# 「構造機能と計測分析」研究領域 領域活動・評価報告書 - 平成 19年度終了研究課題-

研究総括 寺部 茂

(1) 研究領域の概要

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

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

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

(2) 研究課題 · 研究者名

別紙一覧表参照

### (3) 選考方針

選考の基本的な考え方は下記の通り。

- 1) 選考は「構造機能と計測分析」領域に設けた領域アドバイザー12名と研究総括で行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考の基本的な考えは、研究課題が計測・分析の戦略目標に合致した方法論の開発であり、新規な計測・分析法の芽を創出するまたは既存の方法と比べて技術の飛躍的展開に発展する可能性があること、ならびに研究期間内に目標を実現する戦略があることである。また、研究計画の規模が個人研究の枠内であることと、将来の発展可能性という観点で現役の研究者であることも重視した。
- (4) 選考の経緯

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

選考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	502 名	50 名	24 名

### (5) 研究実施期間

平成 16 年 10 月~平成 20 年 3 月(島野亮研究者のみ平成 16 年 10 月~平成 19 年 9 月)

(6) 領域の活動状況

領域会議:7回

研究報告会:1回

生命·計測分析合同研究会:2 回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:60回

研究開始時に研究現場を訪問し、研究環境、設備等の研究費の確認及びヒアリング、組織責任者への協力 依頼を行った。終了年度の訪問では、成果達成状況と残された課題の把握を行った。研究期間内で異動した 研究者をその都度訪問し、研究環境を確認した上で、新組織責任者への協力依頼、研究継続に必要となる支 援の決定を行った。訪問については技術参事が同行した。

(7) 評価の手続き

研究者の課題別評価報告書を基に、領域アドバイザーの意見を参考にして研究総括が評価を行った。 また、研究終了時に科学技術振興機構が開催する一般公開である研究報告会の参加者の意見を参考とした。

(評価の流れ)

- 平成 19 年 5月 第6回領域会議(総括・アドバイザーによる進捗評価とアドバイスの実施)
- 平成 19 年 9 月 島野研究者研究期間終了
- 平成 19 年 12 月 研究報告会実施(総括・アドバイザーによる評価の実施)
- 平成 20 年 2月 研究報告書および研究課題別評価書提出(研究者作成)
- 平成 20 年 3 月 研究総括による最終評価に基づき領域活動・評価報告
- 平成 20 年 3 月 研究期間終了(島野研究者を除く23 名)

平成 20 年 4 月 研究報告書提出

### (8) 評価項目

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

# (9) 研究結果

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

# 〇阿部肇 研究者

分子認識に伴うエントロピー低下を抑制するユニークな設計理念による新しい人工ホスト分子と、それを利用 した糖認識系の開発を行った。設計理念に基づきピリジンまたはフェノール誘導体をアセチレン結合で連ねた 親油性および親水性各種ポリマーを合成し、それを用いて塩化メチレン中また水中で糖のキラリティーまで識 別できることを錯体の CD スペクトル測定により示した。また、糖認識にともなう高次構造同士のダイナミックな 相互変化の存在も明らかとした。これらの成果を通じて、研究者の提唱する設計理念の正当性を実証したこと は高く評価できる。とくに水中で人工ホスト分子による糖認識に成功したことは特筆すべきである。今回の研究 で開発された糖認識システムの分析計測への応用が示されることが強く望まれる。その結果、医療診断、環境、 食品など幅広い分野に対して安価で信頼性の高いセンシング技術が提供されることを期待する。

#### 〇井原敏博 研究者

複数の機能性 DNA プローブが協調して働くと、単一のプローブでは見られなかった種々の高度な機能を発 揮する現象に着目して標的遺伝子のラベル化を狙った。遺伝子中の繰り返し配列を選択的に検索するプロー ブ設計の一般則を見いだし、DNA 上での希土類金属イオンの錯形成を利用した蛍光プローブによる多色アレ ル解析に成功した。化学的アプローチを進めてプローブの選択性を着実に発展させている点は高く評価できる。 希土類錯体の特徴をうまく活かした遺伝子混合物の同時検出、あるいは DNA テンプレート上での光化学ライゲ ーションの研究は将来の SNP 解析に繋がり実用価値は大きい。今後は高効率化、高選択性などの実用レベル の課題解決を図る研究に進展することが強く期待される。また、核酸の特性を利用して各種機能を持った分子 を特異的に反応させ、新しい計測分析法を創成することを期待したい。

#### 〇上田宏 研究者

自ら考案した非競合的免疫測定法である「オープンサンドイッチ法(OS法)」を発展させ、小分子からタンパク 質までを、1回の反応洗浄サイクルのみで検出を可能とする高感度生体関連物質定量法の完成を目指した。 分子量 300 程度であるカビ毒などの数種の化合物を対象にOS法による高感度定量に成功した。また、ペプチド を認識し高い結合能を示すV<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>を取得し、これをマイクロチップに応用して血清のペプチド濃度の測定に成功 した。さらに、タンパク質およびハプテン免疫マウスから、ファージ提示法により多数の特異的可変領域の単離 にも成功した。これらの成果を通じてOS法の一般性を実証し、ハイスループット化と応用範囲の拡大に貢献し たことは高く評価できる。抗体から可変領域を単離した場合に抗原分子認識に及ぼす効果など解明すべき課 題もある。この方法が生体物質や環境汚染物質の検出などの基盤技術として発展することを強く期待する。

### 〇浦野泰照 研究者

生体内反応を可視化するために目的に応じて発光する蛍光プローブの精密設計法の確立を目指した。光誘 起電子移動過程による消光に基づいて、広い応用範囲を有する蛍光プローブ母核となる蛍光団 TokyoGreen(TG)類の開発に成功した。また、この手法を用いて15種類を超える有用な蛍光プローブを開発し、 設計理論の汎用性を実証した。さらに、この蛍光プローブ設計法を早期がんのイメージングに展開し、がん細 胞のみで強い蛍光性を示すプローブを実現した。学術的に独立性が高く、しかも波及効果が大きいという点で 高く評価したい。蛍光プローブの幾つかが実際に市販されるに到っていることも特筆に値する。今後、フルオレ セイン以外の色素分子への一般化など、様々な化学的・物理的性質のプローブとして発展することを強く期待 する。本研究で確立した方法論のさらなる発展は、将来バイオ・医療応用分野に大きな革新をもたらすと考えら れる。

# 〇小比賀聡 研究者

標的となる2重鎖 DNAと結合して三重鎖らせん構造を形成し、かつ連鎖的な化学反応を DNA 上で誘導する 人工核酸により、極微量 DNA の配列特異的検出法の確立を目指した。架橋型人工核酸塩基を開発し、三重鎖 核酸形成における課題であった C-G, T-A 塩基対の認識を実現した。また三重鎖核酸形成をトリガーとして半 減期約 30 秒以内に自己分解するオリゴヌクレオチドプローブの開発に成功するとともに、蛍光基と消光基を導 入したオリゴヌクレオチドを合成し、標的 DNA を短時間で検出できることを示した。独自性の高い方法でこれら の成果を得たことは高く評価できる。検出感度数十アトモルレベルの迅速な診断の見通しも得ており、SNP 解 析や特定遺伝子の解析法において幅広く応用が進展することが期待される。実用化に向けたさらなる改良と幅 広い評価実験の積み重ねが必要である。

# 〇影島賢巳 研究者

AFM の磁場変調を利用して、タンパク質単一分子の構造相転移に伴う粘弾性応答の計測手法の確立を目 指した。コネクチン分子を用いて巨大たんぱく質の粘弾性プロファイルを測定し、高次構造をもつタンパク質の 力学特性の概要と、その精密測定に必要な新規 AFM の目標仕様を明らかとした。さらに、外部電磁石によりカ ンチレバーだけに限定して力を印加する励振方式により、1MHz までの幅広い帯域でタンパク質のコンフォメー ションの精密測定が可能な新方式 AFM を完成させた。この過程での磁気力の確保、検出系の最適化、ノイズ 抑制などの要素技術構築への総合的な取り組みは高く評価できる。今後も継続して研究を進め、生体高分子 のみならず合成高分子も含めた1分子粘弾性スペクトル測定を実現し、高分子物理学の進展に寄与していただ きたい。

