 (c) 光誘起相転移を起こしたサンプルの小角 X 線散乱の結果。

3. 今後の展開

さきがけ研究により、タンパク質の光化学反応により結晶核形成が誘起される機構を解明することに成功した。具体的には、光化学反応生成物の構造が、結晶中の分子の配列と類似したテンプレートとして機能することを示した。また、このテンプレートをタンパク質の種類に依存することなく生成させる光化学反応の仕組みを構築した。結晶化誘起のデモンストレーションは自信を持って演示する段階まで来た。次の展開は、今までに結晶化ができておらず構造が明らかでないタンパク質を対象とし、この方法で初めて結晶を育成し、構造解析を行う、という段階に進む。今後は医学・薬学系の研究者と共同で仕事を進める体制をとり、我々の技術の発展がライフ分野の発展に具体的に貢献するべく展開をはかりたい。

膜タンパク質の結晶化方法について、今回研究で端緒をつかんだアイデアを発展させ、新たな結晶化法としての可能性を探究する。相転移を誘起する光機能性界面活性剤に適した化合物の特性を明らかにし、分子設計の指針を得る。これと組み合わせる媒質としての脂質についても分子設計を検討する。これにより、脂質の相転移を自由自在に制御する方法を開発し、膜タンパクの脂質中における結晶育成法を展開する。光でのみ相転移が実現し、光を当てたところだけで結晶化が起きる仕組みの構築を目指す。

4. 自己評価

本研究では、タンパク質の結晶化が光化学反応により誘起される機構を解するだけでなく、タンパク質の結晶化方法として一般的に利用されることを目指した。リゾチームのようなモデル系

タンパク質で起きる光誘起結晶化の機構を解き明かし、テンプレートとなる分子の構造を決定した。と同時に、この結果が、モデルタンパク質以外の系では必ずしも発現せず、普遍的に起こる現象ではないことが判明した。これに対し、カルボニル化合物の水素引き抜き反応でアミノ酸残基と反応させることにより、テンプレートを作り出すアイデアを考案し試み、多くのタンパク質に対し適用可能な方法を開発し解決した。高エネルギー加速器研究機構の構造解析グループ加藤龍一氏の協力を得て、本方法で作製した結晶の構造解析を行い、結晶が定法で作製したものと変わらないことが確認でき、実用に使える技術であることを示した。これらの機構を実現する結晶化プレートを発明し、特許を出願した。さらに、膜タンパクの光誘起結晶化に関する研究にも着手した。研究開始の当初は具体的なアイデアは無く、期間途中からのチャレンジであった。予備実験的な結果ではあるが、アイデアを実現する方向性を見いだした。この研究では、合成、バクテリアの培養、脂質の取り扱い、小角 X 線散乱等の実験を、同僚の協力を得て進めた。この研究は今後プロジェクト型のテーマとして進展させるべきと考える。

5. 研究総括の見解

光照射による結晶の核生成と成長のメカニズムを解明し、タンパク質結晶の作製に関する方法論の確立を目指した。その結果、光誘起の化学反応により結晶核となるタンパク質二量体が生成され、その二量体がテンプレートとして働くことにより結晶が成長するメカニズムを明らかにした。また、プラズモンを利用した結晶成長技術を開発し積極的に特許を出願、さらに製品化を目指す一方、脂質膜の光相転移を利用した膜タンパク質の結晶化法を提案した。このように基礎研究、特許出願、製品化展開してきた奥津研究者のアプローチは、「光の利用」研究を体現したモデルケースである。脂質膜の光相転移を利用した膜タンパク質の結晶化法においても同様な研究活動を展開することを期待する。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. K. Tawa, S. Haruta, T. Okutsu, J. Nishii, Photochemically induced crystallization of proteins promoted on the plasmonic chip, Japanese Journal of Applied Physics (JJAP), in press.
2. T. Kuroiwa, H. Horiuchi, H. Hiratsuka, T. Okutsu, Verification of Photochemically Induced Crystallization Mechanism of Proteins by Dimer Addition, , Key Engineering Materials, in press.
3. N. Candoni, Z. Hammadi, R. Grossier, M. Ildefonso, E. Revalor, N. Ferté, T. Okutsu, R. Morin, S. Veessler, Nanotechnologies dedicated to nucleation control, *Int. J. Nanotechnology*, 9, 439-459 (2011).
4. 奥津哲夫, 光化学反応をトリガーとするタンパク質の結晶化, 光化学, 40(1), 26-32 (2009).
5. E. Revalor, Z. Hammadi, J-P Astier, R. Grossier, E. Garcia, C. Hoff, K. Furuta, T. Okutsu, R. Morin and S. Veessler, Usual and Unusual Crystallization from Solution, *J. Crystal Growth*, 312, 939-946 (2009).

(2)特許出願

研究期間累積件数:4 件

1.

発 明 者: 奥津哲夫, 三澤弘明, 上野貢生

発明の名称: 結晶化用基板、結晶化用容器、結晶化装置、及び、結晶の製造方法

出 願 人: 群馬大学, 北海道大学

出 願 日: 2010/1/9

出 願 番 号: PCT/JP2010/064908

2.

発 明 者: 奥津哲夫

発明の名称: 結晶化用基板、結晶化用容器、結晶化装置、及び、結晶の製造方法

出 願 人: 群馬大学

出 願 日: 2012/1/31

出 願 番 号: 特願 2012-018239 登録 特許第 5224306 号

3.

発 明 者: 奥津哲夫

発明の名称: 結晶化用基板、結晶化用容器、結晶化装置、及び、結晶の製造方法

出 願 人: 群馬大学

出 願 日: 2013/1/25

出 願 番 号: PCT/JP2013/051544

4.

発 明 者: 奥津哲夫、高橋 浩、園山正史、伊平 寛

発明の名称: 膜タンパク質の結晶化方法及び膜タンパク質結晶化剤

出 願 人: 群馬大学

出 願 日: 2013/3/7

出 願 番 号: 特願 2013-045219

(2) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 日本結晶成長学会誌 vol. 38, 2011 特集「光で成長する結晶」責任編集

2. 日本化学会第 93 春期年会特別企画 「光化学と光生物学のマリアージュ」
企画責任者

3. 「光化学若手の会」主催 2012 年 6 月 草津セミナーハウス

4. T. Okutsu, Photochemically Induced nucleation of Protein and its Practical Application, International topical meeting, Akiu, Hotspring Miyagi, 4 March 2013 (invited).

5. T. Okutsu, H. Ihira, T. Kuroiwa, S. Haruta, H. Horiuchi, H. Hiratsuka, Photochemically induced crystallization, APC2012, Osaka, 2012.

研究報告書

「誘導ラマンによる高感度光学活性検出及び 高分解能イメージング」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 小関 泰之

1. 研究のねらい

生命の機能や仕組みを知る上で、生体の観察技術は極めて重要な役割を果たしている。生体は多くの場合透明であるため、光学顕微鏡での観察には染色や標識技術が用いられる。これらの技術は生体分子を可視化する強力な手法であるものの、時間と手間を要する。そこで、染色の不要な観察技術が医療現場等において求められている。

生体分子のラマン散乱を検出してイメージングを行うラマン顕微鏡は、ラマン散乱の豊かな分子振動分光情報を活用することで、染色や標識を必要とせずに可視化する光学顕微鏡として注目されている。しかし、ラマン散乱光の微弱さゆえに、ラマン顕微鏡の信号対雑音比を高めるためには数十分程度の長い積算時間が必要であった。一方、高速観察の可能なラマン顕微鏡として、2 色のパルスレーザーを用いたコヒーレント反ストークスラマン散乱(CARS)顕微鏡も研究されているが、スペクトルが歪む、定量計測が難しい、等の課題を抱えていた。

このような状況の中、私は 2009 年に誘導ラマン散乱(stimulated Raman scattering, SRS)を用いた光学顕微鏡をハーバード大学・シュツットガルト大学のグループと独立に実証した。図 1 に示すように、SRS 顕微鏡では、2 色のパルスレーザーの一方に強度変調を施した後、試料に集光照射する。SRS 効果が発生すると、短波長の光パルスが減衰し、長波長の光パルスが増幅される。その結果、強度変調がもう一方のパルスに転写される。この転写された強度変調成分をロックイン検出することで SRS 信号を得る。SRS 顕微鏡ではこの SRS 信号を用いてイメージングを行い、生体分子を高感度に検出し、生体を染色・標識することなく観察することができる。また、SRS 顕微鏡で得られるスペクトルは一般的なラマン散乱と同じであるためスペクトルの解析が容易であり、定量計測も可能である。

本さきがけ研究では、SRS 顕微鏡に対して、(1) 極限性能を追求すること、(2) 新しい機能を実現すること、の 2 つの方向性に技術的展開を図ることで、世界をリードする性能と機能を有する生体顕微鏡の実現をねらった。

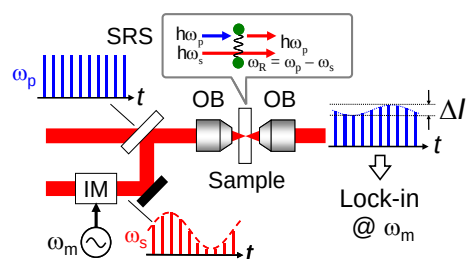


図 1. SRS 顕微鏡の原理構成図。

OB: 対物レンズ。IM: 光強度変調器。

2. 研究成果

(1) 概要

研究開始当初、上記ねらいを実現するための具体的な研究内容として、(i) 空間分解能向上、及び(ii) 光学活性検出機能の実現、に取り組む計画を立案した。しかし、当時使用していたレーザー光源（フェムト秒チタンサファイアレーザー及び光パラメトリック発振器）は SRS 顕

微鏡にとって最適な光パルスが発生できるものではなく、また、顕微鏡システムの感度や観察速度も不充分であった。そこでまず、レーザー光源の開発と顕微鏡システムの性能向上に取り組んだ。その結果、(A) 繰り返しが 2 倍異なる 2 波長同期光源を用いた理論限界感度の実証(論文 5、論文 3、論文 4)、(B) 高速分光イメージング機能による分子識別能向上(論文 1、論文 2)に成功した。一方、当初計画の研究内容については、残された研究期間が短く、充分に取り組むことはできなかったものの、上記(A)(B)の成果が得られたことで、研究内容の基盤技術を確立することはできた。本研究全体を通じて、高速性と高い分子識別能を兼ね備え、世界をリードする性能と機能を有する無染色生体顕微鏡を実現できたと考えている。

(2) 詳細

研究テーマ A 「繰り返しが 2 倍異なる 2 波長同期光源を用いた理論限界感度の実証」

上述のように、SRS 顕微鏡では 2 色のパルス間で SRS により転写される強度変調成分をロックイン検出する。この際に、転写される強度変調の変調度は 10^{-5} のオーダーと非常に小さいため、SRS 信号の信号対雑音比はレーザーの強度雑音により制限される。特に、レーザーは低い周波数において大きな強度揺らぎを有するので、ロックイン周波数が低い場合にレーザー強度雑音が問題となる。従って、高感度に SRS 信号を検出するためには、強度変調周波数を高周波化する必要がある。そこで、図 2 に示すように、繰り返しが 2 倍異なるレーザーを同期させた高調波同期光源を考案した。これは、一方のレーザーが最高周波数で強度変調された状況と等価である。従って、本方式によってロックイン周波数を高周波化すれば、レーザー強度雑音の影響を抑制できると期待される。

図 3 に高調波同期光源を用いた SRS 顕微鏡の実験系を示す(論文 5)。光源として繰り返し 76 MHz のチタンサファイアレーザーと繰り返し 38 MHz の Yb ファイバーレーザーを用いた。両レーザーを同期させるため、位相同期ループを製作した。両光パルスを合波し、2 光子吸収(GaAsP)検出器に集光することで、強度相互相関信号を得る(図 4(a))。この信号が一定値を取るように、Yb ファイバーレーザーの繰り返し周波数を制御する。繰り返し周波数制御のため、Yb ファイバーレーザー内に光位相変調器とピエゾステージを導入した。その結果、図 4(b)(c)に示すようにループ内ジッター 4 fs で同期させることができた。また、ループ外ジッターも 8 fs 以下であり、光パルスの時間幅 300 fs と比較して十分に高精度な同期ができた。

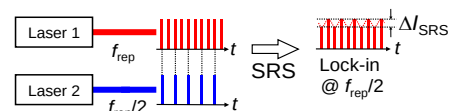


図 2. 高調波同期光源の模式図。

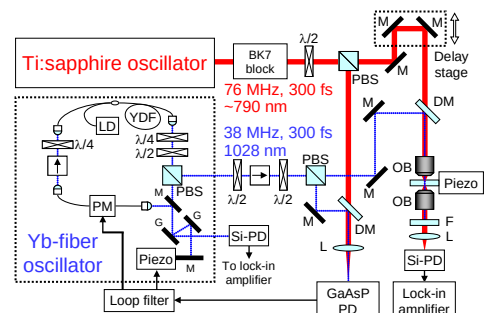


図 3. 高調波同期型 SRS 顕微鏡の実験系。YDF: Yb 添加光ファイバー。G: 回折格子。LD: レーザーダイオード。PM: 光位相変調器。PD: 光検出器。L: レンズ。OB: 対物レンズ。F: 光フィルター。

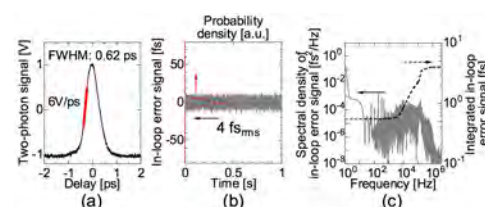


図 4. 同期実験結果。(a) 2 光子吸収信号。(b) 同期後のループ内誤差信号。(c) (b) のスペクトル。

この高調波同期光源を用いた SRS 顕微鏡を製作した。図 3 に示すように、両パルスを合波し、対物レンズで試料に集光し、試料透過光を再び対物レンズでコリメートする。Yb パルスを光フィルターで除去した後、チタンサファイアレーザーパルスを Si フォトダイオードで光検出する。光電流をロックインアンプで検出することで SRS 信号を得た。

図 5 に本 SRS 顕微鏡の雑音特性の測定結果を示す。横軸は平均光電流、縦軸はロックイン信号の雑音レベルである。青丸で示すように、光電流が微小な場合は回路雑音が支配的であるが、光電流が増大するとともにロックイン信号の雑音が増大する。光電流から計算されるショット雑音の理論値(緑実線)に 1.6 dB まで迫る低雑音性が得られた。また、我々の光強度変調器を用いるシステム(ロックイン周波数:10.7 MHz)の雑音特性と比較して、雑音を 12.4 dB 低減することに成功した。さらに、SRS 顕微鏡に最適な、時間幅 5 ps 程度の光パルスを用いて同期実験を行ったところ、ジッター120 fs 程度の充分高精度な同期が可能であることもわかった(論文 3)。また、SRS 顕微鏡のためのレーザー雑音低減法も提案した(論文 4)。これは、更なる実用性向上を図るために小型なファイバーレーザーを用いる場合に有効である。

以上の結果を通じ、高調波同期光源というオリジナルなレーザーを用いて、SRS 顕微鏡の感度向上と理論限界感度の実証に成功した。

研究テーマ B「高速分光イメージング機能による分子識別能の向上」

SRS 顕微鏡の分子識別能には向上の余地が多く残されている。それは、SRS 顕微鏡では 2 色のレーザーの差周波数で決まる単一の分子振動周波数しか検出できないからである。SRS において分子振動スペクトルを得てそれを詳細に解析することができれば、スペクトル形状の僅かな違いを捉えることができ、分子識別能が更に向上すると期待される。

そこで、SRS 顕微鏡において高速分光イメージングという新しい機能を実現し、分子識別能の向上を図った。具体的には、無染色生体試料をビデオレートで観察しながら、フレーム毎に波数を変えることで、わずか数秒で分光イメージングを行った。

高速分光イメージング機能を実現するために新規考案した波長可変光源の原理構成図を図 6 に示す(論文 2)。広帯域 Yb ファイバーレーザーパルスのスペクトルの一部を波長可変フィルター(TBPF)で切り出し、偏波保持型 Yb 添加ファイバー増幅器(PM-YDFA)で増幅する。TBPF はガルバノミラー(GM)、4f レンズ系、回折格子(G)から構成される。GM の角度を変えると TBPF の透過波長を制御できる。この TBPF の応答時間はガルバノスキャナーの速度により決定され、ミリ秒オーダーである。この光源の出力パルスのスペクトルを図 7 に示す。波長 1030 nm を中心として、300 cm^{-1} にわたる波長可変性を確認することができた。また、スペクトル半値全幅はおよそ 3 cm^{-1} であり、中心波長における光パワーは約 120 mW であった。この光源を用いたビデオレート SRS 顕微鏡を製作し、500 x 480 ピク

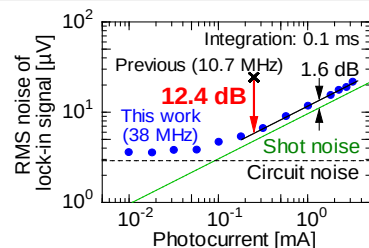


図 5. SRS 顕微鏡の雑音特性。

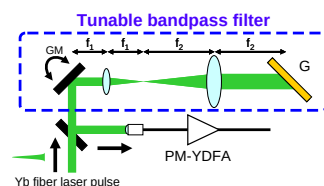


図 6. 波長可変光源の構成。

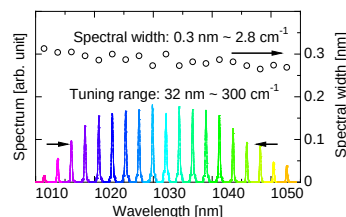


図 7. 波長可変光パルスのスペクトル。

セルの画像を 30.8 枚/秒で取得しつつ、フレーム毎に TBPF の波長を制御することで、高速分光イメージング機能を実現した(論文1)。

高速分光イメージング機能を有する SRS 顕微鏡を用い、ラットの肝臓を観察した。波数 2800~3100 cm^{-1} にわたって 91 枚の分光像を取得した。信号対雑音比を高めるため、10 回積算を行ったものの、総取得時間は 30 秒以下であった。得られた分光像を独立成分分析(ICA)により解析した。その結果を図 9 に示す。図 9(a)~(c)は第1~第3 独立成分(IC)像である。また、図 9(d)は対応する信号源スペクトルである。スペクトルは非常に似通っているが、わずかな違いがある。例えば、第 1 IC は 2850 cm^{-1} の CH_2 伸縮振動が強い。第 2 IC は 3400 cm^{-1} の OH 伸縮振動の裾が支配的である。第 3 IC は 2930 cm^{-1} の CH_3 伸縮振動成分が支配的である。これらのスペクトル情報から、第 1 IC(図 9(a))は脂肪滴及び細胞質を、第 2 IC (図 9(b))は水分の多い血管(類洞)構造を、第 3 (図 9(c))は繊維や細胞核を可視化していると推定される。これらの像を用いて、カラー画像を生成することもできた(図 9(e))。

