

「細胞トラッキングのための生体適合性レーザー発振子の開発」

研究期間：2020年11月～2023年3月

研究者：山岸 洋

加速フェーズ期間：2023年4月～2024年3月

1. 研究のねらい

蛍光標識は細胞内部の情報を取得する強力な手法として広く普及している。しかし、そこで用いられる有機色素の発光(蛍光・りん光)の線幅は数十から数百 nm と広いため、同時に使用できる色素はせいぜい 2-3 種類程度であった。また、生体組織の発光がバックグラウンドノイズとなり、シグナルの観測が妨げられるという問題があった。これらの問題を克服するための全く新しい戦略として、光共振およびレーザー発光を利用したラベリング技術が注目を集めている。共振した光、およびレーザー光は極めて鋭いスペクトル幅(1 nm ほど)を持つことから、低分子色素が抱えていた問題を根本的に解決しうる。共振器・レーザー光源のサイズは当初数十 cm ほどであったが、原理的には数 μm ほどまで微小化が可能であり、実際にいくつかの材料系でほぼ限界に近い微細化が実現されている。これらの素子は細胞内部に導入可能であり、外部光源を利用して励起することにより鋭いピークを持つ光を発生できることが示されている。これらの微小化した光素子を利用することで、細胞の光タグ化や高精度な光センサーが実現できると期待されている。

一方で、こういった既存の微小共振器・レーザー発振子は生体適合性の低さという共通する問題点を抱えている。光特性に注目して材料開発が進められてきた従来のレーザー光学において、生体適合性に着目した発振子素材の探求はほとんど例がなかった。現在はレーザー物理で長らく用いられてきたポリスチレンや金属粒子(InP 合金など)などがそのまま使用されているが、細胞に大きな負荷がかかるため長期に渡る測定は困難であった。一方、本研究者は有機分子の自己組織化を利用した超分子構造体の構築に長らく従事しており、それらの有機超分子構造体の一部が光共振器・レーザー発振子として機能することを見出している。有機分子は一般に生体適合性が高いうえに、様々な構造・物性を戦略的に導入することができる。これらの特性はバイオ光センサーとして応用する上で極めて望ましい。以上の経緯を踏まえ、本研究では生体適合性材料を用いたマイクロ光共振器・レーザー発振子の実現に挑む。また、近赤外発光などを利用した新規光共振器デバイス、狭線を利用した光センサーの開発にも挑む。

加速フェーズでは細胞実験を進めることで、生体親和性光共振器のバイオセンサーとしての応用に注力する。とくに、従来型の蛍光分子プローブが抱える原理的な限界を超えた光センサーの開発を目指す

生物分野における蛍光プローブを用いた計測では、多くの場合で光の強度を測定する。しかし、光強度は外的な要因によって容易に変動してしまうため絶対的な定量計測が難しい。相対的な強度変化であればある程度の定量性を持つが、それでも大きなノイズが含まれる。一方、光の波長は外乱に強く、精度も極めて高い。通常の有機分子の発光は線幅が幅広いために波長の議論が困難であるが、光共振器の鋭いピークであれば波長の微細な変化を利用した測定が可能である。さらに、当研究者が開発している有機光共振器はサイズが小さいうえに(数 μm)高い生体親和性を持つため、様々な生物学的なトピックとの相性がよい。実際、ACT-X の研究内において、生体

高分子レーザー素子に加えて、種々の光センサーの開発に成功している。例えば、希薄な有機ガスや機械的な変形を検知することができる。これらの研究成果を基盤として、加速フェーズでは有機光共振器を利用した「波長変化型光プローブ」の実現に挑戦する。

2. 研究成果

(1) 概要

光共振器とは、その内部に光を閉じ込めることができる数マイクロメートルほどの微小な素子である。光を閉じ込める作用を利用することで、レーザー光を生み出すことができる。また、素子を透過できる光がごく狭い波長に限られることを利用し、光センサーとして利用することもできる。ただし素子の形状を数 nm ほどのスケールで精密に制御する必要があることから、従来は無機材料を微細加工することで素子を作成していた。このため、生体適合性やバイオセンサーとしての利用用途が大きく狭められていた。本研究では、生体適合性に優れた機能性有機化合物を自己組織化的に加工することで、バイオ用途に利用可能な光共振器を開発するとともに、その共振器を利用した光タグ・光センサーの開発を行った。