## 〇桒原正靖 研究者

低分子化合物に対して抗体様機能をもつDNA(アプタマー)を創出するための方法論の確立を目指した。各 種修飾ヌクレオシド三リン酸を合成し、その PCRを可能とする幅広い寛容性と反応忠実性を両立させる DNA ポ リメラーゼの選択に成功した。さらに、修飾 DNA ライブラリを用いて R-サリドマイド誘導体などの低分子化合物 に特異的に結合するアプタマーを取得した。これらの成果は、幅広い種類の修飾ヌクレオシド三リン酸の合成、 各種 DNA ポリメラーゼを用いた修飾 DNA ライブラリの調製、インビトロセレクションを着実に実行することにより 得られている。中でも、光学活性サリドマイド誘導体を高選択的に認識できるアプタマー取得に成功したことは 高く評価される。本成果はアプタマー創製の方法論として、医薬や検査薬への応用が期待できる。アプタマーと 特異的に結合する分子との相互作用機構を調べ、有用なアプタマー設計への指針を得ることも期待したい。

### 〇佐藤守俊 研究者

独自の可視化法によって種々の生体情報分子の動態を明らかにするためのプローブ開発を行った。その結果、①脂質結合ドメインと局在化配列を有する蛍光プローブを作成し、生体脂質の細胞内動態の可視化に成功した。②リン酸化認識ドメインと局在アミノ酸配列を有する蛍光プローブの作成に成功し、In vivo でキナーゼによるリン酸化の細胞内動態の可視化に成功した。③神経伝達物質である NO の超高感度可視化プローブを開発し、細胞内の時空間可視化に成功した。これらの成果は、いずれも世界最高性能を有するプローブ開発によるものであり、細胞でのタンパク質の局在活性の可視化の幅広い展開は極めて高く評価できる。また、生体分子の細胞内動態に関して新規性の高いいくつかの知見も得ており、プローブ設計理論の有用性を証明したことも高く評価できる。今後、生化学や生物学、生理学の研究分野に対して大きなインパクトをもたらすことが期待できる。

# 〇島野亮 研究者

高感度な光学活性計測、磁気光学効果測定を可能とするテラヘルツ周波数帯エリプソメトリーの開発を行った。光学測定システム全体に抜本的な要素技術の改善を積み重ね、テラヘルツ領域でミリラジアン以下の高感度偏光回転計測を実現した。この分光法を用いた磁気光学測定により、従来は困難であった低キャリア濃度半導体の非接触キャリア濃度評価、低温強磁場中の半導体のサイクロトロン共鳴周波数領域のスペクトル測定に成功した。さらに超伝導体薄膜への適応、キラル高分子計測への適用も進め、本方法の物性物理研究に対する幅広い応用可能性を証明したことは高く評価される。また、平成19年10月よりERATO 十倉マルチフェロイクスプロジェクトのグループリーダーとして、本研究成果を強相関電子系のスピン構造をプローブする手法という波及効果の大きい開発に展開したことも高く評価される。

#### 〇鈴木拓 研究者

イオン中性化のスピン依存という物理現象に着目して、表面・界面のスピン配列を調べる独創的なスピン偏極イオン散乱分光計測システムの開発に挑戦した。ヘリウム励起過程におけるラディエーショントラッピング現象を解明し、円偏光と直線偏光を最適化したポンピング法によりHe<sup>+</sup>偏極率 25%を達成し、それを用いて、表面から 2~3 原子層の元素の識別とそのスピン状態の計測に成功した。スピン偏極ビームの脱励起や中性化の基本的メカニズムを解明し、目的達成に必要な全要素の技術開発を計画的に実施し、スピン偏極イオン散乱分光計測法を完成させ、その測定例を示したことは極めて高く評価できる。また、スピン偏極率分析計の開発のために静電型イオントラップの開発にも成功した。既存の分析手法では不可能な表面・界面のスピン配列解析を可能とするもので、スピンエレクトロニクス等の電子スピン応用技術の進展に寄与することが強く期待される。

#### 〇辻幸一 研究者

3次元元素分布測定が可能な小型蛍光X線分析装置の開発を行った。微小空間への1次X線照射効率の向 上、2線源の同時照射、蛍光 X線の効率的集光について検討を行い、2つの X線管からの X線をポリキャピラ リーレンズで1点に集光した共焦点蛍光 X線装置を開発し、軽元素から重元素までの高感度微量分析に成功し た。また、リング状ターゲットで発生する円錐状の X線を試料に照射し、発生する蛍光 X線をターゲット中心を通 してポリキャピラリーレンズで集光する装置を試作し、装置の小型化が可能なことを確認している。これらの技 術を固液界面分析、マイクロチップ試料分析など実用的な計測分析に展開したことも高く評価できる。当初計画 のリング状 X線光源の開発には至らなかったが、着実に研究成果を挙げており有用な分析技術の開発が達成 されている。今後、3次元元素分布測定の有用性をより多くの例で示すことが望まれる。

#### 〇新倉弘倫 研究者

分子や原子の中を動く電子の運動の直接観測を目指した。強い短パルスレーザー電場を測定対象に照射す ることにより生成させた再衝突電子により生じる高次高調波スペクトルを計算により明らかとし、この測定に必 要なキャリアエンベロープ位相のノイズ低減に取り組み、二酸化炭素を対象にした実測に必要な位相ノイズ 0.17radianを安定的に得ることに成功した。さらに、キャリアエンベロープ位相制御されたパルスにより再衝突回 数2回を実現し、連続した高次高調波発生に近づけることに成功した。分子の中の電子の挙動という従来観測 不可能であったものを見えるようにすることが本研究により実現に近づいている。キャリアエンベロープ位相安 定化のために光学的要素を一つ一つチェックしていく地道な作業により、制御系を高度化した努力は高く評価 できる。この研究により明らかとなる電子波束の研究が、原子物理から化学反応の基礎的な研究に画期的な 情報をもたらすと強く期待する。

### 〇長谷川健 研究者

薄膜・吸着分子の構造異方性解析を目的とした多角入射分解分光法(赤外 MAIR 分光法)の構築を目指す研究を行った。仮想的な縦波光を考えた全く新しい計測理論に基づいて実験を行い、これまで不可能だった非金属基板上での純面外振動スペクトルの測定と、光学定数不要の分子配向解析が本分光法により可能であることを証明した。この方法により面内、面外スペクトルともに完全同一試料から測定することが始めて可能となるため、科学技術に対するインパクトは極めて大きくその実用価値は高く評価される。界面の計測科学に新しい道を拓く光計測概念を提唱し、新規性の高い技術の開発に成功した実績は高く評価される。実験と平行して進めた既存の光学理論との対応原理の解明も明らかになりつつあり、この方法が一般論として確立されることが強く期待される。さらに本計測法を可視吸域まで拡張する研究も進展中とのことで、物理化学研究に新たな道を開くと期待される。

# 〇林久史 研究者

Spring-8 の強力 X 線源と「孔雀型」分光器と名づけた高感度・高分解能分光器を組み合わせて状態識別 XAFS の実用化に挑戦した。自動車用銅酸化物触媒をサンプルとして用いて測定し、局所的なクラスター構造 の解明に成功した。また、高温超伝導体や巨大磁気抵抗材料の単結晶をサンプルとして、スピンを選別した XAFS が可能なことを実証した。これらにより寿命幅に制限されない状態選別 XAFS を実現し、本研究により初 めて明らかになった結果を多く示した点は高く評価できる。状態選別 XAFS 分光は実用的な計測法として一歩 を踏み出したといえる。今後、この方法の有用性を示す応用研究が幅広い分野に拡がることを期待する。「孔 雀型」X線分光器はまだまだ発展途上であるが、今後さらなる高性能化が期待できるため、状態選別スペクトル もさらに高分解になると予測され、材料分析分野の基盤技術としての有用性はますます高くなると考える。

