

研究課題別評価

1. 研究課題名： レーザーで創るタンパク質のマクロな形態・ミクロな構造
2. 研究者氏名： 坪井 泰之
3. 研究のねらい：

タンパク質は、ミクロには高次構造、マクロには膜状・繊維状といった複雑な状態を有する。本研究では、このタンパク質特有の“状態”を、レーザー光という外部摂動で制御することを大きなねらいとした。タンパク質はバイオエレクトロニクスの中心材料であり、レーザーは優秀なプロセシング・ツールとなる可能性が高い。また、タンパク質系のレーザー化学は、医療におけるレーザーメスや角膜整形の基礎としても極めて重要である。

研究申請段階での具体的なねらい(テーマ)は以下に記した通りであった(研究計画書の要約)。対象試料としては、シルクの主成分タンパク質であり機能性材料としても大きく期待されているシルクフィブロインを主に取り挙げた。レーザーは、ナノ秒パルス発振のエクシマー・レーザーやYAGレーザーである。解析手法としては、時間分解電子スペクトル測定や赤外吸収スペクトル測定、それに原子間力顕微鏡観察などを行った。

A マクロ形態の制御

-) レーザー堆積法による機能性タンパク質の薄膜作製
-) 機能性タンパク質フィルム表面のレーザー微細加工とそのダイナミクスの解析
-) レーザー誘起衝撃波による機能性タンパク質の微粒子作製

B ミクロ構造の制御

-) レーザー堆積法で作製した薄膜における2次構造制御
-) レーザーによる機能性タンパク質の2次構造の変換

以上の5テーマが申請段階で目指したものであり、これ以外にミクロ構造(2次構造)の可視化の研究も実際に行った。

4. 研究結果及び自己評価

上述のA-)~B-ii)のテーマ毎に、その研究結果と達成度(自己評価)を以下に記す。

A-) レーザー堆積法による機能性タンパク質の薄膜作製

代表的な単純タンパク質であるフィブロインやケラチンを対象に、レーザー堆積法によりその薄膜を作製することに成功した。機能性タンパク質に対するドライプロセスによる薄膜作成方法を確立し(業績論文1)、目標を十分に達成した。

A-) 機能性タンパク質フィルム表面のレーザー微細加工とそのダイナミクスの解析

フィブロインのフィルムに様々な波長のレーザーを高強度で照射し、その微細加工を試みた。その結果、誘起されるミクロな形態変化の挙動は、励起モードに大きく依存するという、興味深い知見を得た。

これを利用し、フィルムの表面にナノメートルスケールの微細構造を形成したり（248 nm レーザーによる主鎖アミド結合励起の場合）、表面に 500 μm 以上の膨張や 10 μm 以上のエッチングを施すことに成功した（532 nm レーザーによる増感剤励起の場合）。さらに、これら微細構造形成や温度変化のダイナミクスを明らかにした上で、機構の詳細を光熱的・光化学的の観点から明快に説明した。

以上の研究結果は、業績論文 2 にまとめられ、目標を十分に達成した。

A-) レーザー誘起衝撃波による機能性タンパク質の微粒子作製

水中に、フィブロインの微粒子（直径 10 μm ）を分散した。レーザーを集光し、ブレイクダウンプラズマを発生し、伝播する衝撃波により微粒子を微小化（破碎）することを試みた。しかし、照射前後で微粒子のサイズに有意の変化が観測されたとは言い難かった。レーザー光強度が充分でなく、発生する衝撃波の圧力が破碎には不十分だったと考えられる。本テーマに関しては、目標を達成出来なかった。

B-i) レーザー堆積法で作製した薄膜における 2 次構造制御

光増感法を提案し、これを用いて堆積したフィブロインの薄膜における 2 次構造を解析した。増感剤の濃度と光強度を適宜変化させ、薄膜において シート構造のドメインを創ることに成功した。これらは業績論文 3 にまとめられ、目標を十分に達成した。

また、この光増感法がポリテトラフルオロエチレンなどの機能性高分子材料の薄膜作製にも極めて有効であることを示した（業績論文 4）。

B-ii) レーザーによる機能性タンパク質の 2 次構造の変換

フィブロインの 2 次構造には、準安定なランダムコイル型と安定な逆平行 シート型の二つが存在する。既述の励起モード依存性を利用して、前者から後者への変換を目指した。いろいろな励起モードと光強度で、ランダムコイル型のフィブロイン薄膜に照射実験を行い、2 次構造変化を赤外吸収分光法で検討した。その結果、フィブロインの側鎖インドール環（トリプトファン）を励起する 266 nm レーザー光の場合でのみ、シート構造ドメインが形成することが分かった。更に、後述する 2 次元超薄膜と原子間力顕微鏡を用いて、この光誘起 2 次構造変化を可視化することに成功した。