研究テーマ A では、生体適合性光共振器のベンチマークとして 100%タンパク質でできた素子の構築に挑戦した。乳化プロセスによってシルクの構成素材であるフィブロインタンパク質を微小な球体へと加工し、色素を添加することで素子を作成した。この素子は期待通り光共振器として働き、強励起によってレーザー光を生み出すことができた(*Mater. Chem. Front.* **2021**)。

研究テーマ B では、テーマ A の発展として様々な有機光共振器を利用した光センサーの開発を行った。前述したタンパク質共振器を利用することで、水中の酵素反応を検出する光センサーの開発に成功している(*Chem. Commun.* **2023**)。また、共振器の構造を分子スケールで制御することにより微細な穴を多数もつ光共振器を作成し、極めて希薄な揮発性有機化合物の検出に成功した(*ACS Appl. Polym. Mater.* **2022**)。ほかにも、高分子膨潤を利用した揮発性有機化合物センサーの開発に成功している(*ACS Omega* **2021**)。また、柔軟性有機分子結晶の光共振を利用することで、機械的な曲げを検出することに成功している(*Adv. Opt. Mater.* **2021**)。イオン液体を利用することで、世界初となる 100%液体でできた大気中で稼働するレーザーの作成にも成功している。このレーザーは力学的刺激・化学的刺激を高感度で検出する光センサーとして機能する(*Laser Photon. Rev.* **2023**)。

上記のテーマ A,B における素子を構築するための基礎的なステップとして、多様な方法で有機分子の自己組織化を試みている。この中で、当初の目的から外れた、基礎科学的に興味深い自己組織化挙動をいくつか見出しており、それぞれを独立した研究課題として深堀りしている(研究テーマ C)。たとえば親水・疎水のパターンが施された基板上で有機分子を自己組織化することで、半球状の素子をアレイ化することに成功している(*Polymers* **2022**)。また、高分子が溶液中で液液相分離する最中にリオトロピック液晶層を発現し、その構造が保たれたまま固体化することを見出している。得られた素子はねじれ双極構造に由来する非球対称な円偏光発光を示した(*JACS* **2021**)。一般に、自己組織化によって形成される素子

は、液体中で溶解してしまうことが多い。そこで架橋反応による粒子の不溶化を試みた。新規に合成したステリル基をもつ発光性高分子の球体形状を保ちながら不溶化することに成功した。また、この際に発光色が変化し、光の三原色を生成できることを見出した(*Polym. J.* **2022**)。面不斉分子の自己組織化を基板上で行っている中で、凹面をもつお椀状の結晶が均一に成長していることを見出した。凹多角形の結晶は一般に非平衡条件でのみ得られ、それゆえに形・サイズ・配向を均一に制御することが原理的に不可能だとされていた。本発見はこの常識を覆すものである。成長過程とメカニズムの詳細な検討を行い、凹多角形結晶の均一成長に必要な要素を一般化することに成功した(*Science* **2022**)。

(2) 詳細

研究テーマ A 「天然高分子を利用した有機光共振器の開発」

シルクフィブロイン(SF)は、カイコガによって生成される天然タンパク質である。SF は半結晶性のポリペプチド繊維であり、比較的高い屈折率(~ 1.54)、顕著な機械的特性($70\text{--}78\text{ MJ m}^{-3}$ の靱性および $10\text{--}17\text{ GPa}$ のヤング率)、および生体親和性を特徴としている。本研究では、SF を脱ガム、溶解、およびその後のミニ乳化によって微小な球状粒子へと整形することに成功した(図 1, *Mater. Chem. Front.* **2021**)。得られたマイクロ球体は優れた光閉じ込めを示すとともに、パルスレーザーによる強力な励起によってレーザー発振する。また、SF の吸湿性に由来して周囲の湿度に応じた共振ピークのシフトを示す。その変化の割合は $187\text{ pm} / \%RH$ と高感度であり、その線形性は $95\%RH$ までそのまま維持される。