### 〇林田修 研究者

メチル化やアセチル化などの翻訳後修飾を受けやすいヒストンおよびその翻訳後修飾を特異的に認識する 人工ホストの開発を行った。ゲストであるヒストンに対する特性を調べた結果、レゾルシナレンオリゴマーのクラ スター効果を利用してヒストンの認識を可能とした。また、蛍光性ホストを用いてヒストンの酵素によるアセチル 化反応の追跡にも成功した。さらに、ロタキサン型の蛍光ホストを合成し、ヒストン認識と蛍光検出に成功してい る。研究者はヒストンに結合するホスト分子合成に多大の努力を費やしており、興味ある多くの成果をあげてい る。当初の課題であったメチル化ヒストンの検出も今後可能になると期待できる。大腸癌などの疾患に関わって いるとされるヒストンの異常メチル化などに対する分析法として期待されるとともに、超分子化学を駆使した基 礎研究として学術的にも高く評価できる。

# 〇火原彰秀 研究者

マイクロチップ上に作製したマイクロ流路内での油水2相流界面における振動・波動現象を計測する顕微分 光法の開発を行った。顕微輻射圧界面変位(µRaPID)法と名づけた顕微レーザー分光法を開発し、マイクロ流路 内での油水2相流界面における剪断応力を変化させて界面の特性を測定し、強制振動波の伝搬現象の観測に 成功した。これにより、マイクロ多層流体の物理モデルを構築し、ナノ流体液液界面でのずり流動によりマイク ロ流体の特異流れが説明できることを明らかにした。未知の研究領域であるマイクロ多相流に関して、ダイナミ ックな基礎物性を着実に把握しつつあることは高く評価できる。本研究がもたらす界面現象に関する新しい知 見は、化学マイクロチップの設計指針として性能改善に貢献することは明白であり、かつ重要である。今後、本 計測法の有用性を示す適用例を増やして行くことも重要である

### 〇平野研 研究者

DNA1分子を試料として、4種の蛍光標識ヌクレオチドを用いてポリメラーゼ反応を起こさせ、全反射顕微鏡 でこれをリアルタイム検出するという意欲的な研究に挑戦した。蛍光標識 dNTP の取込み活性評価から、最も 効率的で各種蛍光標識への対応性の最も高いラット由来の DNA ポリメラーゼの選定に成功した。さらに、光学 系の改良により4種の蛍光色素のリアルタイム検出が可能な全反射顕微鏡を完成し、上記のDNAポリメラーゼ を用いた3種の蛍光標識 dNTP の合成反応のリアルタイム検出に成功した。これらの成果は酵素、標識アナロ グ、光学系に対する整合性のある総合的な取り組みにより得られたものであり高く評価できる。4種類の塩基を 連続的に検出するための課題は数多く、完成に至るにはさらなる検討が必要である。しかし、この方式の将来 性と生命科学と医療検査へのインパクトを十分予感できる結果が出てきたと感じられる。

### 〇廣田俊 研究者

光解離性修飾基をタンパク質に導入し、光パルスでタンパク質の構造形成を開始させる全く新しい研究手法 に挑戦した。光感応性修飾基を結合することにより変性させたタンパク質やペプチドに、光照射によって修飾基 を解離させ構造変化を誘起し、リフォールディング過程を極初期から詳細に追跡することに成功した。さらに、 修飾基脱離後にアポプラストシアニンが自然状態に戻る現象を、分子体積と拡散定数の変化などから解析して、 フォールディング過程にタイムスケールの違う3段階があることを証明した。特定タンパク質の構造形成反応の 追跡やタンパク質ーペプチド複合体の形成の制御にも成功している。タンパク質の構造形成反応に関して、初 期段階での知見は少ない現状において、これを解明する手がかりとしてこれら一連の成果は高く評価できる。 本成果の適用範囲を拡大しタンパク質の立体構造を光制御する方法の開発へと発展することを期待したい。

## 〇福澤健二 研究者

ハードディスクとヘッド間の極薄潤滑膜のナノトライボロジー計測技術の開発を行った。0.1nmのすきま制御と

0.01nN オーダーの水平力測定が可能なプローブの開発、水平力・鉛直力の同時測定プローブ、双音叉型共振器を利用した1µNオーダーの鉛直力測定に成功した。1nmオーダーのすきまでの潤滑剤分子と固体表面との相互作用、潤滑剤の極性による粘弾性・流体挙動など、本装置により初めて明らかとなったいくつかの知見を得ている。また、ナノ潤滑膜の膜厚分布をエリプソメトリーにより二次元像として計測することにも成功し、ナノ潤滑膜の吸着層が凝集現象に関係することなどを見出した。これらの成果は、装置として統合が可能であり、今後、微少空間における粘弾性測定はマイクロ化学チップ、生体内流動など分析化学、生命科学分野においても有用な知見をもたらすと考えられる。

# 〇間瀬一彦 研究者

固体表面へのX線照射により生成する光電子、オージェ電子、イオンを同時に測定し、表面機能性サイトの 電子状態を解明するコインシデンス分光技術の開発に挑戦した。2つのエネルギー分析器と質量分析器を搭 載したコインシデンス分光器を完成し、それを用いてSiO<sub>2</sub>/Si界面、SiO<sub>2</sub>超薄膜表面の局所荷電子状態、Si表面 に凝縮した有機シリコン化合物のサイト選択的イオン脱離解離などを解明し、本装置の有用な応用例を示した。 極めて難しい実験技術を追求し、光電子、オージェ電子、イオンの分光法を統合したコインシデンス分光装置の 完成に至ったことは高く評価できる。データ解析法と実験室内用装置の開発もあわせて進め、この方法を一般 に普及させるための強い努力も感じる。今後は、分解能と感度の更なる改良により、この方法の特性を利用し た応用例をさらに拡大し、一般化を進めていくことが期待される。

#### 〇御園雅俊 研究者

分光計測の高精度化に不可欠な高精度の波長目盛を持つ安定化した光周波数コムの実現を狙った。さらに、 この光周波数コムと2光子吸収分光を組み合わせた超高分解能分光システムの開発を行った。きわめて安定 性の高い光周波数コムを完成させ1オクターブ以上にわたって周波数同定が可能な装置開発に成功した。また、 光周波数コムとのドッキングを前提としたドップラーフリー2光子吸収分光システムを作成し、誤差信号による制 御方法により、ドップラーフリー計測を可能とする共鳴条件を安定して維持することに成功した。GPSに搭載し た原子時計を利用して手軽に高精度を得るというユニークな発想を実現し、本研究の基本部分をそれぞれ完 成させたことは評価できる。今後、システムの完成度を高め、さまざまな多原子分子の精密スペクトルの測定に よりダイナミクス解析の応用例が発表されることが期待される。

# 〇三輪佳宏 研究者

生きたままの動物個体中の薬物等の分布を可視化するプローブ開発を展開した。プローブを全身に発現したマウスを作り薬物の in vivo イメージングに成功し、本手法が哺乳動物だけでなく動物全般に幅広く応用できる可能性を実証した。また、各種蛍光タンパク質をタンパク質分解制御タンパク質に結合したプローブを作製し、感度、バックグランド、時間分解能の改善を図りつつ、生体内薬物動態を可視化する蛍光イメージングの信頼性を高めた努力は高く評価される。また、トランスジェニックマウスであっても一匹ごとに薬物動態に個体差があることを確認するなど、このプローブによる生命現象研究に応用面でも興味深い進展を見せている。このプローブ概念の一般化は、本さきがけ領域として大いに期待したいところであり、理論的裏付けとなる研究の更なる進展に期待したい。

# 〇八木一三 研究者

非線形顕微分光を用いることによりキラル界面を評価できる高感度かつ実用的な分析方法の実現に挑戦した。金単結晶の表面キラリティを SHG 回転異方性測定により明確に識別し、かつキラルサイト数の定量化を可能とした。さらに、BINOL 薄膜のキラリティを可視ー赤外 SFG 分光により明確に識別した。SHG 分光による金属表面のキラリティ分析技術と和周波発生分光によるキラル分子薄膜およびキラル修飾表面の分析技術を開発したことは高く評価できる。非線形分光を用いた本計測法により、従来キラル分子の密度が低いため界面キラリティ計測が困難であった触媒、生体分子、ナノ材料などの界面キラリティ分析が可能となることが証明された。 今後は、構築中のTip-enhanced SFG に展開することにより、界面における光学活性分子研究への貢献が一層拡大すると期待する。