また、マウスの小腸を観察した結果を図 10 に示す。SRS 顕微鏡の三次元分解能を活用し、深さを 5.6 μm ずつ変えながら、それぞれの深さにおいて 91 枚の分光像を得た。像 1 枚当りの取得時間は 3 秒、総取得時間は 24 秒であった。図 10(a)~(h)は ICA により得られたカラー合成像であり、また図 10(i)は IC スペクトルである。青(核)や赤(細胞質)などの 3 次元構造をクリアに可視化できた。

以上の結果から、SRS 顕微鏡において高速分光イメージングという新しい機能を実現することで分子識別能を向上させ、生体組織の無染色観察における本機能の有効性を実証した。

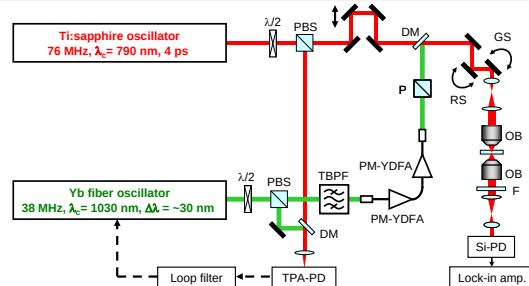


図 8. 高速 SRS 分光顕微鏡の実験系。

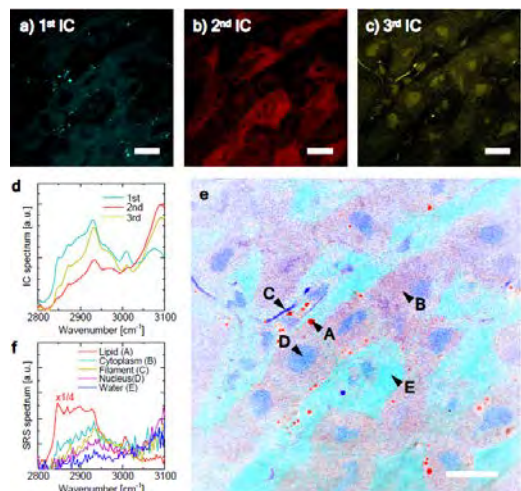


図 9. 高速 SRS 分光顕微鏡によるラット肝臓組織観察結果。a-c: 第 1~3 独立成分像。d: 独立成分スペクトル。e: カラー合成像。A: 脂肪滴。B: 細胞質。C: 繊維。D: 細胞核。E: 類洞。f: SRS スペクトル。

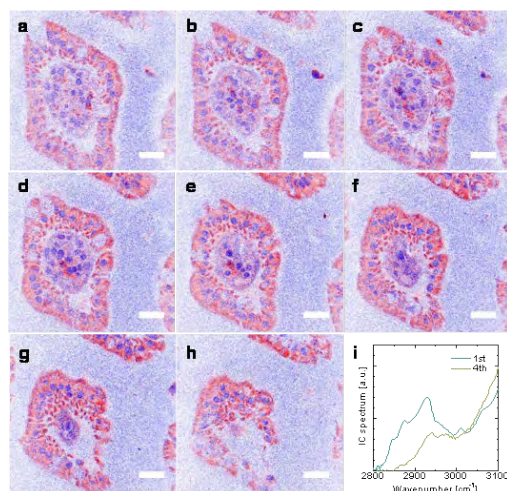


図 10. マウス小腸の 3 次元観察結果。a-h: 深さを 5.6 μm ずつ変えながら観察したカラー合成像。青: 細胞核、赤: 細胞質。総取得時間: 24 秒。i: 独立成分スペクトル。スケールバー: 20 μm 。

3. 今後の展開

本研究成果によって、高速性と分子識別能を両立する強力な無染色イメージング法を実現できた。今後の展開としては、以下の3つの方向性が挙げられる。

- ・ レーザーの波長可変範囲を拡大し、特に指紋領域と呼ばれる $500\sim 1800\text{ cm}^{-1}$ の波数帯における詳細なラマンスペクトルを取得できるようにする。これにより分子識別能の更なる向上が期待できる。
- ・ 分光像の処理アルゴリズムを最適化し、より短時間かつ少ない波長数で分子識別ができるようにする。
- ・ ファ이버レーザーなど、コンパクトかつ実用性の高いレーザーを適用する。

また、本さがけ研究で十分に実現できなかった光学活性検出及び高分解能化についても、その可能性を追求していきたい。

4. 自己評価

さがけ研究期間で得られた成果である感度向上と高速分光イメージングは、研究のねらいである「極限性能の追求」と「新しい機能の実現」に沿ったものである。また、本さがけ研究の結果として、世界をリードする性能と機能を持った無染色顕微鏡を実現できたと考えている。

5. 研究総括の見解

独自に開発した誘導ラマン散乱顕微法の極限性能を追求し、生体のイメージング技術の革新を目指した。その結果、理論限界感度を達成するとともに高速分光イメージングを実現し、誘導ラマン散乱顕微法が高速性と分子識別機能を兼ね備えた染色を必要としない生体顕微法として優れた手法であることを示した。同時期に、米・独グループからも誘導ラマン散乱顕微法が提案されたが、このさがけ研究で実現した性能と分子識別能は世界最高レベルにあるものと高く評価する。この顕微法には更なる高性能化、高機能化の余地があると考えられるので、他との差別化を図り、我が国オリジナルの「光を利用」した顕微法の開発をリードしていただきたい。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| [1] Y. Ozeki, W. Umemura, Y. Otsuka, S. Satoh, H. Hashimoto, K. Sumimura, N. Nishizawa, K. Fukui and K. Itoh, "High-speed molecular spectral imaging of tissue with stimulated Raman scattering," Nature Photon., 2012, 6, 845-851. |
| [2] Y. Ozeki, W. Umemura, K. Sumimura, N. Nishizawa, K. Fukui, and K. Itoh, "Stimulated Raman hyperspectral imaging based on spectral filtering of broadband laser pulses," Opt. Lett., 2012, 37, 431-433. |
| [3] W. Umemura, K. Fujita, Y. Ozeki, K. Goto, K. Sumimura, N. Nishizawa, K. Fukui, and K. Itoh, "Subharmonic synchronization of picosecond Yb fiber laser to picosecond Ti:sapphire laser for stimulated Raman scattering microscopy," Jpn. J. Appl. Phys, 2012, 51, 022702. |

- [4] K. Nose, Y. Ozeki, T. Kishi, K. Sumimura, N. Nishizawa, K. Fukui, Y. Kanematsu, and K. Itoh, "Sensitivity enhancement of fiber-laser-based stimulated Raman scattering microscopy by collinear balanced detection technique," *Opt. Express*, 2012, 20, 13, 13958–13965.
- [5] Y. Ozeki, Y. Kitagawa, K. Sumimura, N. Nishizawa, W. Umemura, S. Kajiyama, K. Fukui, and K. Itoh, "Stimulated Raman scattering microscope with shot noise limited sensitivity using subharmonically synchronized laser pulses," *Opt. Express*, vol. 18, no. 13, pp. 13708–13719, 2010.

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・国際会議招待講演(8 件)

- ・Y. Ozeki, "High-speed SRS spectral microscopy with two-color wavelength-tunable picosecond pulses" Ultrafast Optics (UFO2013), Mo 4.1, Davos, Switzerland, Mar. 5th, 2013.
- ・Y. Ozeki, Y. Otsuka, S. Sato, H. Hashimoto, W. Umemura, K. Sumimura, N. Nishizawa, K. Fukui, and K. Itoh "Label-free observation of tissues by high-speed stimulated Raman spectral microscopy and independent component analysis," Photonics West 2013, BiOS, paper 8588-6, San Francisco, Feb. 3rd, 2013.
- ・Y. Ozeki, "High-speed stimulated Raman spectral imaging," microCARS2012, Naurod, Germany, Oct. 15th, 2012.

他

・受賞(2 件)

「2011 年光学論文賞」

「第 28 回(2010 年春季)応用物理学会講演奨励賞」

・プレスリリース

「波長が変化するレーザーを用いた新しい顕微鏡を開発—染色せずに生体の三次元構造などの観察が可能に—」平成 24 年 11 月 12 日。

・新聞報道

「生体組織の観察 染めずに可能に」日本経済新聞 2012 年 11 月 13 日 15 面。

「生体組織の無染色観察」日経産業新聞 2012 年 11 月 13 日 16 面。

・解説論文

- 小関泰之「誘導ラマン散乱顕微鏡による分光イメージング」分光研究、2012, 61, 6, 215–223.
- 小関泰之、伊東一良「誘導ラマン散乱分光イメージング」光アライアンス、2012, 23, 9, 47–50.
- 小関泰之、伊東一良「誘導ラマン散乱顕微法による無染色生体イメージング」レーザー研究、2011, 39, 12, 887–892.

研究報告書

「共振器位相整合非線形光学の開拓と新光源への応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 財津 慎一

1. 研究のねらい

レーザー光と物質の強い相互作用を研究する「非線形光学」は、レーザーの発明と同時に産声をあげ、光源と歩みを共にしながらその発展を続けてきた。この非線形光学の分野において、それが発現する空間を提供するための新しい仕組みとして、近年大きな2つのトピックがあった。1つは、精巧な光ファイバー作製技術を元にして発明された「中空コアフォトニックバンドギャップファイバー」であり、もう1つは、半導体技術に代表されるナノオーダーの微細加工技術が生み出した「微少光共振器」である。どちらの方法も共に、自由空間中では困難であった種類の光と物質の非線形相互作用を実現し、これまでにない応用を切り開くキーデバイスとして、非線形光学のフロンティアを開拓し続けている。

本研究では、これらのデバイスに匹敵する新しい非線形光学現象発現のための仕組みとして、報告者が独自の発想に基づいて提案する「共振器位相整合非線形光学(Intracavity Phase-Matched Nonlinear Optics)」の開拓を目的とした。これは、群速度分散が厳密に制御された光共振器、「分散補償型高フィネス共振器」を用い、これによって初めて実現される位相整合条件を満たした非線形光学に関するものである。ここで初めて誘起される新規共振器内非線形・量子光学的現象の観測、および、それらのデバイス・光源・計測法としての新しい応用を目指した。

具体的には、この方式を基礎として、全く新しいデバイスである「テラヘルツ分子光変調器」の実現を目指した。これは、「分散補償型高フィネス共振器」内で励起された分子のコヒーレントな運動により、10 テラヘルツを超える周波数で連続発振光に対する光波変調を実現する装置である。また、この変調機構を組み込んだ新しい光源である「分子変調モード同期レーザー」の実現を目指した。さらに、これらの新しいデバイス・光源を利用した新しいタイプの光と物質の相互作用・超高感度極微量物質検出法への展開を指向した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、「非線形光学現象」を実現するための「新しい場」として、「分散補償型高フィネス共振器」を提案し、「位相整合条件」を満たした効率的な非線形光学効果を実現することに成功した。この独自の方法によって、①新しい光源「テラヘルツ分子光変調器」、②新しい機能「テラヘルツモード同期レーザー」、③新しい応用(計測・分析法)「共振器増強位相整合ラマン分光法」の3つの視点に基づいた研究を進め、「共振器位相整合非線形光学」という新しい研究分野を切り開いた。

(2) 詳細

研究テーマA [新しい機能] 世界最高周波数の連続発振光波変調の実現

光変調器とは光の特性を周期的に変化させるためのデバイスであり、高速光通信や基礎科学の広い分野で利用されている。従来の電気光学効果を利用した光変調器の変調周波数は10GHz 程度であり、最近報告されているグラフェンを用いた最新的高速変調器においても100GHz 程度が限界であった。本研究では、この光変調器の運転周波数を飛躍的に拡大し、10THz から100THz の周波数領域での光変調の実現をターゲットとした。

このような高速光変調を実現するための基本原理として、コヒーレント分子運動を利用した光波変調が研究されてきた(図1 参照)。一般的に、分子の回転や振動といった運動の周波数は、テラヘルツ(10^{12} Hz)の周波数領域に存在する。このような分子運動がコヒーレントに励起された場合、このコヒーレント分子運動は、巨視的には分極率の分子運動の周波数に一致する高速な周波数での周期的な変動となって現れる。こ

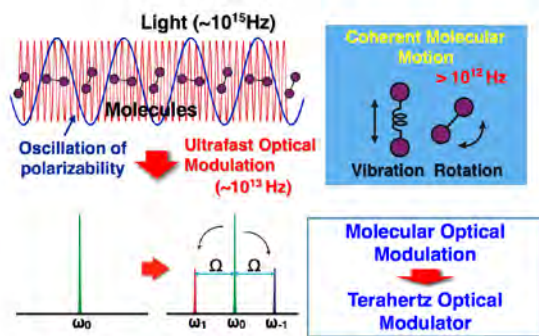


図1. コヒーレント分子運動による光波変調

のような状態の分子集団に 10^{15} Hz程度の周波数である光領域の電磁波を作用させると、この光波は、分子の運動の周波数で周期的な特性の変調を受ける。この現象を周波数領域からみると、長波長側、短波長側の双方に分子の運動周波数だけ離れた位置に新しい周波数成分がサイドバンドとして現れわたることになる。このような分子運動を利用した光変調法は分子光変調とよばれ、テラヘルツという極めて高い周波数領域での光波変調を可能とする。

本研究では、このような分子運動による光波変調を、分散制御された共振器を用いることによって、初めて位相整合条件を満たした高効率条件下で実現した。分散補償された共振器中に運動周波数 Ω の分子を封入し、分子運動の周波数に対応する周波数差を有する2つの異なる波長のレーザー光を入射する。これによって、共振中では共鳴して分子運動が励起され、周波数 Ω での分極率の変化が誘起される。このような状態の共振器に、異なる波長のもう一つのレーザー光を入射すると、共振器内の分子運動と強く相互作用し、入射した光は分子運動に一致した周波数で変調を受ける。この新しい方法は、共振器で光強度を増強するため、瞬間的な光強度の低い連続発振光に対しても光波変調を実現でき、さらに、位相整合条件を満足させることによって、光波変調の効率を劇的に改善できる。

図2に水素分子のコヒーレント回転運動(周波数 17.6 THz)を利用して、位相整合条件下で初めて実現された連続発振光に対する分子光変調の観測結果を示す。共振器への水素の充填圧力を最適化し、変調媒質である水素分子の有する正の分散と、共振器鏡

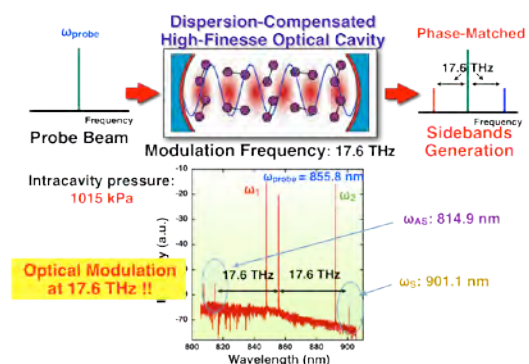


図2. 17.6THz 連続発振光サイドバンド発生

の有する負の分散をちょうどバランスさせた条件下においては、プローブ光のサイドバンドがはっきりと観測された。このサイドバンドと基本波長の周波数差は正確に 17.6THz であり、こ

研究テーマB [新しい光源] 世界最高繰返し周波数(17.6THz)の超短光パルス列の実現

本研究では、このような従来方式の限界を打破し、世界最高の繰り返し周波数を有するモード同期レーザーを実現するために、共振器位相整合非線形光学を基礎とした「分子変調モード同期レーザー」の実現に取り組んだ。こい、これを広帯域分散補償型共振器中で励起は、変調器として、コヒーレント分子運動を利用した「分子光変調器」を、増幅器として、分子本来が有する「ラマンゲイン」を利用するという新しい着想に基づいたモード同期レーザーである。水素分子を

研究テーマC [新しい計測・分析法] 超高感度極微量分子検出法への展開

Calculation

Optical Pulse Train at 17.6 THz !!

Separation: 57 fs

Repetition Rate: 17.6 THz

Pulse Duration: 17.2 fs

図 3. 17.6THz 繰返し光パルス列の観測結果

されてきた。この手法は、高い周波数精度で高感度、高選択性を実現できる特徴を有しており、これまでに、ppm オーダーでの気体分子計測が実現されている。しかしながら、この手法では、分子検出のために、インコヒーレントな過程である自発的なラマン散乱を利用しているために、強いラマン信号を得ることができず、更なる検出感度の向上が難しい状況であった。

このような状況において、本研究では、新しい分析手法として共振器位相整合非線形光学を基礎とした「共振器増強位相整合コヒーレントアンチストークスラマン分光法」を提案した。この手法では、共振器として分散制御された高フィネス共振器を使用し、検出用光源として検出対象とする分子の運動周波数差相当する周波数差を持つ 2 波長のレーザー光を使用する。これによって、検出対象分子におけるコヒーレントな非線形光学効果を共振器中で誘起し、強いアンチストークス光を発生させることが可能となる。共振器分光法の有する全ての特徴を維持しながら、飛躍的な検出信号強度の増強を期待できる。自発ラマン散乱に対して、コヒーレントアンチストークスラマン散乱は、一般的に 5 桁から 7 桁の信号強度の増加が期待できると言われている。共振器位相整合非線形光学を基礎とすれば、これまでは実質不可能であった共振器コヒーレントアンチストークスラマン散乱過程における位相整合条件を満足させることができる。それによって、コヒーレントアンチストークスラマン散乱分光法をポテンシャルを使い尽くした超高感度分析法の実現が期待できる。

ここでは、分子の高感度検出の実現可能性を実証するために、高感度検出のための予備的な実験を実施した。図 4 の左のグラフは位相整合条件が満足されていない状態での共振器内コヒーレントアンチストークスラマン散乱の観測結果を示している。アンチストークス光信号が観測されているが、励起光に対しては十分な強度ではない。これに対して、共振器内圧力を最適化し、位相整合条件を満足させて場合の観測結果(図 4 右)においては、はるかに強い強度のアンチストークス光が観測され、この実験において、その増強率は 6600 倍であった。従って、さらに計測系の高感度化等を実施することによって、このアプローチは ppb から ppt オーダーの検出感度を有する手法へと発展させることができる可能性がある。

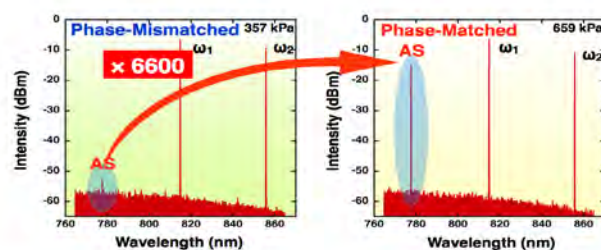


図 4. 共振器位相整合 CARS 分光法の原理実証

3. 今後の展開

光と物質の相互作用を追求する基礎的な研究においては、本研究で実現した超高繰り返し光パルス列が新しい展開をもたらす可能性がある。例えば、パルス列が物質系に作用する場合は、その励起された物質状態の緩和よりも早く次のパルスが到達することになる。このような特異な条件下での光による物質作用や、位相制御により同一の電界形状をもった光パルスの集合が物質に対して効果をコヒーレントに次々と積算させていくことができる「コヒーレントアキムレーション」、さらに、物質の振動や回転等の運動の周期に同期した物質励起による非線形・量子応答を飛躍的な増大等の新しい展開が期待される。