図 1. シルクマイクロ球体と湿度依存ピークシフトの模式図。

研究テーマ B 「有機光共振器を利用した光センサーの開発」

前述したシルク球体を用いてタンパク質の分解反応速度を分光学的に極めて高精度で測定できることを見出した(*Chem. Commun.* **2023**)。非水溶性生体高分子の分解反応は分子生物学的に極めて重要な現象である一方で、固液界面で起こる反応であるため反応速度を精密に測定することが困難であった。我々は今回、この困難を克服した新たな測定手法の開拓に成功した。タンパク質分解酵素を含む水溶液に作成したシルク球体を浸したところ、シルク球体は表面から徐々に分解され、その直径が減少した。この直径減少量は数十 nm ほどと古典的な重量を測る方法で検出することができないほど微細で、顕微鏡画像でも解析できないほど極めて困難な微小さである。我々はこの球体から発せられる光共振スペクトルを確認したところ、このサイズ減少に対応したピークシフトが有意に観測した。つまり、光共振を利用することで顕微画像からは判別困難なサイズ減少を直接測定できることを示した。

揮発性有機化合物(VOC)と呼ばれる沸点/昇華点の低い有機材料は、新たな室内空気汚染物質として注目を集めている。希薄な VOC を汎用半導体装置で検出することは困難であり、ガスクロマトグラフィーや質量分析などの複雑で大型の装置が必要となっていた。これらを代替する新たなタイプの VOC センサーがいくつか開発されているが、その中でも発光(アクティブ)光微小共振器はリモートセンシングの観点から特に有望である。ただし、報告されている発光共振器センサーは、数から数百 ppm レベルを超えるかなり高い濃度の VOC 蒸気にのみにしか適用できなかった。本研究では、ナノポーラス材料と共振器光学系を組み合わせ、1ppm 以下の希薄な VOC を検出できる新たなポーラス発光マイクロ共振器の開発に成功した(図 2, *ACS Appl. Polym. Mater.* **2022**)。共振器媒体として多孔性のポリマー(PIM-1)を使用し、高い多孔性と低い光散乱を両立したことが鍵となっている。

ppb-Level VOC Sensing with a Nanoporous Luminescent Resonator

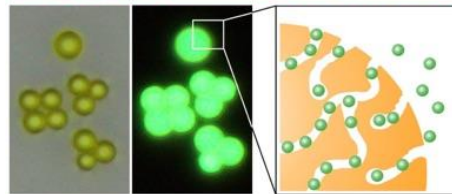


図 2. ポーラス発光マイクロ共振器の顕微鏡画像と、VOC 吸着の概略図。

微細孔を利用する以外の VOC 検知光センサーとして、高分子の膨潤を利用したセンサーの開発に成功している。本研究では、ポリスチレン(PS)を用いて WGM 共振器を作成し、その共振器内部へと VOC が浸透していく挙動を光共振ピークのシフトとして観測した。ベンゼン、トルエン、キシレンといった BTX と呼ばれる材料がよく吸着し、高感度に検出することができた(*ACS Omega* **2021**)。

光共振器として機能する曲げられる有機結晶の開発に成功している。蛍光性のシアノ置換オリゴフェニレン-ビニレン(COPV)をゆっくりと結晶化することで合成した棒状の微小結晶粒子 FOC^{COPV} は、縦方向に沿って光を閉じ込める従来の FOC 導波路とは対照的に、横方向に沿って光を閉じ込める。FOC^{COPV} を機械的に曲げた所、ポアソン効果による幾何学的収縮により共振周波数が約 4nm の波長範囲で青方偏移した。この原理により、機械的な曲げを光検出することができる(*Adv. Opt. Mater.* **2021**)。

大気中で安定して動く 100%液体でできたレーザー光源の開発に成功した。不揮発性のイオン液体のうち、比較的界面張力が大きなイミダゾール塩を選び、フッ素化した微粒子を塗布した基板上へ滴下した。滴下する際の水滴の落下速度を抑え、かつ液滴を十分に小さくした状態で滴下すると、接触角が大きくなり、真球に近い形状の液滴を生成することができた。この液滴は、最も優れた有機マイクロ球体固体レーザーと同等のしきい値でレーザー発振できる。液滴は極めて弱い力、例えばごく微量な空気の流れや水分の吸着によって変形し、それに伴ってレーザー発振波長が変化する。この特性を利用して高感度な光センサーとして利用することができた(*Laser Photon. Rev.* **2023**)。