# 〇山口央 研究者

独自に開発したナノチャンネル集合体作成技術を基軸に、ナノチャンネルの特異性を利用した物質の空間 的・時間的分離手法の確立に取り組んだ。分離分析場として最適な一連のサイズと構造を有するナノチャンネ ル集合体作成技術開発に成功し、それを用いて時間分解蛍光分光法によりナノチャンネル内の物質拡散挙動 の計測を可能とした。また、応用面では、グルコースオキシターゼをチャンネル内部に固定化した GOD-NAM を 用いて酵素触媒反応効率ほぼ 100%を達成し、酵素センサーや酵素触媒反応へ応用の見通しも得ている。当 初の目標であるナノチャンネルの特異性を利用した物質の空間的・時間的分離手法の確立には到ってないが、 各種ナノチャンネル集合体作成技術を確立し、ナノチャネル中の物質の種々の物理定数を実測し、ナノ空間の 新たな特異性を明らかにしており、着実に目標に向かって進歩している。これからの応用面の進展も含めて分 析分野の基盤技術として期待は大きい。

以上のように、専門領域の異なる物理、化学、生物と広い学問分野から参加した24名の研究者がそれぞれ の分野で個人の独創的な発想に基づくこれまでにない革新技術の創出を目指して研究を行ってきた。3年半と いう短期間ではあったが、3分の1程度研究者は目標を達成した。目標達成には至らなくとも、どの研究者も目 的達成の目処がつく段階に達しており、近い将来に次世代の新規計測・分析技術の創出や、技術展開が期待 できる。各研究者が本領域での研究を契機に計測・分析技術の進展に一層貢献することを期待したい。

(10) 評価者

研究総括 寺部 茂 兵庫県立大学 名誉教授

領域アドバイザー氏名(五十音順)

家泰	影弘	東京大学物性研究所ナノスケール物性研究部門 教授
大島	忠平	早稲田大学理工学部応用物理学科 教授
大橋	裕二	高輝度光科学研究センター産業利用推進室 コーディネーター
神原	秀記*1	(株)日立製作所 フェロー
北森	武彦	東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻 教授
坂入	実	(株)日立製作所基礎研究所 総括主管·主管研究長
庄子	習—	早稲田大学理工学術院電子光システム学科 教授
白木	靖寛	武蔵工業大学 副学長
鈴木	孝治	慶応義塾大学理工学部応用化学科 教授
田中	信男	京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 教授
田中	通義*2	東北大学名誉教授
馬場	嘉信	名古屋大学大学院工学研究科化学·生物工学専攻 教授
前田	瑞夫	(独)理化学研究所中央研究所前田バイオ工学研究室 主任研究員
渡會	仁	大阪大学大学院理学研究科化学専攻 教授

\*1 参画期間 平成 18 年 11 月~

\*2 参画期間 平成 17 年 7 月~

# (参考)

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論 文	56	231	287
口頭	338	70	408
ポスター	215	126	341
出版	35	10	45
合 計	644	437	1081
※平成 20 年 3 月現在			3月現在

# (2)特許出願件数

国内	PCT	計	
37	14	51	
		※平成 20 年	3 月現在

## (3)受賞等

〇 浦野泰照研究者

平成 17 年 3 月 第 16 回加藤記念バイオサイエンス研究助成

平成 18 年 4 月 平成 18 年度 文部科学大臣表彰若手科学者賞

- 平成 18 年 6 月 Invitrogen-Nature Biotechnology Award 2006
- O 小比賀聡 研究者

平成 18 年 2 月 平成 17 年度大阪大学教育·研究功績賞

〇桒原正靖 研究者

平成 18 年 5 月 日本化学会第 86 春季年会優秀講演賞

- O 佐藤守俊
- 平成 19 年 3 月 平成 18 年度日本化学会進歩賞

平成 19 年 9 月 平成 19 年度日本分析化学会奨励賞

- O 辻幸一 研究者
  - 平成 17 年 8 月 第 54 回 デンバーX 線会議、ベストポスター賞

平成 17 年 9 月 第 34 回 CSI 国際分光学会議 ポスター賞

- 平成 19 年 11 月 第 19 回 アジア国際分析会議 ポスター賞
- O 新倉弘倫 研究者

平成 16 年 12 月 2004 年度 National Research Council, Annual Award for "A Scientific Breakthrough"

- O 長谷川健 研究者
  - 平成 17 年 10 月 第 2 回堀場雅夫賞

平成 19 年 11 月 第 7 回山崎貞一賞(計測評価部門)

- O 林久史 研究者
- 平成 17 年 3 月 平成 16 年度トーキン科学振興財団研究奨励賞
- 平成 18 年 8 月 第 3 回堀場雅夫賞
- 〇平野研 研究者
- 平成 20 年 3 月 第 15 回源内奨励賞
- O 廣田 俊 研究者
  - 平成18年2月 平成17年度日本薬学会薬学研究ビジョン部会賞
- O 福澤健二 研究者
  - 平成 17 年 3 月 2004 年度日本機械学会船井賞(業績賞)
  - 平成 17 年 5 月 2004 年度日本トライボロジー学会論文賞
- 平成 18 年 4 月 2005 年度日本機械学会賞(論文)
- 〇 間瀬一彦 研究者
   平成 16 年 10 月 第 29 回真空技術賞
- O 三輪佳宏 研究者

平成 17 年 3 月 第37回倉田記念日立科学技術財団研究助成

平成 20 年 2 月 財団法人 島津科学技術振興財団 研究開発助成(平成19年度)

O 山口央 研究者

平成 17 年 9 月 2005 年度日本分析化学会奨励賞

(4)招待講演

国際 54 件 国内 123 件 ※平成 20 年 3 月現在

# 「構造機能と計測分析」領域 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名	研究課題名	現職	研究費
(参加形態)	(研究実施場所)	(応募時所属)	(百万円)
阿部 肇 (兼任)	極性基が配列した低エントロピー型 分子認識アレイの開発 (富山大学大学院医学薬学研究部)	富山大学大学院医学薬学研究部 助教 (富山医科薬科大学薬学部 助手)	38
井原 敏博 (兼任)	プローブ間の協同性を利用した 高感度遺伝子解析法 (熊本大学大学院自然科学研究科)	熊本大学大学院自然科学研究科 准教授 (同上 工学部物質生命化学科 助 教授)	45
上田 宏 (兼任)	二量体検出原理による 新規免疫測定法の開発 (東京大学大学院工学系研究科)	東京大学大学院工学系研究科 准教授 (同上 助教授)	44
浦野 泰照 (兼任)	細胞生命現象解明に向けた 高次光機能性分子の精密設計 (東京大学大学院薬学系研究科)	東京大学大学院薬学系研究科 准教授 (同上 助手)	45
小比賀 聡 (兼任)	三重鎖核酸形成を基盤とする 革新的DNA分析 (大阪大学大学院薬学研究科)	大阪大学大学院薬学研究科 准教授 (同上 助手)	39
影島 賢巳 (兼任)	生体単一分子ダイナミクスの 多次元計測法 (大阪大学大学院工学研究科)	大阪大学大学院工学研究科 准教授 (同上 助教授)	32
桒原 正靖 (兼任)	修飾 DNA をセンサ素材とする 新しいバイオセンサの開発 (群馬大学工学部)	群馬大学工学部 助教 (同上 助手)	41