本研究提案で提供した新しい非線形光学の舞台は、位相整合共振器増強コヒーレント反スト

ークスラマン分光法という革新的な計測技術への道を切り開いた。この技術は超高感度ガスセンシングへの応用が容易に展開でき、例えば吸収分光法では検出の困難であった 2 原子分子の高感度検出、特に、放射性トリチウム等の同位体分子の高感度検出や固体表面の分子種の同定等に応用し、安全・安心な社会を実現するための基盤技術として展開していきたいと考えている。

4. 自己評価

本研究では、「共振器増強非線形光学」という光科学における新しい研究手法の開拓という壮大な目標をもってプロジェクトに臨んだ。この目標を達成するために、これまでにない機能・特性を有するデバイス・光源・計測手法を、世界最高記録の性能を持って実現するという戦略を立てた。当初は、多くのアプローチに手を広げすぎて、研究遂行が発散しつつあったが、ある時点で選択と集中を実施し、研究課題を限定することを決断した。その結果、(2)詳細に記した 3 つの成果を得ることができた。このような成果を得たことは、今後の研究者人生において大きな自信になると考えている。しかしながら、本研究プロジェクト期間中においては、自分の研究成果を十分にアピールできたとは言いがたい。今後は、論文・講演会における成果発表を積極的に行い、この領域における第一人者として世界の研究者より認められるような取り組みを進めていく所存である。

5. 研究総括の見解

共振器内の分散を打ち消すように設計した「分散補償型高フィネス共振器」を独自に提案し、最も周波数の高い連続発振光波変調器や最も繰り返し周波数の高い短波光パルス列が得られることを実証した。さらに、「共振器増強位相整合ラマン分光法」を試み、従来法に比べ 1000 倍もの高い感度が得られる事を示した。このようにオリジナリティーのあるアイデアを提案し、実際に実験による実証に成功したことはよろこばしい。この手法が持つ特性、魅力を端的に示す応用、デモンストレーションは今後の課題として残されたのでその実現に尽力してほしい。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. S. Zaitzu and T. Imasaka, “Control of quantum pathways for the generation of continuous-wave Raman sidebands,” Optics Express, Vol. 19, 24298–24307 (2011).
2. S. Zaitzu and T. Imasaka, “Continuous-wave multifrequency laser emission generated through stimulated Raman scattering and four-wave Raman mixing in an optical cavity,” IEEE Journal of Quantum Electronics, Vol. 47, 1129–1135 (2011).
3. S. Zaitzu and T. Imasaka, “Phase-matched generation of high-order continuous-wave coherent Raman sidebands,” Optics Communications, Vol. 285, 347–351 (2011).
4. S. Zaitzu and T. Imasaka, “Quantitative measurement of the phase-locking of highly repetitive ultrashort optical pulses generated by a multifrequency continuous-wave Raman laser,” Applied Optics, Vol. 49, 1586–1592 (2010).

(2)特許出願

該当なし

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- | |
|---|
| 1. 財津慎一、今坂藤太郎、「コヒーレント分子運動による連続発振光波変調」第 60 回応用物理学関連連合講演会、2013 年 3 月 28 日、神奈川工科大学 |
| 2. S. Zaitzu, “Development of novel light sources based on intracavity phase-matched nonlinear optics,” Academia Sinica & JST Joint Workshop on “INNOVATIVE USE OF LIGHT AND NANO/BIO MATERIALS,” International Conference Hall, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, May 26-27, 2011. |
| 3. S. Zaitzu and T. Imasaka, “Generation of continuous-wave Raman sidebands through degenerate and nondegenerate intracavity four-wave mixing,” Conference on Lasers and Electro-Optics 2011, Baltimore Convention Center, Maryland, USA, May 1-6, 2011. |
| 4. 財津慎一、今坂藤太郎、「分子変調モード同期レーザーによる超高繰り返し光パルス列の発生」第 58 回応用物理学関連連合講演会、2011 年 3 月 27 日、神奈川工科大学 |
| 5. S. Zaitzu and T. Imasaka, “Broadband phase-matching of nonlinear optical interaction induced in a dispersion-compensated optical cavity,” Advanced Photonics and Renewable Energy: OSA Optics & Photonics Congress 2010, Karlsruhe-Messe and Kongress, Karlsruhe, Germany, June 21-24, 2010. |

研 究 報 告 書

「In-situ laser photo-fabrication of metallic nanoprobe inside living cells for spectroscopic analysis of biofunctions」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研 究 者: Nicholas Isaac Smith

1. 研究のねらい

This project aim is to develop new nanotechnology and apply it to analytic bioimaging. Nanoparticles have been of great interest to scientists due to their unique abilities to act as nanoprobe inside biological cells. A local antenna effect allows nanoparticles to report the local chemical environment inside a cell, unattainable by other means. For example, with the single molecular detection sensitivity that comes with such local enhancement, it is in principle possible to discover exactly which molecules are involved in complex cellular signaling pathways. Single molecule detection has already been established for some biological molecules using these methods. However, until now there has been no way to put a particle at a location of interest in the cell. Cellular uptake and final destination of particles in the cell could not be controlled. This project overcame these limitations by using light-based direct fabrication of nanoparticles at any location of interest inside the cell. Using photoreduction of gold ion solution, gold nanoparticles and nanostructures could be formed. Nanoparticles had previously been observed to form in cells over long periods of time. This project used light to drive the reduction reaction and create targeted particles. Using different light sources, including linear and nonlinear photon processes, the project aimed to establish the best procedure to photofabricate intracellular structures. The project further aimed to establish such fabricated gold structures as probes for surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy, and to develop methods for detecting weak signals from SERS-active regions from amongst the thousands of spectra that are recorded in a 3-dimensional Raman hyperstack of data.

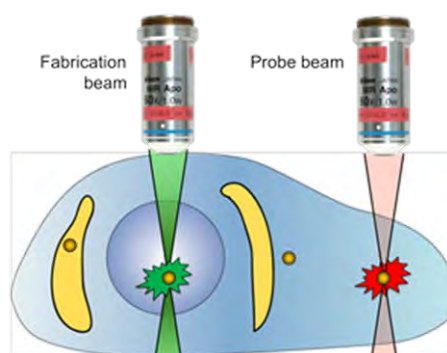


Figure 1: Fabrication beam creates nanoparticles inside the cell whereby cellular molecular information can then be read by a separate probe beam.

2. 研究成果

(1)概要

The project outcomes can be separated into three areas. The first is the findings on fabrication and the properties of the particles, the second is additional outcomes related to the use of nanoparticles in cells or the detection of Raman signals, and the third area is not yet

open and includes patents and publications currently under submission. At the beginning of the project fabricated structures were quite large and not likely to be useful as probes inside cells. The subsequent solution to this problem using 532 nm laser light produced nanoparticles of between 2 and 20 nm in size, which are smaller than usually used in cell nanoparticle applications but large enough to satisfy the requirements of the project (submitted for publication). A wide range of chemical and optical parameters were varied and the optimum procedure for fabricating particles was determined. A problem was to observe whether the particles would generate significant heat under the influence of the incident laser. To measure this, nanoparticles were irradiated by 532 nm laser and the thermal-induced shift in the scattering spectra of particle coatings were measured (Opt Express 2010). Other important findings were made on immunological effects of particles on cells (Particle 2013). During the measurement of surface-enhanced Raman signals it was determined that even with targeted laser fabrication, it is not trivial to find locations with enhanced Raman signals. To this end, a number of algorithms were developed to search for and identify SERS spectra from within an imaging zone (J. Biophotonics 2012). This proved to be a necessary development for the progress of the overall project and significantly improved the data generated by laser fabricated probes.

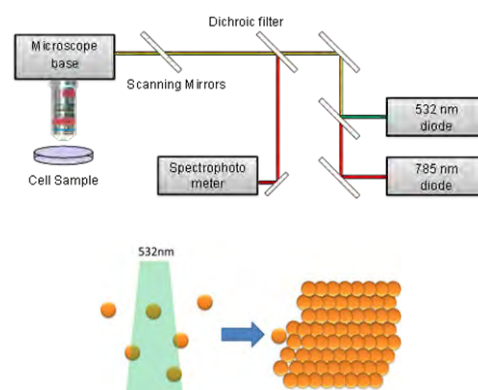


Figure 2: Optical setup for fabrication and schematic of reduction and aggregation of gold into nanoparticles.

(2) 詳細

研究テーマ A 「In-situ fabrication of gold nanoparticles and nanostructures inside biological cells」

Particles were fabricated in cultured cells using the 532 nm beam of a diode laser, as shown in Figure 2, following incubation in gold ion solution. The beam was directed to the microscope by scanning mirrors, collinear with the 785 nm probe beam so that either beam could be directed to the sample by computer controlled mirrors. The focusing target in the cells is chosen by a separate set of scanning mirrors. Gold ions in the solution are reduced and aggregated by the 532 beam. Previously, multi-photon fabrication of silver nanoparticles (outside cells) had been shown, where the multiphoton effect serves to localize the reduction to

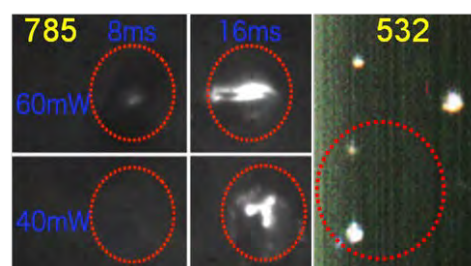


Figure 3: Luminescence measured from regions irradiated by 785 nm pulsed laser and 532 nm. The red circle in each case shows a 10 μ m region for size comparisons. Results show strong nonlinearity with 785 pulsed irradiation.

the area around the focal spot. Therefore, initially, a separate 785 nm fs pulsed laser (not shown in Figure 2) was trialed before moving to 532 nm setup..

Proof of particle fabrication was performed using a number of different methods. The presence of particles was confirmed with electron microscopy imaging, with chemical characterization of gold properties performed by X-ray spectroscopic analysis. Figure 3 shows luminescence images from fabricated regions. The 785 nm pulsed irradiation regions were found to result in strongly nonlinear formation, with a doubling in exposure time causing a large difference in the amount of fabrication occurring. Since this is difficult to control, the laser was changed to a 532 nm beam. Figure 3 also shows fabricated regions using the 532 nm beam. Direct comparison of the two regimes (532 vs 785) is not possible, but the 532 nm fabrication uses tightly focused Gaussian beams of several milliwatts of power, with the laser focus inside the cell. In contrast to the 785 pulsed regime, the 532 nm single-photon process was found to produce repeatable generation of particles at the laser focus. The selection of fabrication photon absorption process should lead to an interesting number of possibilities in fabrication whereby a mixture of the single and multiphoton absorption processes may control the photo-induced growth to the experimentalist requirements.

The presence of gold ion solution was determined to halt some cell metabolism and therefore preclude long-term viability, with the results that experiments should be carried out rapidly after fabrication. For long-term viability of samples, additional steps are required.

Most research done using nanoparticles and lasers has not treated the question of the direct laser effect on the nanoparticle, including heating effects. Though difficult to measure, a critical question is whether the 532 nm beam can heat the newly formed particles. To solve this, nanoparticles were coated by an organic polymer with thermally sensitive refractive index and immersed in water to simulate the conditions of nanoparticles inside a cell. The scattering spectrum from a broadband light source was then observed to be shifted (Optics Express, 2011). This was the first direct measurement of such type of laser-nanoparticle effect, and the results showed that the laser heating effect is limited to around one degree with the type of 532 nm irradiation used here. Such low thermal effect indicates laser fabrication of particles occurs by photochemical means.

研究テーマ B 「Detection of Surface-enhanced Raman from Fabricated Areas」

Since metallic nanoparticles are much smaller than the diffraction limit of normal microscopy, they are in effect a point-light source. Surface-enhanced Raman scattering was generated when the incident laser field is locally amplified, and molecular vibrations interact with the amplified field, producing frequency-shifted emission. In this way, the local enhancement from

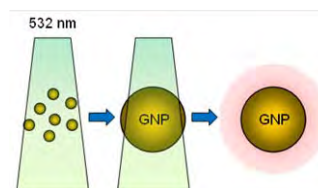


Fig 4: Upon aggregation of gold nanoclusters which lead to growth of the nanoparticle, the 532 nm beam can cause heating effects.

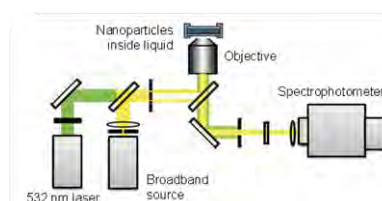


Fig 5: Schematic for measuring heating effects of laser irradiation on nanoparticles in a liquid.

the particles allows the determination of the amount and or type of molecule in proximity to the nanoparticle at single molecule sensitivity. This means that it is very important to be able to control the nanoparticles in the cell. The use of laser irradiation produced particles at chosen locations and surface-enhanced Raman was observed. Figure 6 shows such signals from irradiated regions inside a cell. These signals could be produced in the case of 532 nm but not in the case of 785 pulsed multiphoton fabrication due to the large size of structures. However, even using laser fabrication, the presence of nanoparticles is subject to statistics, and the resulting Raman hyperstack contains a very large number (typically more than 10,000 spectra), and the signals of interest are very difficult to find. The 3d hyperstack of spectra contains some molecular signatures but most data is enhanced background fluorescence or noise. A semi-automated method of detecting, processing, and characterizing the spectra was therefore needed. (Figure 7). 15 different algorithms were trained on test data and then applied to real cell spectra to determine the optimum process (details in J. Biophotonics, 2012) The results shown in Figure 8 allowed greatly improved surface-enhanced Raman data, with the relevant spectra extracted, and classified in spatial position (color overlays in Fig. 8), and grouped by relevance and self-similarity with other spectra (identified clusters in Fig. 8). Together, this was a significant step forward in the use of surface-enhanced Raman measurement, both for this project and also for other related works.

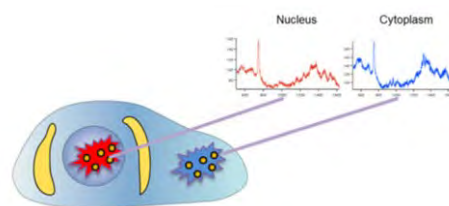


Fig 6: Surface enhanced Raman scattering from particles in the cell.

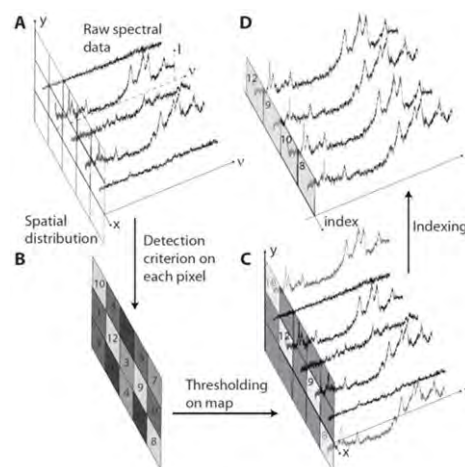


Fig 7: Schematic of approach to automated detection of SERS from fabricated regions in measured data.

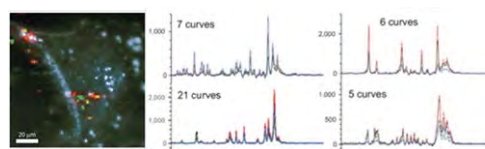


Fig 8: Automated Detection and clustering reports the spectra present in the data and identifies clusters of similar molecules.

3. 今後の展開

Fabrication of nanoparticles in cells has been shown and has been controlled by light. In the short duration of this project, only a few different applications were explored, and the applications in surface-enhanced Raman were deemed to be so important that they were main focus in applications. However, there are a large number of applications of nanoparticles, and these can be developed into separate projects. For example, even though the heating calculations

performed indicate that the thermal effects can be kept within one degree or a few degrees, by alternatively increasing the laser power we should be able to generate additional heat in the target cell. And the heat generation is localized to the area around the nanoparticle since its absorption is far higher than the rest of the cell. This should lead to interesting photodynamic therapy options.

The selection of the fabrication photon absorption process by choosing either 532 nm or 785 nm pulsed irradiation should lead to interesting possibilities. While, during this project, the large structures shown in Figure 3 were avoided so as to enhance the possibilities of detecting surface-enhanced Raman, they show it is possible to make much larger structures. The combination of the two laser beams should allow separation of seeding and growth processes with independent control over each.

To widen the applicability of this developed technique and also other Raman measurements in general, a spectral database is currently underway to help analyze the molecular contents measured in the cells, and in combination with the analytic tools developed during this project, should be a large step towards making meaningful spectral measurements in a number of different cells.

The fabrication process is shown to provide localized antennas for laser energy deposition so that a new type of photodynamic therapy may become possible. This too, should be investigated.

4. 自己評価

From the main aims of the project, most were successful. The fabrication of particles was proved, and was developed into a reliable protocol. The application of these fabricated probes to measure the intracellular environment was demonstrated. Measurement of Surface-enhanced Raman was an important secondary outcome, which was not obvious whether it would work, and was successfully completed. The cell health was found to be not robust against the technique, so that instead of live applications, the applications shift more towards analysis of cellular composition and point towards related techniques such as photodynamic therapy. At the close of the project the key findings show the direction towards future use of light-driven creation of nanotechnology for previously impossible measurements..

5. 研究総括の見解

Smith-kenkyusha presented various data showing that Raman signal could be obtained from molecules inside a cell by using nano gold particles. As a main goal of this PRESTO project, he tried to locate chemically gold nanoparticles and to collect spectroscopic information. He did it and demonstrated that surface-enhanced Raman spectra could be obtained with those particles, however, the living cell is always unstable and cannot survive under that condition, and eventually the goal is left as a future subject. During the project he has encountered various problems for example longer-term viability in biological cells. I believe he will overcome these problems and demonstrate the usefulness of his original idea to fabricate gold particles inside cells very soon.