(加速フェーズ)これまでの成果を発展させ、細胞の内部で加水分解反応を追跡することを目指す。具体的には、生体親和光共振器を細胞内部に導入し、経時的にその発光スペクトルを観測する。酵素反応の進展とともに発光ピークがシフトする現象を利用することで、細胞の中で物質が分解されていく速度を高精度に測定できるはずである。現在、光共振器を細胞へ取り込ませることに成功している。今後、細胞内部の光共振器の発光を経時的に観

測することで、目的を達成する予定である。

研究テーマ C 「自己組織化を利用した有機微小素子の構築」

キラルな側鎖を持つ発光性の π 共役ポリマーを用いて、角度異方的に円偏光発光 (CPL) を放射する微細な球状素子の作成に成功した (図 3, *JACS* 2021)。一般に、等方的な球状の分子集合体の内部では、分子もまた等方的に凝集する。一方、今回作製したマイクロ球体内部には上下に 2 つの欠陥が極点として存在し、極点を結ぶ極軸に対し垂直な方向へポリマー主鎖がらせん配向した構造が形成されている。この特異な配向構造はねじれ双極構造と呼ばれ、液晶液滴が示すトポロジ

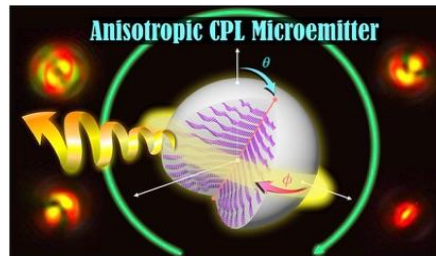


図 3. ねじれ双極マイクロ球体からの異方的な円偏光発光発生 の 模 式 図。

カル欠陥構造の一つである。さらに球体 1 粒子が示す CPL の角度異方性を調査した結果、双極軸方向に放射される CPL の非対称因子が 0.2 程度であるのに対し、らせん分子配向軸に平行な赤道面方向へは 0.5 に至る巨大な非対称因子が観測された。本研究は、理論的に長らく予測されてきた CPL の分子配向方向に対する角度依存性を実験的に観測した初めての系である。

結晶粒子の形状は溶解速度や分散性など多様な物性に影響をもたらす。このため、結晶工学の分野では結晶粒子の外形を制御する技術が盛んに研究されている。これらの研究では、おもに溶解平衡に近い条件で緩やかに結晶を成長させるプロセスが利用されてきた。平衡条件を制御することで形・サイズ・配向を均一に制御することができる。このような成長プロセスで得られる結晶は、多くの場合、凸多面体の形状である。一方で、平衡から大きくはずれた急速な成長プロセスを経た場合、結晶は凹んだ面で囲まれた凹多面体形状 (お椀型) の「骸晶 (がいしょう)」を形成する。骸晶は、従来の緩やかな成長プロセスでは表出し得ない結晶面や複雑な形状をもつため、結晶に潜在する新たな機能の発掘が期待できる。しかしながら、骸晶の構築には非平衡な条件が必要であり、結晶粒子の形状やサイズ、配向の均一な制御は原理的に困難であった。本研究では、面キラリティをもつ共役分子を基板表面で自己組織化させることにより、同一形状、均一サイズ、かつ一軸配向したお椀型多面体マイクロ単結晶 (骸晶) の作製に成功した (*Science* 2022)。このお椀型マイクロ結晶は基板表面にわずか 10 秒程度で一斉に成長する。その成長メカニズムについて詳細に解析を行い、分子戦略の一般化に成功した。

3. 今後の展開

本研究では、有機物を利用した光共振器の作成と、得られた光共振器を利用したバイオ応用を目指してきた。研究開始当初は光タグと光センサーという 2 つの機能に着目していたが、研究をすすめる中で特に光センサーとしての機能が極めて有望であることが明らかとなってきた。前述した研究成果から分かる通り、多様な機能をもつ有機分子材料を利用した光共振器センサーの開発に成功している。そこで今後数年ほどの展望として、これらの光共振