佐藤 守俊 (兼任)	生体情報分子の先端的可視化 計測法の開発 (東京大学大学院総合文化研究科)	東京大学大学院総合文化研究科 准教授 (東京大学大学院理学系研究科 助手)	40
島野 亮 (兼任)	高感度テラヘルツ光学活性 計測技術の開発 (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 助教授)	40
鈴木 拓 (兼任)	スピン偏極-イオン散乱分光法の 開発 ((独)物質・材料研究機構ナノテクノロ ジー基盤領域量子ビームセンター)	(独)物質・材料研究機構ナノテクノ ロジー基盤領域量子ビームセンタ ー 主任研究員 ((独)物質・材料研究機構ナノマテ リアル研究所 研究員)	49
辻 幸一 (兼任)	高感度3次元蛍光 X 線分析装置の 開発 (大阪市立大学大学院工学研究科)	大阪市立大学大学院工学研究科 准教授 (同上 助教授)	41
新倉 弘倫 (専任)	再衡突電子を用いた アト秒分子内電子波束の測定 (National Research Council)	科学技術振興機構 さきがけ研究者 (JSPS 博士研究員)	51
長谷川 健 (兼任)	多角入射分解分光法の構築: 光計測の新たな概念 (東京工業大学大学院理工学研究科 化学専攻)	東京工業大学大学院理工学研究科 准教授 (日本大学生産工学部 助教授)	36
林久史 (兼任)	状態選別XAFS分光 (日本女子大学理学部)	日本女子大学理学部 准教授 (東北大学多元物質科学研究所 助手)	36
林田修(兼任)	超分子化学に基づく修飾タンパク質の 蛍光分析法の開発 (九州大学先導物質化学研究所)	九州大学先導物質化学研究所 准教授 (同上 助教授)	42

火原 彰秀 (兼任)	マイクロ流体界面計測法の開発 (東京大学生産技術研究所)	東京大学生産技術研究所 准教授 (東京大学大学院工学系研究科 講師)	39
平野 研 (兼任)	核酸ポリメラーゼ解析と DNA1分子シーケンスへの応用 (産業技術総合研究所四国センター 健康工学研究センター)	産業技術総合研究所四国センター 健康工学研究センター 研究員 (産業技術総合研究所四国センター 単一分子生体ナノ計測研究ラボ 研究員)	36
廣田 俊 (兼任)	光解離性修飾基を用いた 蛋白質の構造と機能の新規研究法 (奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科)	奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 教授 (京都薬科大学大学院薬学研究科 助教授)	50
福澤 健二 (兼任)	先端的ナノトライボロジー計測による 情報記憶装置の革新 (名古屋大学大学院工学研究科)	名古屋大学大学院工学研究科 教授 (同上 助教授)	38
間瀬 一彦 (兼任)	コインシデンス分光法による 複合表面解析 (高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所)	高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 准教授 (同上 助教授)	41
御園 雅俊 (兼任)	原子時計精度での超高分解能 レーザー分光計測 (福岡大学理学応用物理学科)	福岡大学理学応用物理学科 准教授 (同上 助教授)	43
三輪 佳宏 (兼任)	生細胞内分子を見る デグロンプローブの開発 (筑波大学大学院人間総合科学究科)	筑波大学大学院人間総合科学究科 講師 (同上)	39
八木 一三 (兼任)	界面のキラリティを捉える 非線形顕微分光の開発 ((独)産業技術総合研究所固体高分子 形燃料電池先端基盤研究センター)	<ul> <li>(独)産業技術総合研究所</li> <li>固体高分子形燃料電池先端基盤</li> <li>研究センター チーム長</li> <li>(北海道大学大学院理学研究科</li> <li>講師)</li> </ul>	40

山口 央 (兼任)	新規分離・分析場としての ナノチャンネル集合体 (東北大学大学院理学研究科)	東北大学大学院理学研究科 助教 (同上 助手)	39
--------------	--	----------------------------	----

# 研究課題別評価書

1. 研究課題名

極性基が配列した低エントロピー型分子認識アレイの開発

2. 氏名

阿部 肇

3. 研究のねらい

有機ホストーゲスト化学の手法と知見を基に新しい人工ホスト分子を設計・合成し、生体分子、 特に糖質の分子認識系の開発を目指した。研究者は過去に水素結合を駆動力として小分子を認 識するホスト分子の研究を行ってきた。そのような分子認識を起こすための会合自由エネルギー は、水素結合によるエンタルピー項の利得と、系の自由度が失われるゆえのエントロピー項の損 失から成っている。本研究では特にエントロピー項の損失を抑えるため、ピリジンやフェノールとい った極性ユニットを剛直な骨格上に並べたアレイ状のポリマー、オリゴマーをホスト分子として設 計・合成し、エンタルピー項の利得を最大限に生かして分子認識を効率化することを目論んだ。生 体分子の中でも糖質は特に水との親和性が高いため、水中で水分子に打ち勝って糖を捕らえる 人工ホスト分子の例はホストーゲスト化学の分野でも皆無であった。本研究では 100%水中で単糖 や多糖を認識できるホスト分子の実現を最重要な達成目標とした。さらに生体中の糖認識に会合 強度・選択性の面で近づくことと、糖質の新たな検出・計測系へ繋げることを目指した。

4. 研究成果

「研究のねらい」の項目で述べた目的のもと、ピリジン環を多数連ねたホスト分子A1~A6を設計・合成することができた。下にその単位構造を挙げる。実際のホスト分子は以下の単位構造が数個~数十個連なった鎖状構造を持っており、薗頭反応を利用して得られる。



まず最も構造が単純なA1を使って、ピリジンポリマー構造 が実際に糖を巻き取れるかどうかを調べた。A1の塩化メ チレン溶液に糖を加えたところ、円二色性(CD)スペクトル 上に、非対称ならせん型錯体の形成を示すバンドが現れ た。計算化学(Monte-Carlo法)で求めた錯体の構造を図1 に示す(中心の球棒モデルが β-D-グルコシド、取り囲む 棒モデルがA1、側鎖のブトキシ基は省略)。この図では2 ピッチのらせんで糖を捕えている。このらせんは糖のD,L-キラリティ(右手/左手の関係)に応じて向きが反転するこ とが誘起CD(図2)から分かった。そしてA1を出発点として、 別の機能を持たせた親油性ポリマーA2. A3. A4、親水性 ポリマーA5. A6を設計・合成した。

A2は側鎖のアミノ基によりポリマー全体が強い塩基性を 持つため、下式のように酸の添加によって糖認識を調整 できる。A2に0.5当量の酸を添加すると糖に対する親和性 が高まり、さらに酸を加えると逆に親和性が失われる。



A3はピリジノン環とピリジン環との共重合体とすることで らせん型が有利となり、環が5個の短いオリゴマー長でも 糖を捕らえてらせんを巻くことができる。これはさらに自己 集合性を示した。



図4 A4群におけるCD強度と UV吸光度のプロット。実線は 14量体、破線は10量体。



図1 ピリジンポリマーによる糖認識 (錯体の構造/Monte Carlo-MM法)



図2 らせん型錯体の形成を表す CDバンド。 塩化メチレン中、A1と オクチルβ-グルコシドを混合。



合で取りつけた。これに 図3 A4の高次構造。分子内水素 結合による。 (Monte-Carlo-MM 法で導出)

合によりらせん型を作らせ強い誘起CDを観測することができた (図3)。このA4には続くGrubbs反応により側鎖のアルケンを架 橋しらせん型を固定することができた。また、らせん形成でピッ チ間のπスタッキングが強まることが紫外スペクトル(UV)上の淡 色効果とCD強度の相関から分かった(図4)。

A4の末端へはあらか

より外部から糖を加え

ずとも分子内の水素結

A5,A6 は側鎖としてオリゴエチレングリコール基 を持たせることで、ポリマー全体に親水性を持た せ、水に溶かせるようになった。すると興味深いこ とに、ポリマーA5,A6は水中で自発的にらせんを巻 くことが分かった。その中空にはピリジン環の窒素 が集まり糖を取り込みやすい構造となっているた め、水との親和性がはるかに高いはずの糖を、水