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. D. Pissuwan, Y. Kumagai and N. Smith, "Effect of surface-modified gold nanorods on inflammatory cytokine response in macrophage cells", Part. Part. Syst. Charact. (2013), in press. |
| 2. N. Pavillon, K. Bando, K. Fujita and N. I. Smith, "Feature-based recognition of Surface-enhanced Raman spectra for biological targets", J. Biophotonics (2012), in press |
| 3. A. Hobro, A. Konishi, C. Coban and N. I. Smith, "Raman spectroscopic analysis of malaria disease progression via blood and plasma samples", Analyst (2013), in press. |
| 4. Y. Kumamoto, A. Taguchi, N.I. Smith, and S. Kawata, "Deep ultraviolet resonant Raman imaging of a cell," J. Biomed. Opt. 17(7), pp. 076001-1-076001-4 (2012) |
| 5. M. Honda, Y. Saito, N. I. Smith, K. Fujita, and S. Kawata, "Nanoscale heating of laser irradiated single gold nanoparticles in liquid," Opt. Express, Vol. 19, Issue 13, pp. 12375-12383 (2011). |

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・国際会議招待講演(件)

1. N. Smith (invited) "Advances in optical microscopy: Nonlinearity and high resolution imaging", Senri Life Science Foundation (千里ライフサイエンス技術講習会), Osaka, Nov.9th, 2011.
2. N. Smith (invited) "Laser irradiation as a tool to highlight details in cell imaging" Senri Life Science Foundation (千里ライフサイエンス技術講習会), Osaka, Nov.9th, 2011.
3. N. Smith (invited), K. Fujita, S. Kawata, and Y. Kumagai "Optical control of cell functions: using laser light to remote control signalling, contraction and action potentials in living cells" Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO-PR), Sydney, Australia, Aug 28, 2011.

Invited Commentary

N.I. Smith "A light to move the heart" Nature Photonics, Vol 4, September 2010, 587-589

Press coverage:

Focus on Osaka, Supplement in Science, pp. 8-9 Science, 18 February 2011

研究報告書

「X線非線形回折を利用した局所光学応答解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 玉作 賢治

1. 研究のねらい

光を使ったイメージング法は科学・工学・産業のあらゆる分野において極めて強力な研究手法として知られている。しかしながら、光イメージングの空間分解能には、光の波長による回折限界という厳しい制限がある。例えば、可視光を使った場合、数1,000 Åより細かい構造を見ることはできない。このため結晶構造の中で何処の電子が光に応答しているのかを見ることはできない。回折限界に従うと、空間分解能を高めるには短波長の光を使わざるを得ない。X線であればÅ分解能が達成され、分子や結晶の構造まで見ることができる。ところが、X線では長波長（低光子エネルギー）の光学応答に関する知見は得られない。もし、物質中の個々の電子が光に応答する様子、すなわち、“局所光学応答”を解明できれば、物質の光学的な性質のより深い理解が得られるだけでなく、新しい光機能材料の研究開発に役立つなど、大きな波及効果が期待される。

例として、高温超伝導体や強相関電子系の舞台として近年注目を集めている3d遷移金属酸化物を取り上げる。これらの物質群では、遷移金属の3d電子が重要な役割を担うと考えられている。従来のX線回折法で3d電子の情報を得るためには、K吸収端付近で $1s \rightarrow 3d$ 励起を利用しなければいけないが、これは禁制であるため解釈が難しく問題が多い。これを避けるために、近年、軟X線で $2p \rightarrow 3d$ 励起（L吸収端）が利用されるようになったが、波長の長い軟X線ではÅ空間分解能は達成できない。軟X線領域でÅスケールの局所光学応答を見ることができれば、3d遷移金属酸化物の研究で強力な手法となる。

上記のような背景のもと、本研究では波長1 Å程度の硬X線領域における非線形光学現象の一つであるX線パラメトリック下方変換（X線PDC、parametric down-conversion）を利用して局所光学応答を解析するという全く新しいイメージング手法の開発を目指した。X線PDCでは物質との非線形な相互作用により、1つのX線光子がX線とより長波長の2つの光子に変換される。このとき、変換効率を決定する2次の非線形感受率が長波長での光と物質との相互作用の強さを反映し、これから長波長の光に対する局所光学応答が解明できると考えた。なお、本研究提案は70年代の理論研究を発展させたものであるが、X線PDCの観測が極めて困難であるため、この分野は40年近くほとんど進展が見られなかった。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は、X線領域の2次の非線形感受率、 $\chi^{(2)}$ 、の理論的な考察、X線パラメトリック下方変換（X線PDC）の測定、およびX線PDCの高精度観測のための装置開発の3つ柱から成る。また、研究目標達成のために、ダイヤモンドを用いたアイディアの実証とニッケル酸化物を用いた応用の探索の2つのサブテーマを実施した。

まず、70年代の先行研究を元にX線領域での $\chi^{(2)}$ を計算しなおし、 $\chi^{(2)}$ と局所光学応答の関係を理論的に明らかにした。X線PDCでは、 $\chi^{(2)}$ によってポンプX線がシグナルX線とアイドラー光に分裂して、非線形回折が起こる。これを様々な反射面で測定することで、結晶構造解析と同様に、アイドラー光の周波数での局所光学応答が解析できることを理論的に示した。

この理論を実証するために、ダイヤモンドでX線PDCの高精度測定を行った。理論に従って測定データを解析し、60eV(207 Å)の真空紫外光に対するダイヤモンドの局所光学応答を0.54 Å空間分解能で解明した。この分解能は380分の1波長に達し、これまでにない超高分解能が達成された。これによって本研究で提唱した局所光学応答解析のアイデアが成立することを実証した。

並行して、この新しい手法を物質・材料研究に応用するために、より高い精度で、より微弱な信号を測定できるように測定装置の開発と改良を行った。特に、集光装置と放物面鏡を用いた分光光学系の開発によって、研究開始時点に比べて格段に高い精度でX線PDCの測定が行えるようになった。

本研究期間の後半では、物性研究への展開を見据えてニッケル酸化物でX線PDCの測定を試みた。NiO単結晶でアイドラーをNiのM吸収端(3p→3d遷移)に共鳴させてX線PDCの観測に成功した。この結果、X線PDCによる局所光学応答解析を通じて、Å分解能で3d電子の空間情報を得られることを示した。さらに、Nd_{1.5}Sr_{0.5}NiO₄でNiのM吸収端共鳴を利用して、電荷秩序の直接観測を目指した測定も行った。

(2) 詳細

以下では本研究の主たる成果として3つのテーマについて述べる。測定装置の開発・改良については紙面の制約により割愛する。

研究テーマA「X線領域の2次の非線形感受率の理論的研究」

X線PDCを含む2次の非線形過程では、3つ光子が関与する。X線領域の場合、その内の2つは必ずX線であるが、残りの1つ(以下アイドラーとする)は赤外～X線までの領域で自由に選ぶことができる。本研究では局所光学応答を取り扱うので、特にアイドラーが光学領域にある場合について2次の非線形感受率、 $\chi_Q^{(2)}(\mathbf{r}, \omega_p = \omega_i + \omega_s)$ を考察した。ここで、添字の*p*、*i*、*s*はそれぞれポンプ、アイドラー、シグナルを意味する。70年代の理論研究を発展させ、より近似の少ない解釈をとることによって、 ω_i が共鳴から離れており、かつ、非線形結晶が等方的である場合には、

$$\chi_Q^{(1)}(\omega_i) = \frac{2mc\omega_s}{e\theta_{\text{psi}}} \chi_Q^{(2)}(\omega_p = \omega_i + \omega_s)$$

が成り立つことを導き出した(論文1)。ここで、添字のQは物理量を逆格子ベクトルでフーリエ展開したときのフーリエ係数を表し、 θ_{psi} は偏光因子を表す。なお、感受率がフーリエ係数として表れるのは、位相整合条件を満たすために回折を利用することに由来する。様々な逆格子ベクトルQ、すなわち反射面について $\chi_Q^{(2)}(\omega_p = \omega_i + \omega_s)$ を測定すれば、フーリエ合成、

$$\chi^{(1)}(\mathbf{r}, \omega_i) = \sum_{\mathbf{Q}} \chi_Q^{(1)}(\omega_i) \exp(i\mathbf{Q} \cdot \mathbf{r})$$

によりÅ分解能で線形感受率の空間構造を明らかにできる。線形感受率は光に対する応答を決定しており、まさに本研究で解明しようとした局所光学応答に他ならない。

研究テーマB「ダイヤモンドにおける局所光学応答解析」

研究テーマAで予測した $\chi^{(2)}(\mathbf{r}, \omega_p = \omega_i + \omega_s)$ と $\chi^{(1)}(\mathbf{r}, \omega_i)$ の関係を実証するために、ダイヤモンドを用いてX線PDCの測定を行った。ポンプX線の光子エネルギーは11.107 keVとし、アイドラーは真空紫外から極端紫外領域の60～120 eVとした。測定した逆格子ベクトルは、 $\mathbf{Q}=(1,1,1)$, $(2,2,0)$, $(3,1,1)$, $(2,2,2)$, $(4,0,0)$ である。なお、このように複数の逆格子ベクトルに対して、定量解析可能な精度で測定したのは、世界で初めてのことである。

まず、図1左のような非線形回折のロッキングカーブ、すなわちシグナルX線強度の位相整合依存性を測定した。これから $|\chi_Q^{(2)}(\omega_p = \omega_i + \omega_s)|$ を求め、研究テーマAの理論式を用いて、 $|\chi_Q^{(1)}(\omega_i)|$ を得た。さらに、結晶構造解析の手法を使って位相を決定した。こうして求めた $\chi_Q^{(1)}(\omega_i)$ をフーリエ合成して、図1右のような真空紫外領域でのダイヤモンドの線形感受率の空間構造を明らかにした。

図1右より、原子位置と2原子の中間とでは線形感受率の符号が逆であることが分かる。これは、原子核に強く束縛された1s電子が光に対して同位相で、一方で結合電荷は逆位相で振動していることを示している。この相違は、それぞれの電子の束縛エネルギーの違いに対応している。また、線形感受率の大きさを比較すると、結合電荷が光学応答を支配していることも分かる。特に、局所光学応答から求めた線形感受率の値は、別の独立な手法で決定した電荷密度を使ったローレン

ツ模型と良く一致することが判明した。この一致によって、本研究で提唱した局所光学応答解析のアイデアが正しいことを実証し、同時に、測定データから局所光学応答を得る一連の解析方法を確立した(論文1)。

図1のように、内殻電子と結合電子の違いといった微視的な情報が分かるのは、X線PDCとX線非線形回折を利用した効果であり、実際に図1右の空間分解能は0.54 Åに達する。これは今議論している真空紫外光の波長である207 Åに対して、僅か380分1に過ぎない。この値は回折限界で決められる2分の1波長を遥かに凌駕し、これまで実現されたことのない超高空間分解能が達成されたことを意味する。

研究テーマC「共鳴X線PDCの物質科学への応用研究」

X線PDCを用いた局所光学応答の研究手法は、単に光学応答をÅスケールで可視化するだけでなく、光を介して物質の様々な情報を得るために応用できる。この研究テーマでは、ア

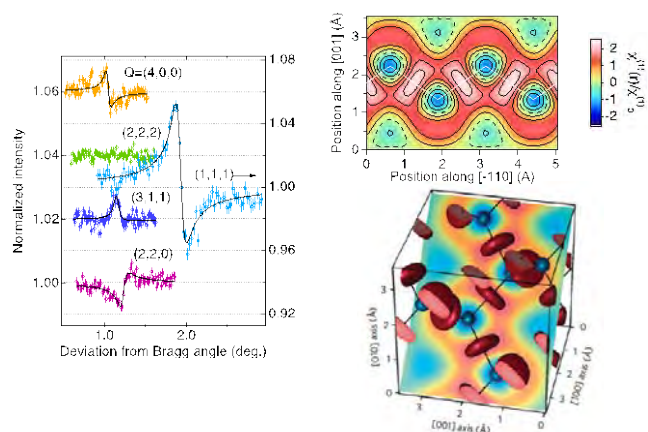


図1. 左: X線非線形回折のロッキングカーブ(シグナルX線強度の位相整合依存性)。右上: (110)面内での $\chi^{(1)}(\mathbf{r}, 60 \text{ eV})$ のイメージプロット。白線は炭素間の結合を表す。右下: $\chi^{(1)}(\mathbf{r}, 60 \text{ eV})$ の3次元プロット[Nature Physics 7, 705 (2011)]。

イドラー光を3d遷移金属酸化物のM吸収端、つまり3d軌道から3d軌道への光遷移に共鳴させて、3d軌道の情報を得ることを目的とした。

まず、アィドラー光をM吸収端に共鳴させた時に、その効果がX線PDCに現れるかどうかを明らかにしなければならない。そこで、単純な構造を持つNiOで実証実験を行った。ポンプX線の光子エネルギーは7.733keVとし、 $Q=(1,1,1)$ でX線PDCのロッキングカーブを測定した。その結果、確かにM吸収端で非線形回折のロッキングカーブが、共鳴に特有なローレンツ型からファノ型に移行する変化を示すことが分かった。これによって、特定の軌道に共鳴させたX線PDCを測定すれば、その軌道にいる電子に関する空間構造を、共鳴の波長に制限されることなくÅ分解能で調べられることを示した。

なお、吸収の強いNiOで高精度測定を行うための研究開発を通じて、分光技術が格段に進歩した。ここで得られたノウハウは既にX線自由電子レーザーを用いたX線多光子過程の観測に応用され、大きな成果を生んでいる。

次に物性物理の分野でも興味を持たれている $\text{Nd}_{1.5}\text{Sr}_{0.5}\text{NiO}_4$ を研究対象とした。この物質は、典型的な高温超伝導体として知られている $\text{La}_{2-x}\text{Sr}_x\text{CuO}_4$ と同じ構造を持つ。 $\text{Nd}_{1.5}\text{Sr}_{0.5}\text{NiO}_4$ では強い電子間相互作用により、図3のような電荷の秩序状態が出現すると考えられている。現在、X線構造解析などにより電荷秩序の存在が示唆されているが、直接的な検証は未だに行われていない。本研究では、電荷秩序を特徴付ける逆格子ベクトルでX線PDCにM吸収端の共鳴効果が見られれば、直接的な証拠となることを提唱した。しかし、報告書執筆時点で明確な信号は得られておらず、研究を継続中である。

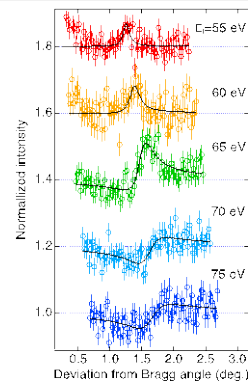


図2. NiOで測定されたX線PDCのロッキングカーブ。アィドラー光がNiのM吸収端(68eV)を超えると、角度依存性に特徴的な変化が表れる。

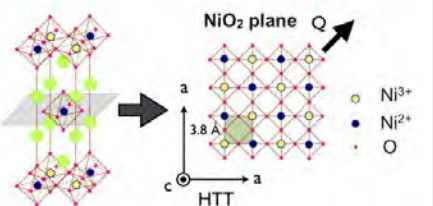


図3. $\text{Nd}_{1.5}\text{Sr}_{0.5}\text{NiO}_4$ の結晶構造と NiO_2 面での電荷秩序。2価と3価がチェッカーボード型に整列すると考えられている。

3. 今後の展開

共鳴X線PDCによる軌道選択的な測定手法を発展させることで、本研究で目指した静的な秩序状態の直接観測だけでなく、ある軌道の動的に揺らいでいる空間構造をも調べられると期待される。これは秩序による格子歪みを測定する旧来の方法では決して知ることが出来ない情報である。また、X線自由電子レーザーからのフェムト秒のX線を使ったポンププローブ法とX線PDCを組み合わせれば、局所光学応答の時分割測定が可能になる。これまでの反射・吸収係数といったマクロな測定に比べて、励起状態の時間発展をマイクロに議論できるという利点がある。以上のような測定が実現されれば、物性・材料研究分野への大きな波及効果が期待できる。

さらに、本研究では2次の非線形過程を研究したが、3次の過程でもX線に特有な機構が考えられ、そこから有用な情報を引き出せる可能性がある。今後、X線領域の3次の非線形過程へと研究を展開する必要がある。

4. 自己評価

本研究は、物質中の電子がどのように光に応答しているかという局所光学応答の解析法を提案し、それを物性・材料研究で注目を集めている3d遷移金属酸化物に応用することを目的とした。3年半の研究により、前半部分に関してはダイヤモンドを用いた測定(図1)により実証できた。後半部分の応用に関しては、ニッケル酸化物(NiO)において確かに3d電子のみを見ることが出来る(図2)ことを示した。残念ながらNd_{1.5}Sr_{0.5}NiO₄では決定的なデータを得られなかったが、当初の目標はほぼ達成した。特に、本研究の成果である研究テーマAで導出した $\chi_Q^{(2)}(\omega_p = \omega_i + \omega_s)$ の表式、研究テーマBで確立した局所光学応答の解析方法は、将来に渡ってこの研究分野の基礎をなすものであり、「さきがけ」として十分な成果である。

また、本研究に関する関心は国際的に高く、国際会議での招待講演は10回を数え、2013年度も既に2件予定されている。本研究が全く新しいものであることはもちろんであるが、加えて、今まさに立ち上がりつつあるX線非線形光学という新分野で初めて有用な応用(研究テーマC)を示した点が評価されたと思われる。本研究がこの新分野に残した足跡は大きいと評価している。

5. 研究総括の見解

硬X線領域における非線形光学現象の一つであるX線パラメトリック下方変換を利用して局所光学応答を解析する新しい研究手法を提案した。照射する波長1 Å程度の空間分解能と、非線形光学現象により放出される極端紫外～真空紫外光の光学応答を得ることができることを、理論計算により確認するとともに、ダイヤモンドを用いた実験を行い、原子の荷電子と原子間の結合電子のそれぞれの分布を得ることに成功した。アイデアの新規性とその実証実験は高い反響を呼んでいる。大型放射光のX線光源を個人研究に駆使したこの研究は、まさに「さきがけ」研究としてインパクトを与えるものであり、今開発した装置を駆使してさらにこの分野を広げてほしい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kenji Tamasaku, Kei Sawada, Eiji Nishibori, Tetsuya Ishikawa. Visualizing the local optical response to extreme-ultraviolet radiation with a resolution of $\lambda/380$. Nature Physics 2011, 7, 705–708.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)



学会発表(国際会議、招待講演): 10件

1. Kenji Tamasaku, “Recent progress in X-ray nonlinear optics and future perspectives”, Workshop on Evolution and control of complexity: key experiments using sources of hard x-rays”, 2010/10/12, Argonne USA.
2. Kenji Tamasaku, “Recent progress in x-ray nonlinear optics and future perspectives”, 21st International Congress on X-ray Optics and Microanalysis (ICXOM21), 2011/9/6, Campinas Brazil.
3. Kenji Tamasaku, “X-ray parametric down-conversion and the second order nonlinear susceptibility”, The 42nd Winter Colloquium on the Physics of Quantum Electronics (PQE-2012), 2012/1/6, Snowbird USA.
4. Kenji Tamasaku, “Parametric down-conversion of X-rays into the optical region and its applications”, International Workshop on ATOMIC PHYSICS, 2012/11/27, Dresden Germany.
5. Kenji Tamasaku, “X-ray nonlinear optics at SPring-8 & SACLA”, Ringberg meeting on FELs 2013, 2013/2/17, Munich Germany.