これらの研究結果は、業績論文 5 にまとめられ、目標を十分に達成した。

B-その他 2 次元超薄膜の作製と、構造変化の可視化

簡便なキャスト法を用いて、マイカ基板の上にフィブロインの2次元超薄膜を作製することに成功した。作製した超薄膜は、ランダムコイル型フィブロインが2次元にネットワーク状に展開した形態をとる。これを加熱したところ、ランダムコイル型フィブロイン鎖が収縮し、シートアイランドを形成する様子が原子間力顕微鏡により鮮やかに観測された。これは、従来、赤外吸収スペクトルの微小なピークシフトにより議論されていたフィブロインの2次構造が、直接可視化された初めての例であり、極めて重要な知見が得られたと考えている（業績論文6）。

今後の展開： 上記の研究は、タンパク質系のレーザー化学を系統的に研究した初めての例である。基礎的には、凝縮系であるにも関わらず、光化学挙動が励起モードに大きく依存する点が極めて興味深い。これに関しては、超高速振動分光法による振動エネルギー再分配過程の研究を展開していこうと考えている。

一方、応用的見地からも多くの知見が得られている。例えば、レーザー堆積法によりタンパク質分子がその構造を損なうことなく基板上に堆積できることが示された。近年、マイクロ分析チップ科学が注目を浴びているが、特に医療診断分野で期待されている。その場合、固体基板上に生体機能性分子（多くはタンパク質を含む）を堆積、植え付けを行うことが重要である。ここで開発したレーザー堆積法は、それらをドライプロセスで可能とする重要な技術である。様々な生体機能分子に本手法を適用し、生理活性を保持したチップの開発を目指していきたいと考える。

5. 領域総括の見解

天然の機能材料であるシルク(絹)の構成成分であるタンパク質(プロテイン)を対象を当て、その機能性を更に高度化する手段としてレーザー光照射技術を駆使する方法を採用したことが、研究提案時点での本研究独自のアイデアであり、その意欲的な着想と旺盛な実行力が期待されて、本研究領域第2期研究者に採択された。その後の研究で、先例がほとんど無い新規分野の開拓に賭ける本人の意気込みは、この期の20名の研究者中でも随一のものであったと言える。3年間の研究期間に達成された研究成果の水準は、当初の期待を上回るものであり、基礎研究としても応用展開としても、多くの注目すべき成果が得られた。レーザー物理、高分子化学、医療応用工学など広範な分野にわたる多彩な研究展開が予想され、研究期間の終盤に栄転した大学付属研究所における学際的研究環境を活かした発展を期待したい。

6. 主な論文等

) 原著論文

- 1) Y. Tsuboi, N. Kimoto, M. Kabeshita, and A. Itaya, "Pulsed Laser Deposition of Collagen and Keratin" J. Photochem. Photobiol. A. Chem. 145, 209 (2001).
- 2) Y. Tsuboi, H. Adachi, K. Yamada, H. Miyasaka, and A. Itaya, "Laser Ablation of Silk Protein Films" Appl. Phys. A, submitted
- 3) Y. Tsuboi, M. Goto, and A. Itaya, "Pulsed Laser Deposition of Silk Protein: Effect of Photosensitized-Ablation on the Secondary Structure in Thin Deposited Films"

- J. Appl. Phys. 89, 7917 (2001).
- 4) Y. Tsuboi, H. Adachi, E. Yamamoto, and A. Itaya, " Pulsed Laser Deposition of Poly(tetrafluoroethylene), Poly(methylmethacrylate), and Polycarbonate Utilizing Anthracene-Photosensitized Ablation " Jpn. J. Appl. Phys. 41 (2002), in press.
 - 5) Y. Tsuboi, T. Ikejiri, S. Shiga, K. Yamada, and A. Itaya, " Light Can Transform the Secondary Structure of Silk Protein " Appl. Phys. A. 73, 637 (2001).
 - 6) Y. Tsuboi, K. Yamada, and A. Itaya, "AFM observation of Silk Fibroin on Mica Substrates" Langmuir, in preparation.

) 解説

1. 坪井泰之、板谷 明, "シルクのレーザー化学とアブレーション", 光化学, 32 (2001), 印刷中.

) 特許出願

- 1) "パルスレーザーアブレーション法による シート型シルクフィブロイン薄膜の作製方法" (平成 12 年 2 月 1 日、特願 2000-23875)
坪井泰之、板谷 明、科学技術振興事業団
- 2) "光増感パルスレーザーアブレーション堆積法によるポリテトラフルオロエチレン薄膜の作製方法" (平成 12 年 4 月 5 日、特願 2000-103003)
坪井泰之、板谷 明、科学技術振興事業団

) 招待講演

- 1) 第 1 回反応研若手交流講演会「ナノ構造化学」, "シルク蛋白質のレーザー化学", 坪井泰之, 平成 12 年 4 月 14 日, 於 東北大学 反応化学研究所
 - 2) 2001 高分子若手研究会「関西」, "シルクのレーザーケミストリー", 坪井泰之 平成 13 年 7 月 28-29 日, 於 関西地区セミナーハウス
 - 3) レーザー学会学術講演会第 22 回年次大会, "シルクのレーザー化学とアブレーション", 坪井泰之, 平成 14 年 1 月 24-25 日, 於 大阪国際交流センター
- (以上)