図5 水溶性A5による糖の変旋光の検出

と競合しながらポリマー構造中に取り込むことができた。マンノースに対する会合定数は 14  $M^{-1}$ 、 熱力学的な解析により会合自由エネルギー  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  の式に現れるエンタルピー項  $\Delta H$ とエントロピー項  $T\Delta S$  はそれぞれ -24, -17 kJ/mol と求められ(25 °C)、 $\Delta H$ <br/>ズ  $T\Delta S$ 、すなわち糖<br/>の認識が水素結合によるエンタルピーの利得に基づいていることが分かった。これは逆に言えば<br/>エントロピーの損失がポリマーの対称性と剛直性により抑えられたことを示している。

A5は取り込む糖のわずかな構造変化に対応してらせん型の向きを反転させることがある。グル コースのα体とβ体は、水中で互いに平衡の関係にある(変旋光)が、A5はOH基1個の立体の違 いを検出してらせんが巻く向きを変え(図5)、誘起CDの符号を反転させる。

A6では、A5の側鎖にさらにメチル基(CH<sub>3</sub>)を加えた。ここでメチル基の根元の炭素はキラル中 心となっているためポリマーA6自身が単独でキラリティを持ち、水系中で自発的にとるらせん構造

ではすでに右/左巻きが片寄っている。このこ とでらせん型のばらつきが減り、安定化や選 択性の発現につながった。特に、GPCで分画 した高分子量の成分 A6(long) は自分自身が 高次構造を持ち、さらに特徴的な糖認識を示 した。例えばS体のA6(S-long) は水/メタノー ル系中でマンノースのD体のみを識別してCD シグナルを現した(図6)。A6(S-long),





図6 **A6**はD-マンノースを検出したときのみ誘 起CDを現す。



A6(R-long) はともに、グリコーゲンやヒアルロン酸などの多糖類を認識してCDを大きく変化させる (図7)。このとき図8のように、らせんかららせんへの高次構造変化が起こっているのではないかと 考えている。特にA6のように人工分子が水中で糖鎖を検出したことは、有機ホストーゲスト化学で はかつて例のなかったことである。生体が営んでいる糖の分子認識の一端を人工的に再現したも のとして意義が高いものと考えている。

もうひとつの分子設計、3個、6個のフェノール性 ヒドロキシ基を配列させたホスト分子 B1, B2 は、 鈴木カップリングによりその骨格を合成できた。 それらはそれぞれ*C*<sub>3</sub>, *D*<sub>3</sub>,の対称性を持つ(図 9)。鍵となっているのは同じ方向(図の上方)を 向いた3個のヒドロキシ基で、協同的に作用して 糖と会合する。有機溶媒中、オクチルマンノシド とB1, B2の会合定数が 33000 M<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub>CI<sub>2</sub>中), 2210 M<sup>-1</sup> (CDCl<sub>3</sub> 中)と求められた。B1では中央 ベンゼン環上のメチル基により軸回転が妨げら れた結果ヒドロキシ基が上方に固定され、B2で は軸回転が起こったとしても必ず3個のヒドロキ シ基が上、下に向く構造となっている。B2はさら に滴定実験により、グルコサミン誘導体との間で 1:1, 1:2 の二段階の会合を行うことが分かった。 Monte-Carlo-MM計算により、1:2 錯体について 図10のような両面構造が導出された。





図10 **B2**とグルコサミン誘導体との1:2会 合図。上下がグルコサミン、中が**B2**。 (Monte-Carlo -MM法で導出)

5. 自己評価

人工的に構造を設計・合成した有機ホスト分子を用いて 100%水中で単糖を、さらに多糖を分子 認識することは本研究の最大の達成目標であった。そして研究成果の項目で述べたように、親水 性ポリマーを用いてその目標へたどりつけた。これは非常に大きな成果であり、生物の行う分子 認識作用に大きく近づけたものと自負している。熱力学的知見からホスト分子の低エントロピー的 な性質が分子認識に効果をもたらしたことが分かり、本研究で提案した分子設計の妥当性が示さ れた。さらに糖質の分子認識だけではなく、ホスト分子自身も水素結合により自己会合して分子 間高次構造を作る(A3, B1, B2)、あるいは疎水性相互作用により分子内二次構造を示す(A6)こ とは分子設計当初に予期していなかった新たな特性であった。人工ホスト分子による糖認識の機 構として会合・解離だけの単純な認識ではなく、高次構造同士のダイナミックな相互変化をともな う高度な認識作用の存在が明らかになったことは、構造化学的に興味深いだけではなく糖認識を 計測に適したシグナルに翻訳する点で有望であり、有機ホストーゲスト化学にさらなる奥行きと可 能性を加えたと考えている。

6. 研究総括の見解

分子認識に伴うエントロピー低下を抑制するユニークな設計理念による新しい人エホスト分子 と、それを利用した糖認識系を実現する研究である。ピリジンやフェノールのような極性化合物を 剛直な骨格状に配置した新たな糖認識のためのホストを各種合成し、この設計理念の実証に挑 戦した。主たる成果は次の2点である。

①ピリジンまたはフェノール誘導体をアセチレン結合で連ねた親油性および親水性各種ポリマー を合成し、塩化メチレン中また水中で糖のキラリティーまで識別できることを錯体の CD スペクトル 測定により示した。

②計算化学(Monte-Carlo 法)の結果と実験結果とから、ホスト分子の水素結合による自己会合、 疎水性相互作用による分子内二次構造の存在を明らかにした。糖認識にともない高次構造同士 のダイナミックな相互変化の存在も明らかとした。

これらの研究成果は4篇の原著論文、3件の学会招待講演にまとめられている。

これらの成果を通じて、「剛直かつ対称性の高い低エントロピー型分子認識アレイ」という研究 者のユニークな思想の正当性が実証されたことは高く評価できる。とくに水中で人エホスト分子に よる糖認識に成功したことは特筆すべきである。今回の研究で開発された糖認識システムの分析 計測への応用が示されることが強く望まれる。その結果、医療診断、環境、食品など幅広い分野 に対して安価で信頼性の高いセンシング技術が提供されることを期待する。

7. 主な論文等

# (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

• Hajime Abe, Yoshinobu Aoyagi, Masahiko Inouye, "A Rigid  $C_{3\nu}$ -Symmetrical Host for Saccharide Recognition: 1,3,5-Tris(2-hydroxyaryl)-2,4,6-trimethylbenzenes" *Organic Letters* **2005**, *7*, 59–61.

 Hajime Abe, Nozomi Masuda, Minoru Waki, Masahiko Inouye, "Regulation of Saccharide Binding with Basic Poly(ethynylpyridine)s by H<sup>+</sup>-Induced Helix Formation" *Journal of the American Chemical Society* 2005, *127*, 16189–16196.

 Minoru Waki, Hajime Abe, Masahiko Inouye, "Helix Formation in Synthetic Polymers by Hydrogen Bonding with Native Saccharides in Protic Media" *Chemistry-an European Journal* 2006, *12*, 7639–7647.

• Minoru Waki, Hajime Abe, Masahiko Inouye, "Translation of Mutarotation into Induced CD Signals Based on Helix Inversion of Host Polymers" *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 3059–3061. (2)特許出願 なし

(3)学会発表

# 口頭発表(国内)

・阿部 肇・脇 稔・井上将彦、"含水系におけるエチニルピリジンポリマーの糖認識"、第1回 ホスト・ゲスト化学シンポジウム、2006 年 5 月

・阿部 肇・脇 稔・井上将彦、"らせん構造により糖を取り込むポリピリジン分子の開発"、日本薬学会第127年会(シンポジウム講演)、2007年3月

・阿部 肇・村山大輔・栢森史浩・井上将彦、"糖テンプレートを連結させた人エポリマーの誘 起らせん構造"、第 37 回構造有機化学討論会、2007 年 10 月

#### ポスター発表(国際)

・阿部 肇・脇 稔・井上将彦、"Polypyridine Host Molecules for Binding Saccharides in Water by Helical Structures"、International Conference on Molecular Machines and Sensors (ICMMS' 07)、2007 年 5 月

・阿部 肇・町口博志・井上将彦、"Pyridine/Pyridone Co-oligomers Transformed by Saccharide Recognition from Duplex into Single Helix"、12th International Symposium on Novel Aromatic Compounds (ISNA-12)、2007 年 7 月