その他の学会発表:

国内会議(招待講演): 3件

国際会議: 1件

総説: 2件

1. 玉作賢治、澤田桂、西堀英治、石川哲也. 「光に応答する電子を個別に観察」、化学、2012年、67巻、2号、12-16頁.
2. 玉作賢治. 「X線パラメトリック下方変換による局所光学応答解析」、Microoptics News、2012年、30巻、1号、13-18頁.

プレスリリース: 1件

1. 「“姉妹”光子の共同作業で観察波長の限界を突破—物質を調べる波長と分解能を決定する波長を分離する手法を考案—」、平成23年7月18日.
朝日新聞(7/21)、日経新聞(7/18)、日経産業新聞(7/19)、日刊工業新聞(7/18)、科学新聞(7/29)に掲載

研究報告書

「微小液滴と超短光パルスの構造制御による超広帯域光変換」

研究タイプ： 通常型

研究期間： 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者： 畑中 耕治

1. 研究のねらい

高強度レーザーパルスと凝縮系との相互作用では、多様な非線形過程が関与し、それら非線形過程を理解し制御することは基礎科学的、技術的に興味深い。本研究では、フェムト秒レーザーパルスの広帯域性を活用しその構造（パルス幅内の周波数変化）と、対象試料とする金ナノコロイド溶液の金微粒子の構造（形状ならびに大きさ）を制御することにより、「近赤外パルス光→電子→パルスX線/THz 波」といった高次非線形過程が関わる超広帯域光変換過程の最適化をめざした（図1）。液体を対象とする X 線発生に関しては、本研究によるセシウム水溶液等を用いた研究例があげられる。また THz 波領域への光変換に関しては、水蒸気を対象試料とする先行研究例は数例見られるものの、本研究で提案した液滴を用いた例は見当たらない。また金ナノコロイド溶液を対象試料とした超広帯域光変換に関しては、本研究者の全く独自のアイデアに基づく内容である。この超広帯域光変換過程においては、光イオン化に伴う電子放出、電子加速/密度増加、散乱、内殻励起と言ったパルス X 線発生に至る諸過程や、四波混合や制動輻射が THz 波発生過程として関与していると考えられる。これら複雑かつ多岐にわたる諸過程が時系列に進んでいくに従い、最適な光周波数は照射するレーザーパルス幅内で時々刻々変化する期待される。また対象試料には金ナノコロイド水溶液を用い、金の電子状態や表面プラズモン共鳴効果を呈する金微粒子の構造（大きさならびに形状）に応じて光変換過程は変化し、それに応じて最適なパルス幅内周波数変化も変化する期待される。これより得られる知見をもとにパルス幅内光変換過程を実験的に明らかにし、新たな光源開発に繋げることを目的とした。



図1 研究内容の概念図

2. 研究成果

(1) 概要

フェムト秒レーザーを試料液滴に集光照射することにより、X線ならびにTHz波を発生させた。塩化金酸水溶液(金は Au^{3+} イオンとして存在)を比較試料とし、金ナノコロイド溶液(金微粒子は球形、直径 ~ 30 nm)を作製し対象試料とした。最短パルスを励起レーザーパルスとする時、X線強度は金ナノコロイド溶液の場合に塩化金酸水溶液の場合と比較して 600–800 倍程度増強した(研究テーマA、論文1、国際学会招待講演 2–5、国内学会招待講演 3–4)。発光スペクトル形状より求められる電子温度は、3 keV程度と金ナノコロイド溶液でより高く、表面プラズモン共鳴効果の関与が示唆された。金ナノ微粒子の粒径ならびに形状(球形ならびにロッド状)が異なる溶液を試料とした時、X線強度に有意な差は見られなかった(研究テーマB、国内学会招待講演 3–4)。一方、アップチャープパルス(レーザーパルスの周波数が徐々に増加するパルス)ならびにダウンチャープパルス(周波数が徐々に減少するパルス)を用いた時、ピーク強度が最高となる最短パルス(40 fs)の時にX線強度が最高とはならず、アップチャープパルスでは 300 fs程度、ダウンチャープパルスでは 400 fs程度でX線強度が最高となった(研究テーマC、国内学会招待講演 2–4)。またX線発生の場合と同様の実験条件下でTHz波測定を行ったところ、1 THz周辺で有意なTHz波発生を誘起することに成功した(研究テーマD)。以上、フェムト秒レーザーと金ナノコロイド溶液を巧みにあわせ用いることにより、THz波からX線に渡る超広帯域光変換を実験的に示すことに成功した。またその光変換過程の最適化に関しても今後の指針が得られ、更なる研究の展開が大いに期待される。

(2) 詳細

研究テーマ A「金ナノコロイド溶液における X 線強度の飛躍的増大」

研究の第一歩として、塩化金酸水溶液(2.5×10^{-3} mol/L)を比較対照試料とし、その溶液にクエン酸を添加し加熱還流により還元反応を誘起することで得られる金ナノコロイド溶液を対象試料とした。金微粒子の形状は透過型電子顕微鏡により直径約 30 nmの球形であることが明らかとなった。これら溶液をインクジェットノズルを用いて直径約 90 nmの液滴としてレーザー照射と同期させて吐出させた。照射するレーザーパルスのパルス幅は最短 40 fsとし、焦点距離 5 cmの非軸放物面鏡により液滴に集光照射した。実験は室温、大気圧下で行った。結果を図2に示す。塩化金酸水溶液では、蒸留水同様、X線強度は極めて低く観測された。一方、同量の金原子を含む金ナノコロイド溶液では、X線強度が飛躍的に増大し、励起レーザー光強度が 0.2 mJ/pulseの時、塩化金酸水溶液の場合の約 660 倍と求められた。X線発光スペクトルは、光子エネルギー10 keV程度に裾を引く形状をなし、Boltzmann分布を仮定して電子温度を求めた所、図3の通りとなった。これよりプラズマの電子温度の観点からも、金ナノコロイド溶液でより高い値を示していることが分かる。以上の結果は、単位体積あたり同量の金原子を含むにも関わらず、金ナノコロイド溶液でX線強度が飛躍的に増大することを示しており、その原因の一つとして、金ナノ微粒子における表面プラズモン共鳴効果に由来する局所電場強度の増大が、X線発生に至る諸過程、特に初期における電子放出の高効率化を誘起していると考えられる。

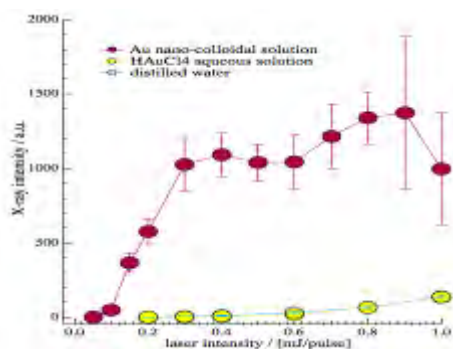


図2 X線強度のレーザー光強度依存性

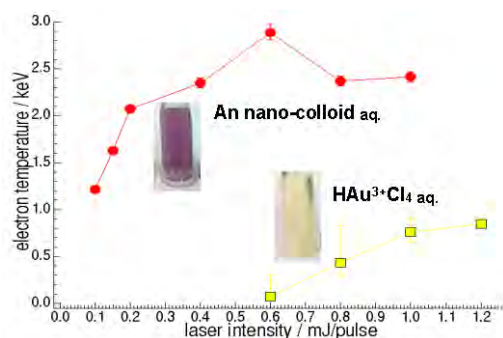


図3 電子温度のレーザー光強度依存性

研究テーマ B「X線発生に対する金ナノ微粒子の大きさ並びに形状依存性」

続いて、加熱還流において添加するクエン酸の量を調製することにより、直径約 10 nm の金ナノ微粒子を含むコロイド溶液を対象試料として同様の実験を行った。その結果、上述の直径約 30 nm の金ナノ微粒子を含むコロイド溶液と比べて、X線強度に有意な差は観測されなかった。さらに、硝酸銀を用いた別法によりロッド状の金ナノ微粒子を含むコロイド溶液を作製した。得られたコロイド溶液の吸収スペクトルを図4に示す。ロッド状微粒子の異方性(図5)に伴い、波長 800 nm 付近に新たな表面プラズモン共鳴ピークが観測されているのが分かる。さらにこの金ナノロッドコロイド溶液に集光すること無くレーザーパルスを照射することにより、微粒子の形状をロッド状から球形(直径約 10 nm)に変化させ、試料とした。ロッド状試料と球形試料を用いて、同様の X線発生実験を行った所、X線強度に有意な差は観測されなかった。レーザー照射面積範囲内にある微粒子の断面積は、球形でロッド状の場合と比べて約2倍程度大きくなると見積もることが出来る。ロッド状にする事によりレーザー波長付近に実吸収が現れる一方で、微粒子の断面積がより小さいことから、X線強度に有意な差が観測されなかったのではないかと推測している。

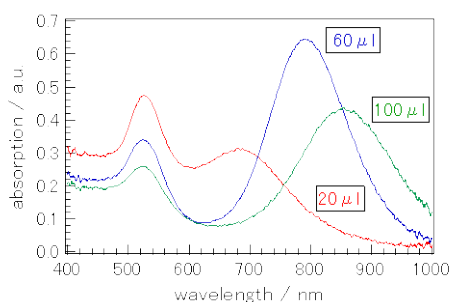


図4 金ナノロッドコロイド溶液の吸収スペクトル：硝酸銀の添加量依存性

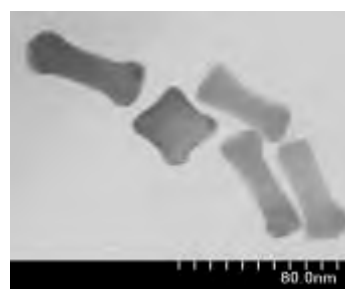


図5 金ナノロッドの TEM 画像

研究テーマ C「X線発生に対するレーザーパルス波形依存性」

液晶型波形整形器を用いて照射するレーザーパルスの2次位相を変調させることにより、パルス波形を整形し、励起レーザーパルスとして用いた。金ナノコロイド溶液(球形、直径約 30 nm)を対象試料とし行った実験の結果を図6に示す。これより、ピーク強度が最も高い最短パ

ルス(40 fs)の時に X 線強度が最高となる訳ではなく、ダウンチャープパルスを用いたとき約 400 fs、アップチャープパルスを用いたとき約 300 fs のパルス幅の時に、X 線強度が最高となることが明らかとなった。各パルス波形の時の X 線発光スペクトルは図7のようであり、これより求めた電子温度は最短パルス 40 fs、ダウンチャープパルス 400 fs、アップチャープパルス 300 fs の時、それぞれ 1 keV、0.7 keV、0.5 keV と最短パルスの時に最も高い値となった。最短パルスの時に X 線強度が低く電子温度として高く求められたことは、レーザーパルスの波形を制御することにより、プラズマ中の電子温度や寄与する電子数を制御し、結果として X 線発光スペクトルを操作出来る可能性を示唆する結果と考えられる。

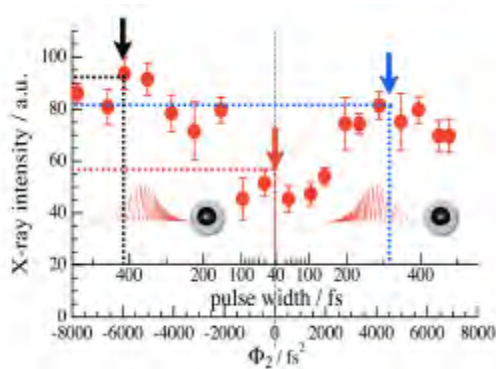


図6 X線強度のレーザー波形依存性

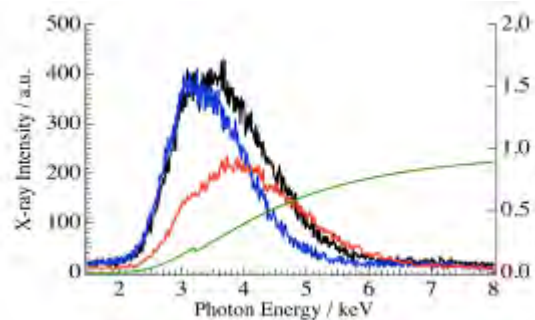


図7 X線発光スペクトルのパルス波形

研究テーマ D「金ナノコロイド溶液を用いた THz 波発生」

金ナノコロイド溶液(球形、直径約 30 nm)を対象試料とし、X 線発生の場合と同条件で ZnTe を検出媒体とする時間分解フーリエ変換分光法による THz 波検出を試みた。実験は室温大気圧下で行った。実験結果を図8に示す。これをフーリエ変換することにより得られる THz 波発光スペクトルを図9に示す。これから明らかな様に、金ナノコロイド溶液を媒体として、1 THz 周辺の発光が明瞭に観測されている。光子エネルギー1.6 eV のフェムト秒レーザーを源とし、keV 程度の X 線と同時に meV 程度の THz 波の発生が誘起されていることは、基礎科学的にも、ベンチトップの新光源開発と言う応用の観点からも興味深いと考える。今後は、THz 波測定と同時に X 線測定を行い、レーザーチャープを変化させながら実験を行うことにより、近赤外光から X 線ならびに THz 波変換を制御することをめざす。

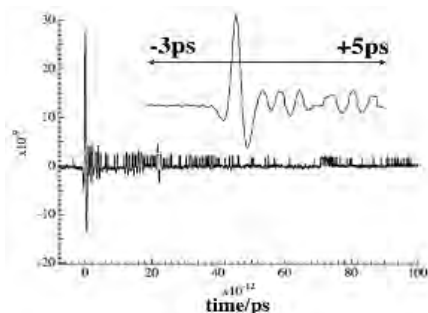


図8 時間分解フーリエ変換分光法による THz 波検出

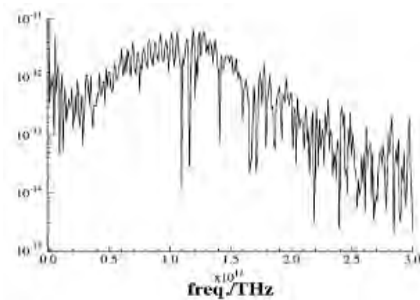


図9 金ナノコロイド溶液からの THz 波発光スペクトル

3. 今後の展開

本研究では、フェムト秒レーザーパルスの広帯域性を活用しパルス幅内の周波数変化と、高強度レーザー照射の対象試料とする金ナノコロイド液滴試料の微粒子の形状を制御することにより、「近赤外パルス光→電子→パルスX線/THz 波」といった高次非線形過程が関わる超広帯域光変換過程の最適化をめざした。こうした取り組みは、ベンチトップで超広帯域パルス光源を実現する内容として、あらゆる研究分野へ資すると考えられる。これまでに上述の結果が得られているものの、今後の展望として課題をあげることが出来る。まず第一点として、金ナノ微粒子を媒体として用いることによる表面プラズモン共鳴効果を期待したが、これまでの実験結果からその効果を実証するに至っていない。最終的な結論を得る為には、星形微粒子を用いる等、より高い表面プラズモン共鳴効果が期待できる試料を対象にして実験を継続したいと考えている。また試料の構造だけでなく、照射するレーザーの波形に関してもさらに工夫が可能であると考えられる。本研究では2次の位相変調のみ印可した波形を用いたが、3次の位相変調によるレーザーパルスのマルチパルス化、さらにはX線強度あるいはTHz波強度を測定基準とする遺伝的アルゴリズムによるレーザー波形の最適化も今後の展開として考えられる。超広帯域光変換過程という観点からは、X線とTHz波を同時に測定しながらレーザー波形を変化させ、eVからkeV、meV領域の光子変換過程を実験的に明らかにしたい。

4. 自己評価

本研究では、フェムト秒レーザーパルスと対象試料溶液を巧みに組み合わせることにより、meV(THz波)からkeV(X線)と広範囲に渡る波長領域の光を自在に発生させることを目的として行ってきた。金ナノコロイド溶液を用いることによりX線強度の飛躍的な増大を見いだすとともに、レーザーのチャープ(周波数変化)を制御することによってX線発光スペクトルを自在に操れる可能性も見いだした。また金ナノコロイド溶液を試料としてTHz波領域においても有意な発光が観測されたことを考えあわせると、当初の目的である超広帯域光変換を実証できたと評価できる。一方で、X線強度に対する金微粒子の大きさや形状依存性はまだ研究展開の可能性が残されており、今後の課題として指針を得た。またX線とTHz波の同時測定に関しても、今後は是非とも行うべき実験内容である。得られた実験結果やそれらに基づく知見は、今後の研究展開の方向性を明確に示しており、さきがけ研究と言う挑戦的課題に取り組む機会を活かせたと考えている。

5. 研究総括の見解

金イオンあるいは形状やサイズの異なる金コロイドを含む液滴試料に対し、パルス幅内の周波数変化を制御したフェムト秒レーザーパルスを照射することにより、パルス状のX線からTHz光までの超高帯域の電磁波を発生できることを示した。同量の金を含む場合では、金イオン溶液に比べると金コロイド溶液のX線発生強度が600倍から800倍も高いことを明らかにした。さらに、照射するレーザーパルス内の周波数変調により発生するX線を制御できることも示した。しかし、研究はX線発生の様々な実験的・理論的課題を明らかにした段階で終了時期を迎えてしまった、今後の大いなる奮闘を期待したい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. K. Hatanaka, K. Yoshida, A. Iwasaki, and K. Yamanouchi, "Femtosecond Laser-Induced X-Ray Emission from Gold Nano-Colloidal Solutions", *Multiphoton Processes and Attosecond Physics*, 2012, Springer Proceedings in Physics 125, pp.407-410, K. Yamanouchi and K. Midorikawa (Eds.).

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際学会招待講演

1. K. Hatanaka, "Effects of Structures of Laser Pulses and Water Droplets upon X-ray Pulse Emission", **The 14th East Asian Workshop on Chemical Dynamics**, May 11-13, 2010, Nara International Seminar House, Nara, Japan.
2. K. Hatanaka, "Applications of pulse shaping to intense laser-matter interactions ; from laser ablation to X-ray", **2011 MIIPS Ultrafast Pulse Shaping Workshop**, Michigan State University, August 19 - 21, 2011, E. Lansing, MI, USA
3. K. Hatanaka, "Intense Femtosecond Laser Interaction with Liquids: From Laser Ablation to X-ray Emission", **The 3rd International Conference on Laser Peening and Related Phenomena**, October 11-14, 2011, Osaka International Convention Center -Grand Cube Osaka, Japan.
4. K. Hatanaka, "X-ray Emission from Gold Nano-colloidal Solution When Irradiated by Focused Femtosecond Laser Pulses", **BIT's 1st Annual World Congress of Nano-S&T**, October 23-26, 2011, World EXPO Center, Dalian, China.
5. K. Hatanaka, "Incomparable Intensity Increase of X-ray from Gold Nano-colloidal Droplets When Irradiated by Focused Femtosecond Laser Pulses in Air", **SPIE Smart Nano-Micro Materials and Devices**, 4-7 December 2011, Hawthorn, Victoria, Australia.