器センサーのさらなるバイオ応用に注力していく予定である。

4. 自己評価

当初の研究目標(本研究では生体適合性材料を用いたマイクロ光共振器・レーザー発振子の実現に挑む。また、近赤外発光などを利用した新規光共振器デバイス、狭線を利用した光センサーの開発にも挑む。)は十分に達成できたと考えている。本研究では基礎的なステップとして、生体適合性の有機光共振器素子・レーザー発振子の構築を目指していた。この目標は十分に達成されている(*Mater. Chem. Front.* **2022**)。次の応用的なステップとして、水中でのデバイス利用を目指していた。この成果はつい最近発表できた(*Chem. Commun.* **2023**)。さらにバイオ応用を目指し、細胞トラッキングと光センサーの開発を目指していた。細胞トラッキングの実現には至らなかったものの、光センサーとしての応用が当初の期待以上に進んでおり、全体として十分に目標を達成できた(*Adv. Opt. Mater.* **2021**, *ACS Omega* **2021**, *ACS Appl. Polym. Mater.* **2022**, *Laser Photon. Rev.* **2023**)。加えて、研究の途中で想定外の基礎科学的な成果をあげている(*JACS* **2021**, *Science* **2022**)。以上のことから、研究目的は十分に達成され、さらに当初の期待以上の成果をあげているといえる。

研究の進め方は概ね当初の予定通りで推移した。1,2 年度に基本となる素子の構築方法、測定方法を確立し、論文発表まで至っている。研究費の多くを充てた光学測定系(倒立顕微鏡)も完成し、水中での測定に成功している。また、この途上で当初の想定とは外れた基礎科学的に極めて興味深い現象も見出しており、この点では当初の想像以上の形で推移した。

本研究により、科学技術および社会・経済の進歩、とくに新たなバイオセンサーの開発に貢献する普遍的な技術基盤を提供することができた。本プロジェクトを通して発表した一連の論文により、生体適合性有機光共振器という新たな光デバイスの設計・合成方法とその応用例を広く世界に発表することができた。この分子戦略の一般性は極めて高く、今後、分子生物学以外にも多様な分野における光センシングに広く寄与できると考えている。

本研究は、領域内の多くの参加者・研究者から大いに触発を受けている。研究を開始した当初、生体適合性光センサーの構築と測定についてはおおよその目処が立っていた。一方、そこで開発した光センサーの利用用途については様々な可能性を検討中であり、とくにバイオ用途への応用は大部分が不確定であった。そのような状況の中、領域内でのネットワークを通じて分子細胞生物学における様々な興味、課題にふれあい、バイオ応用についてのヒントを得ることができた。有機化学や光物理学の分野では決して得られない知見であり、有機光共振器を利用した独自の研究を展開する上で大変貴重な機会であった。

加速フェーズでは、これまで作成してきた素子を細胞の中に導入し、その中で実際に機能するのかどうか、を検証できるステージに進むことができた。これまでの研究は、主に有機化学的な環境で進めてきたものであり、実際に分子生物学的な環境で素子が利用できるのかは不明瞭であった。加速フェーズでは、領域内の分子生物学の研究者と協力することで、実際に細胞実験を進める環境を構築することができ、それによって細胞内部での光測定にまでたどり着くことができた。ACT-X に採択されたことで実現できた研究成果であり、頂いた機会を十分に活用し、新しい領域を切り開けたと自負している。



5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 18件

1. Oki, O.; **Yamagishi, H.***; Morisaki, Y.; Inoue, R.; Ogawa, K.; Miki, N.; Norikane, Y.; Sato, H.; Yamamoto, Y., Synchronous assembly of chiral skeletal single-crystalline microvessels. *Science* **2022**, 377(6606), 673–678.