(4)招待講演

招待講演(国内)

・阿部肇・井上将彦、"糖質との水素結合によりらせんを形成する人エポリピリジン分子の開発"、分子研研究会「多様な水素結合系と量子効果」、2005年7月

・阿部肇、"単純な構造で分子認識・会合を行う人工分子の開発"、九州大学大学院理学研究院セミナー ~機能性物質の新潮流~、2006 年 3 月

・ 阿部 肇、"糖を認識するポリマーの開発"、とやまの未来を拓く科学技術交流会、2006年9 月

(B) その他の主な成果

なし

# 研究課題別評価書

1. 研究課題名

プローブ間の協同性を利用した高感度遺伝子解析法

2. 氏名

井原 敏博

3. 研究のねらい

核酸、タンパク、多糖等の生体高分子はそれ自身が天然の超分子である。多くの場合これらは 単独でなく、分子間の協調したはたらきによって高度な仕事を行っている。この精緻な分子システ ムの一部、すなわち生命の部品に化学的に少しだけ手を加えてやる(コンジュゲーション)と、生 体分子固有の高度な分子認識能と任意の人工機能を併せ持つ新たな分子を創成することができ、 さらにコンジュゲート分子間の協同性(アロステリズム)を利用することで結合制御、信号変換、物 質変換等の機能、さらには、分子マシン、制御されたナノ構造体等の多様な分子システムを作り 上げることができる。本研究では特に DNA コンジュゲート間の協同性に焦点を当て、これを積極 的に利用した新規プロービング技術の開発を行った。

4. 研究成果

繰り返し配列を探索するプローブ

遺伝子中には非常に多くの繰り返し領域が存在することがわかっており、トリプレットリピート病 に代表されるように、その多くは生物学的に重要な意味を持つ。分子間の協同性をより強く意識し てプローブを設計すると、このような繰返し配列に選択的に結合する分子をつくることができると 考えた。

[Ru(phen)<sub>2</sub>dppz]<sup>2+</sup>錯体は二本鎖特異的にインターカ レーションし、発光する"light switch"として良く知られ た分子である。繰返し配列(ヒトテロメア、 d(TTAGGG)<sub>n</sub>)の1ユニットに相補的なDNA末端にこれ を修飾する。このコンジュゲートのひとつがターゲット に結合すると、図1に示すように[Ru(phen)<sub>2</sub>dppz]<sup>2+</sup>錯 体部分が二本鎖構造を好むために、隣接するユニッ トへの第二の結合を誘導するはずである。

金属錯体部分の光学活性に基づいて、コンジュゲートをΛ、Δ体に分割した。種々の条件下、それぞれのコンジュゲートとd(TTAGGG)、およびd(TTAGGG)<sub>2</sub>との間に形成する二本鎖の融解実験を行い、コンジュゲートのハイブリダイゼーションにおける協同性ωを



図 1 Ru 錯体修飾 DNA プローブの繰り返し配列 への協同的結合 Δ体のみが高い協同性で繰り 返し配列に結合した。

算出した。その結果、 $\Delta$ 体については $\omega$  = 54、 $\Lambda$ 体は 1.6 という結果になった。このことは、最初の  $\Delta$ 体コンジュゲートがターゲットの繰返しユニットの一つに結合すると、その隣のサイトへの結合を 平衡定数にして約 50 倍に促進することを示している。すなわち、 $\Delta$ コンジュゲートはd(TTAGGG)<sub>n</sub> 配列を探索し、選択的にそこに集合する性質を持つことになる。 $\omega$ はコンジュゲート末端部分の塩 基配列に依存しており、[Ru(phen)<sub>2</sub>dppz]<sup>2+</sup>錯体の  $\Lambda$ 体、 $\Delta$ 体について観測された $\omega$ の非対称性は、 それぞれの錯体に関して知られている塩基配列特異性によって説明することができた。この結果 は、より強い協同性を示す配位子のロジカルな分子設計の指針となる。

DNA上での錯生成を利用した蛍光プローブ

核酸末端に金属配位基を導入したコンジュゲートは適当な金属イオン共存下でのみ金属を挟ん だ2量体を形成し、対応する結合サイトに協同的に結合することを既に示している。ここでは DNA (ターゲット)がテンプレートとなり、2つの配位子を接近させて特定金属イオンを収容する理想的 なミクロ環境を作ったと考えられる。このことは、用いる金属を希土類金属のような発光性のもの にするとそのままユニークな DNA プローブとなることを示している。すなわち、テンプレートがあっ て初めて錯体を形成するので、ターゲットが存在するときにしか光らない(B/F 分離不要の)均一 溶液で使用できるプローブである。

ターゲット上でこれら金属を2つのDNAコンジュゲートで挟むが、片方のコンジュゲート(キャプチ ャープローブ)末端には、DTPA(Diethylenetriaminepentaacetic acid)、EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)、IDA(Iminodiacetic acid)等の金属イオンを捕まえるコンプレキ サン型の配位子を、もう片方(アンテナプローブ)にはPhen(1,10-Phenanthrolin)、DPPZ (Dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine)、Terpy(2,2':6',2''-Terpyridine)等の芳香族性の非常に弱い配 位子を導入した。すなわち、全体として、前者が強く金属イオンを捕捉し、ターゲットをテンプレート として後者の増感剤(アンテナ分子)と隣り合わせに結合したタンデム二本鎖を形成することでタ ーゲットに結合したときのみ希土類金属イオンが発光する条件が整うというしくみである。測定の 結果、ターゲット中のミスマッチの有無により発光強度が20倍以上の劇的な変化をすることがわ かった。さらに興味深いことに、遺伝子混合物の同時検出(アレルタイピング)も可能であることも わかった。野生型と、変異型に相補的な2種のキャプチャープローブを準備して、それぞれ等量の

Tb<sup>3+</sup>、Eu<sup>3+</sup>と混合する。こ れら2種のキャプチャープ ローブ溶液と共通のアン テナプローブをターゲット と混合して計測した結果、 野生型ホモ接合体のサン プルでTb<sup>3+</sup>の緑色、変異 型ホモでEu<sup>3+</sup>の赤色、両 者の等量混合物、すなわ ちへテロ接合体サンプル では黄色の発光色を肉眼



図2 鋳型上での発光性希土類錯体の協同的形成を利用した多色アレル解析 (左図)検出原理の模式図 バイアレリックなサンプルに対しWTプローブはTb<sup>3+</sup>(緑) でMutプローブはEu<sup>3+</sup>(赤)でラベル化し、検出実験に供した。(右図)WT/WT、 Mut/Mut、WT/Mutサンプルはそれぞれのプローブで特異的にラベル化され、緑、 赤、黄で明るく発色した。

で観察することができた(図2)。

用いるのは共通の構造を持つコンジュゲートペア。それぞれのコンジュゲートペアと適当な金属 イオンと組み合わせて混ぜるだけで、任意の配列を異なる色でラベル化することができる。 DNAテンプレート上での光化学ライゲーション

酵素を使わずに核酸を化学的に連結する化学的ライゲーションには、"酵素反応に適した"反応 条件や基質にできる構造等の制約がなく、新しい遺伝子操作法、ナノ構造体の構築法等の観点 から盛んに研究が行われている。中でも光を駆動力とする光化学ライゲーションは、第三の試薬 の添加の必要がないこと、照射光の強度や波長により反応を容易に制御できる点が特長である が、研究例はたいへん少ない。

著者らは末端に光反応性基であるアントラセンを導入した DNA コンジュゲートを合成した。それ ぞれ逆末端にアントラセンを導入した 2 種のコンジュゲートはターゲットに結合した際にその互い のアントラセン部位が対峙(スタッキング)するように設計してある。複合体形成後、光を照射する と相補的な DNA が加えられたサンプルにおいてのみコンジュゲート同士が連結された二量化生 成物が生じた(図3上)。1、2、9位とアントラセンの置換位置によって反応性はかなり異なり、1、 2位置換体では反応は数分ときわめて速く進行する。また、[4π-4π]型の光架橋反応であるので 塩基とのクロスカップリングもない(図3下)。さらに、二本鎖を形成したそれぞれの鎖の末端同士、 三本鎖など、リガーゼが基質とできない構造においても高効率で反応することが確認できた。