国内会議招待講演

1. 畑中耕治、"金コロイド溶液とフェムト秒レーザーパルスの構造で操る X 線発生"、分子科学研究所研究会"プラズモン増強光電場の分子科学研究への展開"、2010 年 6 月 18-19 日、分子科学研究機構、岡崎。
2. 畑中耕治、"Intense Laser Interaction with Liquids:Laser Ablation to X-ray/THz Wave Emission"、**Prof. Kawata's Group Seminar**, 20 October, 2010, Osaka University.
3. 畑中耕治、"金ナノコロイド溶液からのレーザー誘起 X 線発生"、レーザー学会第 32 回年次大会、2012 年 1 月 30 日-2 月 1 日、TKP 仙台カンファレンスセンター、仙台。
4. 畑中耕治、"微小液滴と超短光パルスの構造制御による超広帯域光変換"、**Extreme Photonics Seminar**、2012 年 5 月 31 日、理化学研究所、和光。

研究報告書

「蛍光イメージングによる幹細胞挙動解析法の創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 樋口 ゆり子

1. 研究のねらい

生体内における恒常性の維持や病態の進行には多種類の細胞が関与し、細胞間コミュニケーションを介して、特定部位への細胞の遊走や、目的細胞への分化が、必要に応じて厳密に制御されている。近年、間葉系幹細胞、iPS 細胞や ES 細胞などの多分化能を有する細胞を患者に移植し、組織修復や臓器再生などを行う細胞治療が、難治性疾患に対する新規治療法として期待されている。間葉系幹細胞については、既に心疾患などに対する治療効果が確認されているが、移植された細胞の体内動態や治療メカニズムに関しては未だ不明な点が多い。したがって、治療効果を左右する重要な要素となりうる、生体内における細胞の体内動態、接着や分化のメカニズムの評価は、有効な治療法確立において重要な情報を提供する。

細胞の体内動態、接着や分化などの挙動の評価においてイメージングは極めて有効な方法である。核磁気共鳴画像法(MRI)、核医学イメージング法(PET, SPECT)、光イメージング法など様々なイメージング法の中で、細胞の挙動の可視化においては、1つの細胞を可視化できる点、蛍光共鳴エネルギー移動(Förster resonance energy transfer:FRET)の利用により分子構造の変化や分子間の距離の変化の可視化が可能である点から、蛍光イメージングが有効であると考えられる。高感度カメラや蛍光プローブの開発が進み、ディッシュ上の生きた細胞を観察対象とした生細胞リアルタイムイメージングも可能になってきた。しかしながら、細胞挙動の評価を行うには、ディッシュ上に播種された細胞ではなく、生体内における細胞の挙動を評価する必要があるが、顕微鏡を用いた生体内の一細胞のイメージングは、呼吸や消化による蠕動運動などの影響で限られた臓器しか観察できなかった。そこで、本研究では、生きたマウスの組織内における1つの細胞の挙動のリアルタイムイメージング法の確立を通して、細胞治療のメカニズムにせまり、有効な細胞療法の確立へ貢献することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究の目的は、生きたマウスの組織内における一細胞の挙動のリアルタイムイメージングによる評価である。まず、生きた動物の組織内における細胞追跡を目的とした、幹細胞の蛍光標識法を開発した。組織内の細胞を顕微鏡で可視化するためには、蛍光強度がある程度強いことが必要である。一方で、移植された細胞の臓器内分布だけでなく、分化後も追跡するためには、長い場合は数か月後、分裂増殖または分化した後も蛍光標識されている必要がある。そこで、強い蛍光を発光する量子ドットや、ゲノムへの目的タンパク質発現配列の組み込みが可能なトランスポゾンを利用した、細胞の蛍光標識法を確立した。

次に、顕微鏡による生きた動物の肝臓、腸、肺、心臓などの観察においては、麻酔下であっても、呼吸、拍動や消化などの臓器の動きが隘路となり観察が困難であるため、これらの組

組織を固定し、顕微鏡での観察を可能にする組織吸引固定デバイスの開発を行った。このデバイスを用いて、肝臓、腸における一細胞の観察が可能になった。さらに、蛍光標識された移植幹細胞や、内在性白血球の挙動の観察にも成功した。さらに、蛍光プローブとこのイメージングシステムを組み合わせることで、生きたマウスにおける一細胞の細胞機能の評価解析を進めている。

(2) 詳細

研究テーマ A 「細胞の蛍光標識法の開発」

蛍光標識に用いられる蛍光分子には、低分子化合物の蛍光色素、蛍光タンパク質、そして近年開発された量子ドットなどの蛍光微粒子がある。中でも量子ドットは、高い蛍光強度を有する点、励起光に対してほとんど退色しない点、さらに、生体組織の自家蛍光の発光寿命が 2 n sec 以下であるのに対して、量子ドットの発光寿命は、約 10 ~ 100 n sec と長いため、励起後、20 n sec 後に測定する時間差測定により、自家蛍光のバックグラウンドの影響を低減させることが可能である点など、In vivo イメージングにおいて有効な特長を有する。一方、現在、ライフサイエンス分野で広く用いられている ZnS 被覆のセレン化カドミウム (CdSe) などのコア・シェル型の量子ドットは、低 pH において蛍光が減衰してしまうことが知られている。従って、細胞を標識する際に、微粒子である量子ドットがエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれた場合、エンドソーム、リソソームと pH の低い環境に暴露される間に蛍光が減衰してしまうことが、長期観察において問題となる。また、幹細胞のようにエンドサイトーシスが活発でない細胞の場合は、微粒子である量子ドットが細胞内に取り込まれにくいことため標識効率が低い事も問題となる。そこで、これらの問題を同時に解決するため、表面にアミノ基を多数有する Polyamidoamine (PAMAM) デンドリマーを修飾した量子ドットを作製した。PAMAM デンドリマーは、表面に正電荷を有するため、PAMAM デンドリマー修飾により量子ドットに正電荷を付加する事が可能になる。また、エンドソーム内の低 pH 環境において、アミノ基の buffering 能によりエンドソームからの脱出促進により中性の細胞質へ速やかに移行させることにより蛍光の減衰を予防する事が期待できる。

マウスより採取した間葉系幹細胞に PAMAM デンドリマー量子ドットを取り込ませた後、蛍光顕微鏡で観察したところ未修飾量子ドットと比較して PAMAM デンドリマー量子ドットのエンドソームからの脱出が促進されていた。また、PAMAM デンドリマー量子ドットのエンドソームからの脱出はプロトンポンプ阻害剤である bafilomycin A 存在下で抑制されたことから、PAMAM デンドリマーの buffering 能によりエンドソーム脱出が促進されたことが示唆された。幹細胞に取り込ませた後、未修飾量子ドットは 3 日後には細胞内の蛍光強度の低下が認められたが、PAMAM デンドリマー修飾量子ドットは 3 日後も蛍光強度がほぼ維持されていた。さらに未修飾量子ドットまたは PAMAM デンドリマー修飾量子ドットを取り込ませた幹細胞をマウスへ静脈内投与し、24 時間後までの、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓を摘出し、組織切片を観察したところ、肺、肝臓、脾臓には、蛍光シグナルが分布する様子が認められたが、心臓、腎臓には認められなかった。また、6 時間後または 24 時間後の肝臓および脾臓の組織切片を作製し蛍光標識された細胞数を計測したところ、未修飾量子ドットの場合は 6 時間後と比較し、24 時間後において有意な低下が認められたのに対し、PAMAM デンドリマー修飾量子ドットの場合

は低下が認められなかった。量子ドットの PAMAM デンドリマー修飾により、pH 低下に伴う蛍光強度の低下を回避し、観察可能時間を延長させることができた。

細胞の分化を追跡するためには、より長期間追跡可能な標識法の開発が必要とされる。また、細胞治療の評価には、株化された細胞ではなく、初代培養細胞が用いられるため、初代培養細胞を長期間標識する方法が必要となる。そこで、トランスポゾンを用いて、蛍光タンパク質の発現配列をゲノム DNA への組込むことで、初代培養間葉系幹細胞を長期蛍光標識する方法を開発した。トランスポゾンは、トランスポゾンの両端に塩基対が逆向きの反復配列を有し、トランスポザーゼと呼ばれる酵素の作用により、その反復配列が認識、切断され、DNA 上の別の位置へと組込まれる。従って、トランスポザーゼによって切り出される反復配列の間に目的遺伝子を挿入したドナーベクターを作製し、トランスポザーゼを作用させれば、目的遺伝子が切り出されて、ゲノム DNA へ組込むことが可能である。そこで、哺乳類動物に対して組み込み効率が比較的高い、piggyBac トランスポゾンを利用し、反復配列の間に目的遺伝子として EmGFP 発現配列を配したドナーベクターを構築し、トランスポザーゼを発現するヘルパーベクターと一緒に、マウスより採取した初代培養間葉系幹細胞にトランスフェクションしたところ、一過性の発現では、1週間程度で蛍光が認められなくなったのに対し、トランスポゾンによる組込みを利用した場合、約1カ月間蛍光標識を持続させることが可能となった。また、抗生物質の耐性遺伝子を同時に組込むことにより、蛍光タンパク質を発現する細胞のみを選別する事もできた。選別により得られた細胞に対し、分化誘導因子を用いて骨芽細胞や脂肪細胞に分化誘導させたところ、分化後も蛍光標識が持続されていることが確認できた。

研究テーマ B 「組織吸引固定デバイスの開発およびマウスの組織内における一細胞の蛍光リアルタイムイメージング」

蛍光の高速撮影が可能なカメラを搭載した顕微鏡システムの開発が進み、生きた細胞内で生じる現象を可視化する生細胞イメージングを容易に行うことが可能になった。また一方で、多光子励起顕微鏡を用いることにより、より深部の蛍光シグナルの検出が可能になった。これらの技術を駆使することにより、生きたマウスの組織内における微粒子や細胞の分布や挙動がリアルタイムに撮影可能になる。耳や目のように皮膚や膜が薄い組織については、カバーガラス上に emersion oil を培養された培養細胞と同じように比較的簡単に撮影できる。近年、脾臓における血流、生きたマウスの脂肪組織における白血球の挙動など腹部に小さな開口を作製し、そこで臓器に対物レンズを近づけて撮影する方法が報告された。しかし、麻酔下であっても、マウスの呼吸、脈動、消化といった生命を維持するために必要な臓器の運動は止めることができず、臓器を撮影する場合は、観察したい箇所を固定する方法が鍵となる。臓器を固定して観察視野を確保する方法としては、組織を体外へ出しカバーガラスを押しつける方法や、ボンドのようなものを用いてガラスに貼り付ける方法が行われているが、マウスおよび組織に対して低侵襲で、観察部位を自由に変更可能な固定法の開発が望まれる。

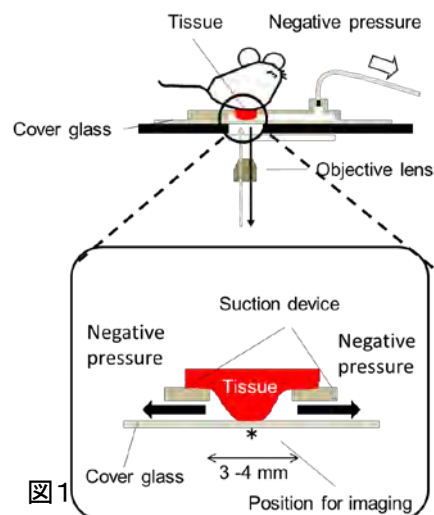


図1

我々は、種々の組織に対して変形せず密着しやすい素材である Polydimethylsiloxane (PDMS)を用いて、組織とカバーガラスの隙間の空気を陰圧にすることにより組織を傷つけることなくカバーガラスに密着させる組織吸引固定デバイスを作製した(図1)。組織吸引固定デバイスを用いて、吸引すると組織がカバーガラスに密着するが、吸引をやめると組織が離れ、観察場所を変更して再度吸引すると最初とは別の部位でカバーガラスを組織に密着させるこ

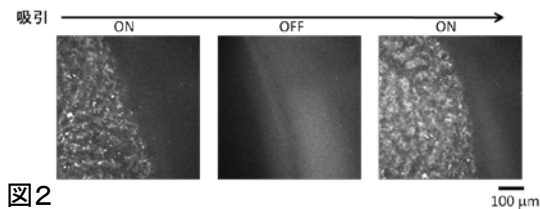


図2

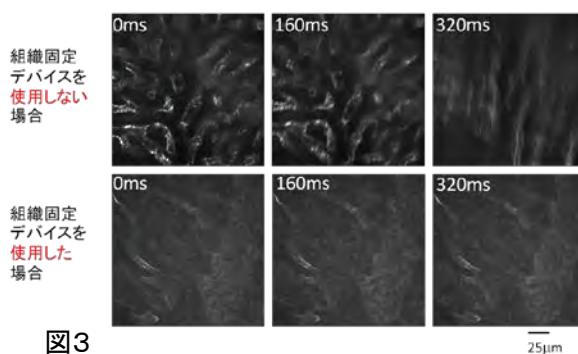


図3

とができた(図2)。組織吸引固定デバイスを用いて、マウスの尾静脈より蛍光色素を投与後の肝臓、または腸を観察したところ、デバイスがない場合は、呼吸や蠕動運動の影響で撮影が困難であったが、デバイスで固定すると、蛍光色素により血管がくっきりと浮かび上がり、赤血球や、白血球などの細胞の形を1細胞ではっきり確認できた(図3)。また、組織吸引固定デバイスを用いて肝臓を固定し、蛍光標識されたリポソームをマウスの尾静脈より投与したところ、リポソームが血流と共に流入し広がる様子が観察できた。幹細胞を量子ドットで標識し、投

与した後、肝臓を組織吸引固定デバイス固定して観察すると、標識された幹細胞が血流に流される様子や、血管内皮細胞上をローリングする様子を観察することができた。さらに、内在

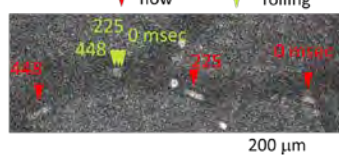


図4

性の細胞については、蛍光色素で標識された抗体を尾静脈から投与することにより、目的の細胞を可視化することが可能であった(図4)。さらに、FRET を利用した高感度カルシウムセンサーである Y.C.3.6 を発現したマウスに対し、バソプレッシンを投与したところ、肝細胞内のカルシウム濃度の変化を FRET により評価することができた。

3. 今後の展開

本研究では、In vivo で細胞を追跡するための初代培養細胞の蛍光標識法および生きたマウスの組織内における一細胞の蛍光リアルタイムイメージング法の開発を行った。

組織吸引固定デバイスは、どのような臓器に対しても固定することができ、繰り返し、長時間観察することができる。また、共焦点レーザー顕微鏡だけでなく、今後新しく開発されるその他のタイプの顕微鏡に対しても利用可能である。したがって、本デバイスの開発により、ディッシュ上に播種された細胞の観察から、生きた動物の組織内における観察までのハードルはほとんどなくなり、培養細胞を観察するのと同じ感覚で、生きた動物の組織内の観察が簡単に行えるようになった。

また、本研究で開発した蛍光標識法や、既存の蛍光プローブと、生きた動物の組織内の観察法を組み合わせた生体内の一細胞観察は、細胞治療だけでなく、疾患メカニズムをはじめとする生命現象に関しても、血流や組織の3次元構造を完全に保ったまま、また、他の細胞とのシグナル伝達も保ったまま、評価することが可能になり、培養細胞を用いた研究では得られなかった情報を得ることが可能になる。

4. 自己評価

生きた動物の組織内において、体外から移植した細胞の挙動を、一細胞で追跡するための、細胞の蛍光標識法ならびにイメージング法を確立できた。この成果は、細胞治療だけでなく、疾患のメカニズム解析や生命現象の研究に対し、培養細胞を使った研究だけでは得ることのできなかった情報を得ることが可能な、極めて有効なツールになると確信している。また、同じ領域の永井博士らの研究に参画し、自由に動くマウス個体に移植されたがん細胞の生物発光イメージングにも成功した。生体内における細胞の機能評価については、既存の蛍光プローブを用いた解析にとどまってしまったが、現在作製中のプローブも含め、細胞治療の治療効果の評価を目的とした新規蛍光プローブを用いて、生きたマウスにおける細胞機能の評価および最終的には機能制御を可能にする方法の確立へと繋げたい。

5. 研究総括の見解

生きたマウスの組織内に体外から細胞を導入しその挙動をリアルタイムでイメージングするため、マウス体内に導入する細胞を識別できるようにするための細胞の蛍光標識法と生きたマウスを顕微鏡下で固定する方法を開発した。前者に対しては、約1ヶ月もの長期間にわたって蛍光機能が維持できる標識法を開発し、後者に対してはマウスの観察部位を固定する治具を考案して特許も出願した。これにより、マウスの臓器に細胞が運ばれていく動態の直接イメージングに成功した。これらの成果を基に、幹細胞の体内動態制御および分化制御を可能とし、新規細胞療法の開発につなげていってもらえると期待している。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. *Higuchi Y, Wu C, Chang K.L., Irie K, Kawakami S., Yamashita F., *Hashida M., Polyamidoamine dendrimer-conjugated quantum dots for efficient labeling of primary cultured mesenchymal stem cells, *Biomaterials*, 2011, 32 (28), 6676-6682
2. Shimizu K., Higuchi Y., Kozu Y., Hashida M., Konishi S., Development of a suction device for stabilizing in vivo real-time imaging of murine tissues, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 112(5), 508-510
3. Saito K., Chang Y.F., Horikawa K., Hatsugai N., Higuchi Y., Hashida M., Yoshida Y., Matsuda T., Arai Y., Nagai T., Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging, *Nature Communications* 2012, 3, 1262

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: 樋口ゆり子、清水一憲、小西聡、橋田 充

発明の名称: 生体試料固定器

出 願 人: 国立大学法人京都大学、学校法人立命館

出 願 日: 2011/11/28

出 願 番 号: 特願 2011-259007

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【主な招待講演】

樋口ゆり子「光を利用した生きた動物におけるリアルタイムイメージング」、第 21 回日本バイオイメージング学会学術集会、2012 年 8 月 27 日、京都

Yuriko Higuchi, Visualizing dynamics of cells in living animal, Japan-France Frontiers of Engineering (JFFoE) 日仏先端工学シンポジウム、2012 年 2 月 25～28 日、京都

Yuriko Higuchi, Mitsuru Hashida, In vivo dynamic visualization of transplanted mesenchymal stem cells in mice, The 11th US-JAPAN Symposium on Drug Delivery Systems, 2011 年 12 月 17 日、マウイ、USA

樋口ゆり子「幹細胞の長期蛍光標識法の開発」日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 29 日、静岡 (オーガナイザー および 発表者)