結晶粒子の形状を制御するプロセスは、そのほとんどが擬平衡条件を利用したものであり、得られる結晶は多くの場合凸多面体形状の外形をもつ。一方で、急速な成長プロセスを経た場合、結晶は凹多面体形状の「骸晶(がいしょう)」を形成する。骸晶は、従来の成長プロセスでは表出し得ない結晶面や複雑な形状をもち、結晶材料に潜在する新たな機能の発掘が期待できる。しかし、非平衡条件で形成される骸晶の形状・サイズ・配向の均一な制御は原理的に困難であった。本研究では、これらの困難を克服する新たな手法を見出した。

2. Tanji, N.; **Yamagishi, H.***; Fujita, K.; Yamamoto, Y., Nanoporous Fluorescent Microresonators for Non-wired Sensing of Volatile Organic Compounds down to the ppb Level. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2022**, 4(2), 1065–1070.

大気中に漂う揮発性有機化合物(VOC)はごく僅かな濃度(1 ppm 以下)であっても健康被害をもたらすことが知られており、高精度な VOC 濃度センサーの開発が進められている。共振器表面での分子の物理吸着によるピークシフトを利用する光共振器センサーはその候補の一つである。ただし物理吸着の量は極めて少量であり、ピークシフトの大きさが極めて小さいことが問題となっていた。本研究では、多数の微細な穴を持つ有機光共振器を新たに設計・制作し、その共振器が極めて大きなピークシフトを示すことを見出した。

3. Heah, W. Y.; **Yamagishi, H.**; Fujita, K.; Sumitani, M.; Mikami, Y.; Yoshioka, H.; Oki, Y.; Yamamoto, Y., Silk fibroin microspheres as optical resonators for wide-range humidity sensing and biodegradable lasers. *Mater. Chem. Front.* **2021**, 5(15), 5653–5657.

光共振器とは、光をその内部に閉じ込めることができる数マイクロメートルほどの微細な光物理素子であり、レーザーや光センサーなどのコアとして利用されている。ただし、精密な形状制御が必要なことからこれまでの光共振器の多くは無機材料を微細加工することで製造されていた。本研究では生体高分子の溶液中における自己組織化を利用することで 100%タンパク質から構成される光共振器を開発した。この共振器は湿度センサーおよびレーザー発振子として利用することができる。

4. Takeuchi, A.; Heah, W. Y.; Yamamoto, Y.; Yamagishi, Y., Degradable Optical Resonator as in situ Micro-probes for Microscopy-based Observation of Enzymatic Hydrolysis. *Chem. Commun.* **2023**, 59, 1477–1480.

一般に、固体の表面で起こる分解反応を追跡することは困難であり、従来は時間がかかる上に精度の低い測定技術を利用せざるを得なかった。本研究では、分解性ポリマーで作成した光共振器を利用することで、水中でリアルタイムに加水分解反応の進展を計測することに成功した。その時間分解能は 0.1 秒以下、精度は 0.1wt%以下であり、高い精

度と時間分解能を併せ持つ、新しい測定手法である。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 2 件 (特許公開前のものも含む)

(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)

1. 受賞「PCCP Prize」

Royal Society of Chemistry および日本化学会, 2023/3/22

2. 招待講演「光機能性有機分子凝集体の PL を利用した光共振デバイスの開拓」

レーザー学会学術講演会第 41 回年次大会, 2021/01/20

3. 招待講演「分子性多孔体化結晶の合成と応用」

第 5 回ゼオライトセミナー, 2021/12/18

4. 招待講演「Chemically Tailored Optical Resonators for Sensing and Energy Harvesting」

第 71 回高分子学会年次大会, 2022/05/25

5. 招待講演「光物理と機能性有機化学の融合」

CREST トポロジー領域 合同セミナー 2022/07/26

6. 受賞「2021 年度 第 3 回物質・デバイス共同研究賞」

東北大学多元物質科学研究所, 2021/09/28

7. 受賞「高分子学会研究奨励賞」

高分子学会, 2023/3/27

(※加速フェーズ実施の成果)

8. 受賞「レーザー学会奨励賞」

レーザー学会, 2023/6/13

(※加速フェーズ実施の成果)

9. 受賞「2023 年度筑波大学 Best Faculty Member」

レーザー学会, 2024/2/16

(※加速フェーズ実施の成果)