樋口ゆり子、橋田 充「細胞挙動のin vivoイメージングを目的とした蛍光標識法の開発」、日本薬剤学会第 25 年会、2010 年 5 月 12-14 日、徳島

(ほか、国内10件)

【受賞】

第 5 回 日本 DDS 学会 奨励賞

【著作物】

Kenta Saito, Yuriko Higuchi, Yoshiyuki Arai, Takeharu Nagai: Video-rate imaging of luminescent tumour cells in freely moving unshaved mice. Protocol Exchange (2013)

樋口ゆり子「光を利用した細胞のin vivoイメージング技術の開発」Drug Delivery System 28(1) 17-23 (2013)

樋口ゆり子「幹細胞の蛍光標識法の開発」薬学雑誌、132(4) 433-440 (2012)

樋口ゆり子、橋田 充: ナノバイオ技術と最新創薬応用研究、第 5 章 ナノバイオ技術を応用した薬物・細胞動態の制御と評価、5. イメージングによる細胞の動態評価と医療応用、遺伝子医学MOOK、メディカルドゥ、大阪、20、163-169 (2012)

樋口ゆり子「機能性量子ドットによる細胞の体内動態追跡」レーザー研究The review of laser engineering 38(6), 447-452 (2010)

(ほか、和文2件)

研究報告書

「モジュールの組み合わせによる光機能蛋白質の創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 増田 真二

1. 研究のねらい

太陽光を適切に認識する生体システムは、地球上のほぼ全ての生物にとって必須と考えられる。生体内で光を検知する実体「光受容体タンパク質」は、固有の発色団を結合しており、その発色団が吸収する波長の光に応じて構造を変化させる。その構造変化は下流の因子によって認識され、情報が伝わり、最終的に具体的な機能をもったタンパク質の活性を調節する。近年の研究から、この光シグナル伝達機構は、タンパク質ドメイン(モジュール)の組み合わせで多様化していることがわかってきた。例えば、細菌に一般的に保存されている青色光受容体 BLUF タンパク質は、転写因子と相互作用するドメインや、加水分解酵素ドメインなど、様々なタンパク質モジュールと組合わさったかたちで天然から見つけられている(図1)。本研究では、この青色光受容体 BLUF を、様々なタンパク質機能モジュールと組み合わせることで、新規の光機能タンパク質を創出することを目指した。近年、光受容体タンパク質を改変し、様々な生体機能(例えば神経活動や細胞運動)を光で制御し解析する「光遺伝学」と呼ばれる研究が盛んであるが、ここでは、転写因子の活性を光で自在にコントロールし、生物個体の発生を時空間制御する世界初の系の構築に取り組んだ。

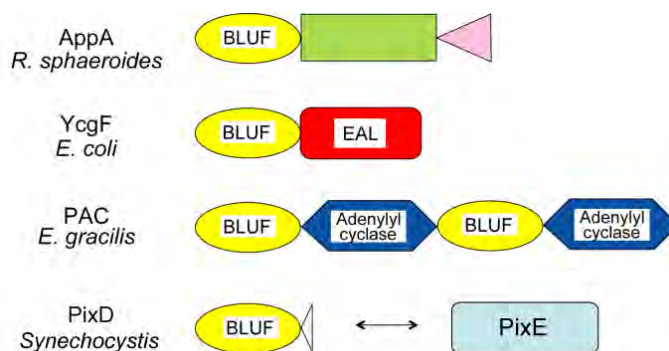


図1: 光受容 BLUF ドメイン含有タンパク質の様々な構造

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、シアノバクテリア *Synechocystis* 由来の BLUF タンパク質 PixD とその相互作用因子 PixE を用いて(図1)、真核多細胞生物内で任意の転写因子の活性を制御する系の構築に取り組んだ。まず、PixD-PixE 複合体形成の詳細を生化学的に解析した。その知見を基に、モデル生物ゼブラフィッシュの尻尾の形成に必要な転写因子 No tail の機能を光依存的に制御することに成功した。PICCORO (PixD complex-dependent control) と名付けたこの転写制御法は、個体発生の各ステップで働くホメオティック転写因子の解析に特に役立つと考えられる。

(2) 詳細

研究テーマ A 「PixD-PixE複合体形成に関する研究」

先の研究で、1) PixD は暗所において 10 量体を形成し PixE と相互作用すること、2) 光を照射すると PixD は 2 量体となり PixE と相互作用しなくなること、3) 10 量体 PixD の結晶構造、がわかっていた。しかしその相互作用の詳しい様態はよくわかっていなかった。PixD-PixE の分子間相互作用を利用した転写制御系を構築する上で、そのメカニズムを明らかにすることが必須と考え研究を行った。

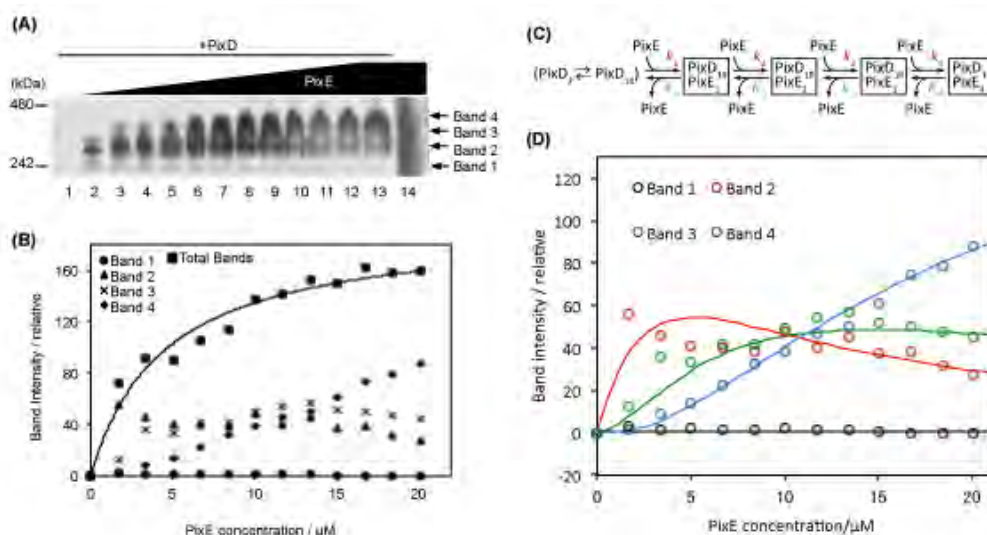


図2: PixD と PixE の複合体形成の生化学的解析

(A) 精製した PixD に PixE を加え、Blue-native PAGE 法により分離すると、PixE 濃度に依存して 4 つのバンド (Band 1, 2, 3, and 4) が観測される。分子量から 10 量体 PixD にそれぞれ PixE が 1, 2, 3, 4 分子結合した複合体とわかった。(B) バンドの濃さから、PixD-PixE 相互作用の乖離常数 (k_d) は約 5 μM と計算された。(C) PixD-PixE 複合体形成の反応スキーム。(D) 各バンドの濃さをコンピュータで解析し、速度常数 k_1, k_2, k_3, k_4 は 2000, 55555, 296, 1851 s^{-1} 、 $k_{-1}, k_{-2}, k_{-3}, k_{-4}$ は 0.002, 0.001, 0.002, 0.180 s^{-1} と計算された。

Blue-Native PAGE 電気泳動法を利用した解析により、10 量体の PixD は PixE 単量体 4 つと相互作用し、最終的に暗所で PixD:PixE=10:4 の超分子複合体を形成することがわかった (図 2)。またそれぞれの PixD-PixE 複合体の乖離常数と PixE が相互作用する速度常数を決定した (図 2)。

次に、コンピュータシミュレーションにより、PixE の予想構造を決定した。得られた PixE の構造と PixD の結晶構造を基に、ドッキングシミュレーションを行い、PixD-PixE 複合体の予想構造を決定した (図 3)。得られた複合体の予想構造は、上記生化学的解析から期待された通り PixD₁₀-PixE₄ の構造となった。また PixD-PixE の相互作用面に位置するアミノ酸に部位特異的変異を導入すると、相互作用が著しく抑制され、この構造の正しさが生化学的に支持された (論文 1)。

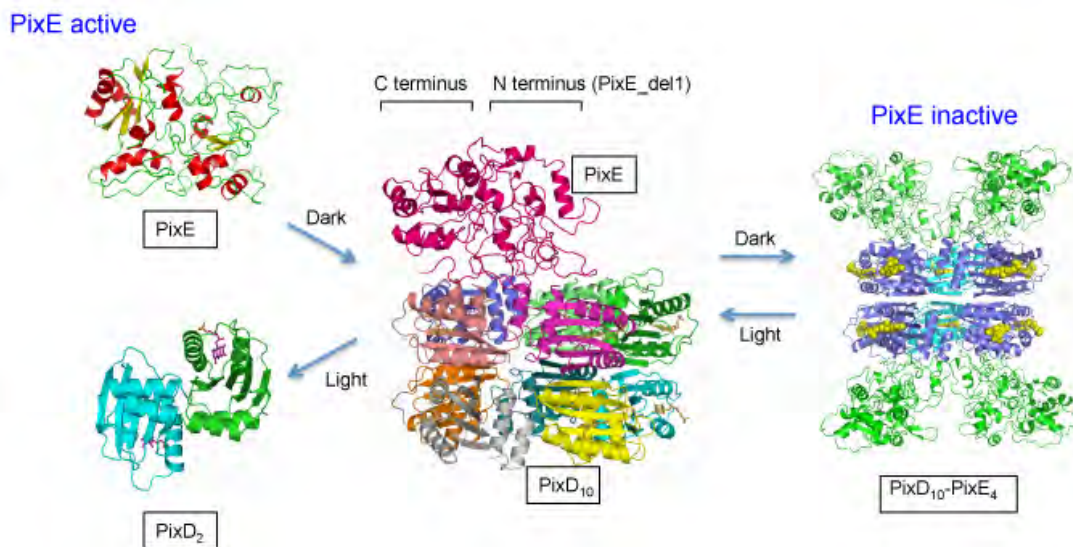


図3: PixD₁₀-PixE₄複合体形成の模式図

研究テーマB「光依存的転写因子制御系の構築」

PixDと相互作用するために必要なPixEの領域を、酵母ツーハイブリッド法を利用して調べたところ、PixEのN末端 1-276 アミノ酸がPixDとの相互作用に必要とわかった。この領域 (PixE_N) を任意の転写因子に融合させれば、光依存的にPixDと複合体を形成するようになり、その活性を調節できるのではないかと考えた (図4 A)。この方法をPICCORO (PixD complex-dependent control) と名付け、その系の構築を進めた。

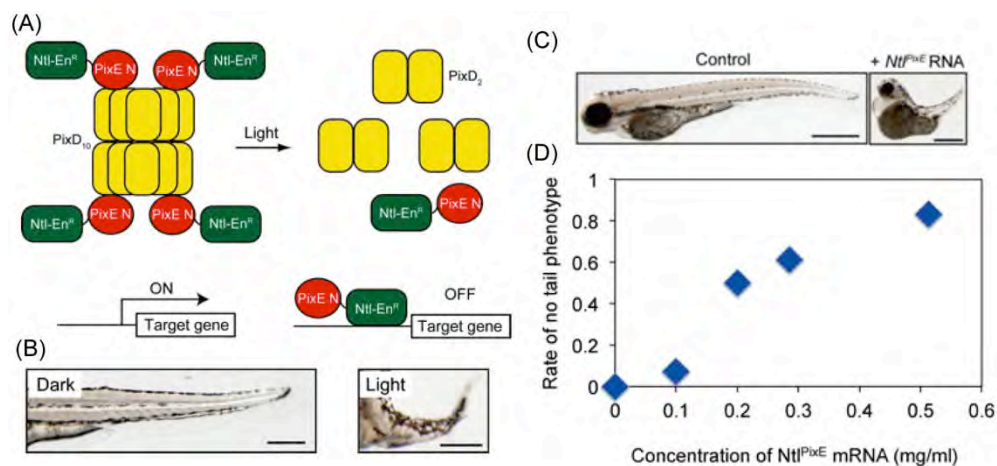


図4: 光依存的転写因子調節系 PICCORO

(A) PICCORO法の模式図。(B) PICCOROを用いて転写因子Ntl-En^Rの機能を光で制御するとゼブラフィッシュの尻尾の形成を光で制御できる。(C) Ntl^{PixE}のmRNAを胚発生期に打ち込んだゼブラフィッシュ。(D) 尻尾の形成不全率は、打ち込むNtl^{PixE}のmRNA濃度依存的である。

本研究ではゼブラフィッシュの尻尾の形成に必要な転写因子No Tail (Ntl)を利用した。ドミナントネガティブ型Ntl(Ntl-En^R)のN末端にPixE_Nを融合させたキメラ遺伝子 (*Ntl^{PixE}*) を作製し、そのmRNAをゼブラフィッシュ胚に導入したところ、尻尾の形成が阻害された(図4C)。現れた表

現型の出現率は、打ち込んだNtl^{PixE}のmRNA濃度依存的であったことから(図4D)、PixE_Nを融合してもNtl-En^Rの機能は影響を受けないことがわかった。

次にPixDを恒常的に発現する組換えゼブラフィッシュを作製し、上記組換えNtl転写因子(Ntl^{PixE})のmRNAをその胚に導入したところ、光照射下で成育させた時のみ、尻尾の形成不全が観察された(図4B)。

以上のことから、PICCORO 法を用いれば、ゼブラフィッシュの転写因子の活性を光で制御できることがわかった。

3. 今後の展開

遺伝子発現を制御する技術は、生物学の研究に必須である。現在用いられている方法の多くは、薬剤添加や熱ストレスに依存しており、誘導処理による二次的影響を排除することが困難であった。一方、光に依存した遺伝子発現系は、1)光の ON/OFF でスイッチングが可能、2)時空間分解能が高い、3)二次的影響が少ない、等の利点を有し、近年その開発が急速に進んでいる。しかし、これまでに開発された光誘導系は、ターゲットとなる遺伝子を特定のプロモータ下流に組込むため、誘導後遺伝子発現を伴う複雑な系である上、適用できる遺伝子の種類が限られる。本研究において、転写因子のDNA結合を光で直接制御する方法(PICCORO)を開発した。この方法は、遺伝子欠損で致死となる転写因子の解析を可能とし、これまで解析が困難であった個体発生の各ステップで働く転写因子の解析に、特に役立つと考えられる。

4. 自己評価

本研究は、(1)光受容体蛋白質の光シグナル伝達機構を解明する基礎的研究、(2)光依存的遺伝子発現制御系を構築する応用研究、からなる。(1)については、蛋白質分子間を移動する光シグナルの伝達経路を具体的に明らかにし、生物がどのように光のシグナルを認識、変換、伝達し、最終的に様々な細胞機能を制御しているのか、といった生物学的重要課題に対する理解を深めることができた。(2)に関しては、未だだれも達成し得なかった生物個体の発生を光で制御することに成功した。「さきがけ」というプラットフォームを利用し、ゼブラフィッシュの遺伝学等これまで経験の無い様々な研究手法を取り入れることができた。結果的に研究の幅が広がり、「発生生物学の光遺伝学」という新しい研究分野を世界に先駆け発信できる成果を得るに至った。

5. 研究総括の見解

いくつかの蛋白質の機能を組み合わせ、任意の酵素活性と遺伝子発現を自在に制御する技術の確立を目指した。これらの成果の集大成として、PICCORO と名付けた光依存的転写因子制御法を開発し、具体的応用例として、ゼブラフィッシュの尻尾を形成する転写因子に適用して光の照射により尻尾の形成不全が起こることを示すことに成功した。この手法は、個体発生のどの段階にも応用可能で、転写因子の活性を光で制御することが可能となった。この成果は、個体発

生においてどの段階で何がどう働いて発生が制御されているかという発生学における最も基本的な課題の解明に寄与できる手法を開発できたことを意味し、新しい研究フィールドを開拓したものと評価できる。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Ren, S., Sato, R., Hasegawa, K., Ohta, H. and Masuda, S. (2013) A predicted structure for the PixD-PixE complex determined by homology modeling, docking simulations, and a mutagenesis study. *Biochemistry* 52: 1272–1279.
2. Ren, S., Sawada, M., Hasegawa, K., Hayakawa, Y., Ohta, H. and Masuda, S. (2012) A PixD-PapB chimeric protein reveals the function of the BLUF domain C-terminal α -helices for light signal transduction. *Plant Cell Physiol.* 53: 1638–1647.
3. Unno, M., Tsukiji, Y., Kubota, K. and Masuda, S. (2012) N-terminal truncation does not affect the location of a conserved tryptophan in the BLUF domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Phys. Chem. B* 116: 8974–8980.
4. Kanazawa, T., Ren, S., Maekawa, M., Hasegawa, K., Arisaka, F., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Ohta, H., and Masuda, S. (2010) Biochemical and physiological characterization of a BLUF protein-EAL protein complex involved in blue light-dependent degradation of cyclic diguanylate in the purple bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Biochemistry* 49, 10647–10655.
5. Unno, M., Kikuchi, S. and Masuda, S. (2010) Structural refinement of a key tryptophan residue in the BLUF photoreceptor AppA by ultraviolet resonance Raman spectroscopy. *Biophys. J.* 98: 1949–1956.

(2) 特許出願

研究期間累積件数：1件

1.

発 明 者： 増田真二、田中幹子、中谷友紀、堀田淑坤
 発明の名称： 転写因子の機能制御方法
 出 願 人： 東京工業大学
 出 願 日： 2012/5/23
 出 願 番 号： 特願 2012-117619

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

[国際会議の招待講演]

1. Masuda, S. “How do organisms sense light?” Asia Forum for Biological Science and Technology 2012. January 2012, Yokohama, Japan.
2. Masuda, S. “Molecular mechanisms of blue-light dependent cell signaling by BLUF proteins” The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, December 2010, Hawaii, USA

3. Masuda, S. “Blue light dependent cell signaling through protein-to-protein interaction by BLUF proteins” Memorial Symposium for the 25th International Prize for Biology. December 2009, Kyoto, Japan.

[国内会議の招待講演]

1. 増田真二、“光受容体を用いた転写制御法の開発”日本化学会第93春季年会、滋賀、2013年3月
2. 増田真二、“What we should we learn from BLUF proteins? Light perception and signal transduction”日本生物物理学会第49回年会、姫路、2011年9月
3. 増田真二、“Blue-light dependent cell signaling through protein-to-protein interaction”日本生物物理学会第47回年会、徳島、2009年10月

[受賞]

平成23年度東工大挑戦的研究奨励賞

[解説/総説]

1. Masuda, S. (2013) Light detection and signal transduction in the BLUF photoreceptors. *Plant Cell Physiol.* 54: 171–179.
2. 増田真二 (2011) 光合成細菌の光に依存したバイオフィルム形成機構 バイオサイエンスとインダストリー 69: 213–214.

[情報発信]

1. 平成22年11月
「細菌が光を感知する仕組みの一端が明らかに」
<http://www.hyoka.koho.titech.ac.jp/eprd/recently/research/research.php?id=75>
2. 平成23年3月
「Bacterial biofilms: Into the blue」
http://www.titech.ac.jp/bulletin/archives_category/topics/topics_211.html

研究報告書

「高強度レーザーによる超多価イオン生成と新規化学反応の開拓」

研究タイプ：通常型

研究期間：平成21年10月～平成25年3月

研究者：ハッ橋 知幸

1. 研究のねらい

ラジカル、そしてカチオンやアニオンなどのイオンは化学反応における重要な中間体および活性種である。また、分子から電子を2つ取り去って生じるジカチオンは、1930年代から質量分析によりその存在が確認されているが、さらに電子を取り去って生じる3価、4価イオンのような多価分子イオンは電子衝撃やシンクロトロン放射光を用いてもごくわずかしかなら生成せず、これまで化学の世界に登場することは殆ど無かった。しかし、多価分子イオンは強い求電子性、大きな内部エネルギー、スピン多重度の異なる近接した多様な電子状態、価数依存反応などの点で魅力的な新奇中間体である。多価イオンは星間や惑星大気中に存在し、ナノ領域での表面改質剤、極端紫外光光源、X線レーザー媒質として有望であり、重粒子線がん治療、挿入反応、衝突電荷移行反応としての利用が期待できる新奇活性種である。近年、我々および英、米、加のグループは近赤外高強度フェムト秒レーザーを用いることで多価分子イオンを効率よく生成できることを見出した。さらに多価原子イオンとの衝突による多価分子イオン生成が仏、印から報告され始めた。しかしながら、いずれも化学反応の視点からの研究例は少なく、対象も芳香族炭化水素のような大型のごく限られた分子だけである。一方で構造自由度の多さ、スピン多重度の複雑さが理由で理論的な研究報告も数少ない。本研究では様々な生成戦略のもと、従来より遙かに効率よく、多様な多価分子イオンを作り出し、理論計算を含む物性研究をすすめ、さらに特有の化学反応を明らかにすることを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

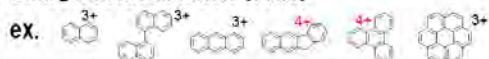
本研究では高強度レーザーを用い、様々な多価分子イオン生成戦略の元に（A）従来より遙かに効率よく、多様な多価分子イオンを作り出し、（B）多価分子イオン特有の反応を明らかにすることが出来た。これまで最小の4価分子イオンは24個の原子で構成されたものであった。しかし、重原子置換・多重結合による方法を用いることで、誰も夢見しなかった“4原子からなる世界最小の4価分子イオン”を作り出した。この大幅なダウンサイジングにより多価分子イオンの詳細な理論的研究が可能になり、多価分子イオンの安定性の原因を突き止めることが出来た。さらに従来のイオン化法に比べて劇的な収量の増大を達成し、多価分子イオンの物性や反応の研究が可能なレベルまで到達した。多価分子イオンの価数依存反応の発見、クーロン爆発におけるイオン放出制御の達成、そしてクーロン爆発を利用した位置および構造異性体区別に成功した。

(2) 詳細

研究テーマA 「多価分子イオン生成戦略」

多価状態は正電荷同士の強い反発により瞬時に分解する(クーロン爆発と呼ばれる)。これまでに電子衝撃イオン化で見いだされた最小の3価、および4価の有機化合物の分子イオンはそれぞれ9つの原子(フラン)、そして24の原子(アントラセン)から構成されるが、1価分子イオンに対する生成比率は極めて小さい。例えば電子衝撃イオン化によるアントラセンの4価イオンの生成量は1価のものに対して $5 \times 10^{-6}\%$ である。いずれの分子においても正電荷が非局在化するため多価分子イオンが安定であると説明されている。本研究では以下に述べる5つの生成戦略を元に、様々な分子のイオン化を試み(図1)、多様な多価イオンの生成、劇的な生成量比の増大を達成するとともに、原子たった4個で構成される世界最小の4価分子イオンを見出し、その安定性の理由を明らかにした。

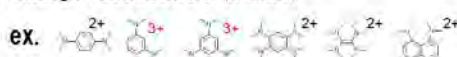
1. Charge delocalization (PAH)



2. Heavy atom substitution, multiple bonds



3. Charge localization (Amine)



4. Organometallics



5. Combinations

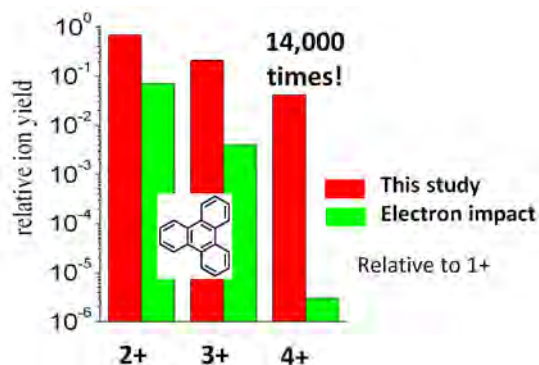
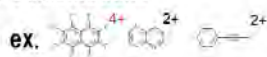


図2 トリフェニレンの生成収量比比較

図1 提案した多価分子イオン生成戦略と得られた多価分子イオンの例

1) 電荷非局在化、長波長レーザーイオン化による多価分子イオン生成 分子の選択としては従来の電荷非局在化の戦略を踏襲したものである。但し、生成したカチオンの光分解を避けるためイオン化波長に留意し、4価分子イオンを生成することに成功した。分子サイズは大きい、トリフェニレンの1価に対する4価イオンの生成収量比を比較すると、電子衝撃イオン化法に比べて14000倍と劇的な増加を達成した(図2)。本手法により多価分子イオンの物性や化学反応の研究が可能なレベルの収量に初めて到達した。

2) 重原子置換、多重結合利用による多価分子イオン生成 有機化合物の多価分子イオンの解離で最も起こりやすいのはプロトンの放出である。水素原子に正電荷が局在化し、さらに隣接した原子が正に荷電すると瞬時に結合が解離する。そこで、水素を非共有電子対を有する重原子に置換し、さらに単結合を多重結合にすることにより解離を抑制することに成功した。ジヨードアセチレン(4つの原子で構成)では4価の分子イオンまでの生成に成功した。これは世界最小の4価分子イオンである。三重結合を2つ有

するジヨードジアセチレン（6つの原子で構成）では4価分子イオンの生成量は1価に対して19%と極めて大きいものになった。密度汎関数法により得られた電荷分布および分子軌道を比較し、ヨウ素原子に局在化した電荷および電子が放出される軌道の分布の違いが分子イオンの安定性の原因であることを明らかにした。

3) 電荷局在化による多価分子イオン生成 1) とは真逆に正電荷をアミノ基に局在化させることで正電荷同士の距離を離し、クーロン反発を抑えることを狙った。ジメチルアミノ基の3置換体(1,3,5位)では3価まで生じ、その収量も1価に比べて75%と非常に多かったが、4置換体(1,2,4,5位)では2価までしか生じなかった。一方、置換様式をメタ位にすることで芳香環が1つ、2置換体であっても3価イオン(1価に比べ5%)を創り出すことが出来た。限界構造式では安定性が説明できないことから、電荷分布の違い、構造変化による安定性の違いが価数や置換様式によって異なるためであると考えられた。

4) 有機金属による多価分子イオン生成[3] メタロセンの中心金属の価数変化を利用することで解離を抑制することを狙ったが、ニッケロセンで3価イオンが見られたのみで他は全て2価イオンまでであった。しかし、金属イオンに着目するとオスミウムでは8価までのイオンが得られ、金属多価イオンの生成法としては有望であると言える。オスミウム8価の生成に必要なエネルギー(427 eV)は、用いた波長0.8 μ mの光子276個分に相当する。多価金属イオンの生成は多光子イオン化過程ではなく、強光子場によるトンネルイオン化であり、多価金属イオンの生成はイオン化ポテンシャルのみならず電子の属する軌道に大きく依存した。

5) 複合戦略による多価分子イオン生成 上に述べた生成戦略を組み合わせ、オクタフルオロナフタレンで4価イオンを生成することに成功した。これは芳香族化合物の中では世界最小の4価イオンである(18原子)。この戦略の元でさらに環を拡大することで、収量の増大と有機化合物初の5価イオンの生成の可能性も見えてきた。

研究テーマB 「多価分子イオンの反応」

1) 多価分子イオンの価数依存反応の発見[1] 多価分子イオンの単分子反応について明確な価数依存性があることを見出した。図3には分子イオンと分子イオンから水素が脱離した一連のイオンの収量を価数別に比較した。C-H結合(sp^3)がある場合は解離パターンが明確に異なる。4価イオンからのクーロン爆発によりプロトンが脱離し、価数を減ずる過程の寄与が大きいと結論した。

2) 多価分子イオンからの原子イオン放出制御に成功[2] 有機分子では4価イオンまでの観測に成功したが、さらに高次の分子多価分子イオンからはクーロン反発(クーロン爆発)により原子イオンが放出される。例えばアセチレンのクーロン爆発により生じた水素および炭素イオンはレーザーの偏光方向と平行方向に放出されるのに対して、アセチレンの水素をヨウ素で置き換えたジヨードアセチレンの炭素は直交方向に放出された。ジヨードアセチレンの特異的な炭素の放出は、分子骨格が多価分子イオンの状態でも保持されること、そして多価に荷電したヨウ素間において炭素骨格が変形するためであると結論した。

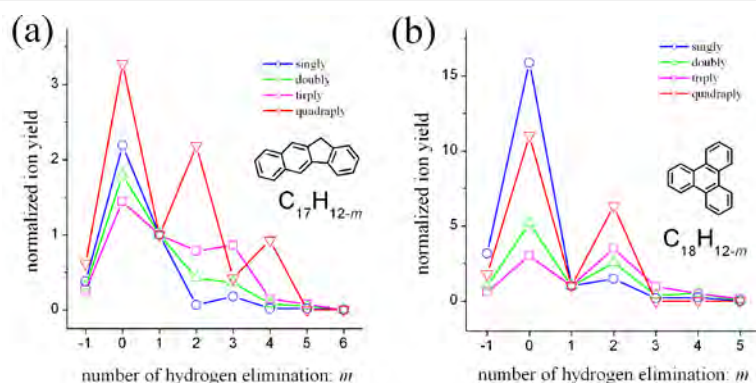


図3 1～4価分子イオンの水素脱離傾向

3) 多価分子イオンからの原子イオンの放出により構造異性体の区別に成功[5] 電子衝撃イオン化法で測定した位置および構造異性体である1, 1-, 1, 2-*cis*-, 1, 2-*trans*-ジクロロエチレンの質量スペクトルは全く同一であり、スペクトルから3つの異性体を区別することは不可能である。しかし、2) で得た重原子置換によるイオンの放出制御を元に、クーロン爆発を利用した構造異性体の区別に成功した。塩素イオン、炭素イオン、そしてプロトンのレーザー偏光面に対する放出角度分布は*cis*および*trans*体で明らかな違いが見られた(図4)。気相中における分子の配向はランダムであるが、トンネルイオン化の確率はHOMOの分布と対称性に依存する。そのため配列選択的にイオン化され、構造異性体によって分子内のクーロン反発が異なるためにイオンの放出方向に明確な違いが現れたと結論した。質量分析では構造異性体の区別は不可能であるとされてきたが、本手法を用いれば構造異性体が区別できることを示すことが出来た。

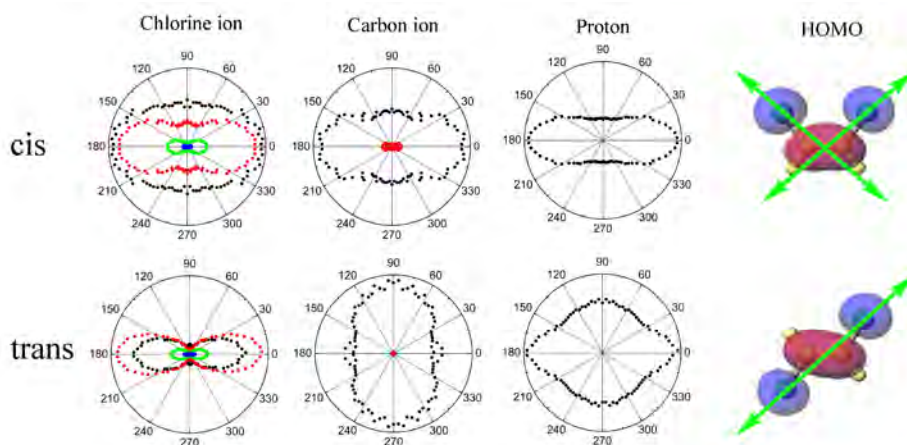


図4 原子イオンのレーザー偏光面に対する放出角度分布とHOMO

3. 今後の展開

従来法ではごくわずかししか生成しないことなどが理由で、これまでほとんど多価分子イオンの研究例はなかったが、本研究で提案した手法により物性や化学反応の研究が可能なレベルの収量に初めて到達した。長波長光でイオン化するなどの工夫によりさらに収量の増加が期待出来る。さらに複合戦略による多価分子イオン生成法を発展させることで、有

機化合物初の5価イオン生成の可能性も見えてきた。また解離過程を含めた“世界最小の多価分子イオン”のより詳細な理論計算をすすめることは、極端な電子不足という多価分子イオンの性質、言い換えると化学結合の起源に関する基礎的な議論を改めて提起することになる。しかし、ラジカルやイオンなどの“汎用活性種”に比べて多価分子イオンは認知度が圧倒的に低い。これまで化学の世界に殆ど登場することの無かった多価イオンの舞台は本研究で用意できた。また、本手法を用いれば容易に高価数の原子イオンを高効率に生成できる。5価イオンの生成、価数を選別した上での分子内および分子間反応、固体表面に衝突・融合させることにより有機化学的手法では作り出せない物質を創成するなど、“光(高強度レーザー)でしか創り出すことのできない”多価分子イオンの強い求電子性、大きな内部エネルギー、複数のスピン多重度など、汎用活性種”にはない特性を活かした新規化学反応の研究へと展開する。

4. 自己評価

本研究は気相、液相、固相における高強度レーザーによる新規化学反応の開拓という目的で研究を開始した。しかし、当初の想定にはなかった、収量が極めて多い、世界最小の4価分子イオンの発見により研究の方向は気相のものに傾斜した。結果として従来の電荷の非局在化による多価分子イオンの安定化とは真逆の、電荷の局在化による多価分子イオンの安定化という概念を分子軌道法の結果を元に提唱することが出来た。多価分子イオンの反応については価数依存反応、クーロン爆発におけるイオン放出制御、そしてクーロン爆発を利用した位置および構造異性体区別という成果を挙げた。今後ラジカルやカチオンに続く分野に発展させるべく、多価分子イオンの特性を活かした新規化学反応を示すことに努めたい。液相系については単一溶媒ではなく、有機/水の2相を形成し、水相にレーザーを照射することで効率よく10 nm以下の炭素ナノ粒子を生成する方法を見出した[4]。炭素粒子は凝集しやすく、分散した10 nm以下の炭素ナノ粒子生成の報告は極めてまれである。さらに、この手法以外に炭素ナノ粒子の親水性・疎水性、そして組成を簡単に制御出来る既存の方法がないため、ナノ粒子の合成法として極めて有望である。

5. 研究総括の見解

ハッ橋研究者は、価数の大きな超多価分子イオンを生成する試みを、照射レーザーの波長や、超多価イオン生成に有利と思われる分子の選択などを検討しながら行った。その結果、4原子分子の4価の多価イオンが安定して存在することを見だし、その安定性を理論的に説明する事にも成功した。その他にも、種々の多価イオンの生成に成功したが、当初の目的であった多価イオンによる新規化学反応の開拓については、これからと言うところで研究期間の終了を迎えた。多価イオンの気相、液相、固相における化学反応を研究する準備が整いつつある段階であり、研究を継続し、当初の目標を達成していただきたい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表 7件

1. Yatsushashi, T.; * Nakashima, N., “Formation and Fragmentation of Quadruply

Charged Molecular Ions by Intense Femtosecond Laser Pulses,” J. Phys. Chem. A 2010, 114(28), 7445–7452.
2. <u>Yatsuhashi, T.</u> ;* Mitsubayashi, N.; Itsukashi, M.; Kozaki, M.; Okada, K.; Nakashima, N., “Persistence of Iodines and Deformation of Molecular Structure in Highly Charged Diiodoacetylene: Anisotropic Carbon Ion Emission,” ChemPhysChem. 2011, 12(1), 122–126.
3. <u>Yatsuhashi, T.</u> ;* Murakami, E.; Nakashima, N., “Fe ^{z+} (z = 1 – 6) Generation from Ferrocene,” Phys. Chem. Chem. Phys. 2011, 13(10), 4234–4238.
4. <u>Yatsuhashi, T.</u> ;* Uhida, N.; Nishikawa, K. “Novel Method of Producing Carbon Nanoparticles on Benzene/Water Interface with Femtosecond Laser Plasma Filament,” Chem. Lett. 2012, 41(7), 722–724.
5. <u>Yatsuhashi, T.</u> ;* Nakashima, N.; Azuma, J., “Coulomb Explosion of Dichloroethene Geometric Isomers at 1 PWcm ⁻² ,” J. Phys. Chem. A 2013, 117(7), 1393–1399.

(2) 特許出願

該当なし。

(3) その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

【受賞】

1. The APA Prize for Young Scientists 2010, “Chemical Reactions of Highly Charged Molecules “ Nov. 2010. （アジアオセアニア光化学協会）

【著書】

1. 中島信昭、ハッ橋知幸 著、化学の要点シリーズ 4 レーザーと化学、共立出版、2012 年

【招待講演（国外、国内）】 9 件（国外 4 件、国内 5 件 うち国外での受賞講演 1 件）

1. ハッ橋知幸、「高強度レーザーによる有機分子のイオン化と制御」、第 56 回イオン反応研究会、2009 年 10 月（大阪）
2. 受賞講演 T. Yatsuhashi, N. Nakashima, “Formation and Fragmentation of Highly Charged Molecular Ion by Intense Femtosecond Laser Pulses,” 6th Asian Photochemistry Conferene 2010, Nov. 2011 (Wellington New Zealand)
3. T. Yatsuhashi, “Strategy to Create Highly Charged Molecular Ions,” The 15th Osaka City University International Conference on Spin Chemistry and Dynamic Molecular Science & Research Meeting of Dynamic Molecular Devices, Jan. 2011 (Osaka Japan)
4. T. Yatsuhashi, “Multiply Charged Ions and their Reactions Investigated by Nonresonant Intense Femtosecond Laser Pulses,” 15th East Asian Workshop on Chemical Dynamics, May 2011 (Pohang Korea)
5. T. Yatsuhashi, “Generation and Fragmentation of Multiply Charged Molecular Ion

Investigated by Nonresonant Intense Femtosecond Laser Pulses,” The 2nd Asian & Oceanic Mass Spectrometry Conference, Aug. 2011 (Busan Korea)