熱安定性の差(1)と局所構造の乱れ(2)を利用する以下の2つの方法で SNP 検出の可能性を

検討した。すなわち、(1)ターゲットとの 間に形成する二本鎖構造の、ミスマッチ に基づく熱安定性の相対的な差を大きく するために、7塩基の短いコンジュゲート を用いた(コンジュゲートの on/off を利用 する)。competitor(コンジュゲートの相補 鎖)共存下、適当な温度条件を選ぶこと で SNP をデジタル的に識別できることが わかった。また、(2)15 塩基の長いコン ジュゲートを用いてミスマッチの有無に関 わらず二本鎖が充分に安定な条件下光 😵 照射を行った。ライゲーションの反応性 はミスマッチの位置、種類によって大きく 変化することがわかった。この手法にお いては二本鎖構造中の局所的な構造の 乱れを利用している。ミスマッチが反応 サイト(コンジュゲート末端、アントラセン 側)に近いときには、反応性を著しく低下 させることができた。



図3 アントラセン-DNA コンジュゲートの光化学ライゲーション 9位置換アントラセンに比べ、1、2位置換体の反応は非常に速 く、1分の光照射で一塩基置換を高いコントラストで見分けるこ とができる。

いずれも3分以下の光照射で SNP の識別が可能であり、従来の酵素反応に要する時間と比較 すると大幅な短縮である。後者の方法で、さらにシグナルのコントラストを上げることができれば、 厳密な温度設定が必要ないので DNA チップなどのように多様な塩基配列を一度に処理しなくて はならない系において非常に有効な検出手段となる。

### 5. 自己評価

本研究においては一つの系に対して複数のプローブを同時に使用し、単独系では実現できな い高度な分析原理の構築に向け主に以下の3つの系について検討を行った。

- 1. 繰り返し配列を探索するプローブ
- 2. DNA 上での錯生成を利用した蛍光プローブ
- 3. DNA テンプレート上での光化学ライゲーションを利用した核酸分析

1に関しては繰り返し配列に結合させるための分子設計の一般則を見いだすことができた。今 後は、これに従い、より高い協同性 ω をもつプローブの設計が可能になると考えられる。当初計 画では実際の分析系への応用までを行う予定であったが、そこに至ることはできなかった。70%程 度の達成率であった。

2に関してはプローブ同士を組み合わせて合計 12 種類のプローブペアの発光挙動を検討し、 Phen と EDTA を有する DNA プローブ同士の組合せが最も優れていることがわかった。時間分解 測定法により、錯体の寿命、検出感度等の基礎データを得ることができた。また、プレートリーダ ーを用いて、ほぼ同じ感度で迅速な検出が可能なことも示した。さらに、2種の希土類金属を同時 に使用すると、アレル解析等の同時多色アッセイが可能であることを示した。この系に関しては目 標をほぼ達成することができた。

3に関してはプロトタイプのコンジュゲートを改良し、反応効率を飛躍的に向上させることに成功 した。わずか数分の光照射により 95%を超える反応収率が得られた。最適条件を選ぶことで約1 分の反応でミスマッチをほぼ1/0のコントラストで見分けることが可能であり、リガーゼを用いる従 来法と比較すると大幅な時間短縮を可能にした。目標はほぼ達成された。

6. 研究総括の見解

機能性分子を修飾した DNA プローブが相補鎖とのハイブリダイゼーションにおいて示す強い協同性を利用して標的遺伝子のラベル化を狙う。すなわち複数の機能性 DNA プローブが協調して 働くと、単一のプローブでは見られなかった種々の高度な機能を発揮する現象を究明して、その 応用展開を意図する課題である。主たる研究成果は次の3点である。

①遺伝子中の繰り返し配列を選択的に検索するプローブ設計の一般則を見いだした。

②DNA 上での希土類金属イオンの錯形成を利用した蛍光プローブにより多色アレル解析に成功 した。

③アントラセンを導入したコンジュゲートにより高効率な光化学ライゲーション法を開発した。

複数のプローブ間の協同性を利用したいくつかの新しい遺伝子解析法に成功している。化学的 アプローチを進めてプローブの選択性を着実に発展させている点は高く評価できる。

研究成果は9篇の原著論文、13件の学会招待講演にまとめられている。

希土類錯体の特徴をうまく活かした遺伝子混合物の同時検出、あるいは DNA テンプレート上で の光化学ライゲーションなど将来の SNP 解析に繋がる基礎研究として実用的価値も大きい。今後 は、応用ポイントを絞った高効率化、高選択性などの実用レベルの課題解決を図る研究に進展す ることも強く期待される。また、核酸の特性を利用して、各種機能を持った分子を特異的に反応さ せ、新しい計測分析法を創成することを期待したい。

### 7. 主な論文等

# (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

# 論文(国際)

• Yusuke Kitamura, Toshihiro Ihara, Kenji Okada, Yusuke Tsujimura, Yoshinori Shirasaka, Masato Tazaki, Akinori Jyo, "Asymmetric cooperativity in tandem hybridization of enantiomeric metal complex-tethered short fluorescent DNA probes", Chemical Communications, 2005, 4523–4525

• Yusuke Kitamura, Toshihiro Ihara, Yusuke Tsujimura, Masato Tazaki, Akinori Jyo, "DNA-templated cooperative formation of the luminous lanthanide complex and its analytical application to gene detection", Chemistry Letters, 34, 1606–1607 (2005)

 Toshihiro Ihara, Takashi Ikegami, Tomohiro Fujii, Yusuke Kitamura, Shinji Sueda, Makoto Takagi, and Akinori Jyo, "Metal ion-directed cooperative DNA binding of small molecules", Journal of Inorganic Biochemistry, 100, 1744-1754 (2006)

 Yusuke Kitamura, Toshihiro Ihara, Yusuke Tsujimura, Yuka Osawa, Masato Tazaki, and Akinori Jyo, "Colorimetric allele typing through cooperative binding of DNA probes carrying a metal chelator for luminescent lanthanide ions", Analytical Biochemistry, 359, 259–261 (2006)
 Pelin Arslan, Toshihiro Ihara, Motoko Mukae, and Akinori Jyo, "The effect of local structural disruption on the yield of photochemical ligation between anthracene-oligonucleotide conjugates", Analytical Sciences, 24, 173–176 (2008)

(2)特許出願 なし

# (3)学会発表

# 口頭発表(国際)

• Toshihiro Ihara, Motoko Mukae, Miyuki Tabara, Yusuke Kitamura, Akinori Jyo, "Photochemical ligation between anthracene-DNA conjugates and its application to gene analysis", 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2005 • Toshihiro Ihara, Yusuke Kitamura, Yusuke Tsujimura, Akinori Jyo, "Cooperative tandem duplex formation and its application to DNA probing", Pacifichem 2005, 2005

• Toshihiro Ihara, Yusuke Kitamura, Akinori Jyo, "Colorimetric SNP genotyping using cooperative formation of lanthanide complexes with split DNA probes", 13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC XIII), 2007

# 口頭発表(国内)

・井原敏博、北村裕介、田崎正人、城 昭典、"光学活性金属錯体-DNA コンジュゲートのタンデム二本鎖形成における非対称な協同性"、第 20 回生体機能関連化学シンポジウム、2005

・井原敏博、迎文都子、Arslan, Pelin、城 昭典、"DNA コンジュゲートの光反応性に関する基礎研究および核酸分析ツールとしての応用"、第17回バイオ・高分子シンポジウム、2007

(4)招待講演

招待講演(国際)

 Toshihiro Ihara, "Cooperative DNA probing using DNA conjugates", New Waves in Supramolecular Chemistry and Superstructured Materials. 3rd International Forum, 2006 招待講演(国内)

・井原敏博、"DNA コンジュゲートの協同的ハイブリダイゼーションおよびその分析化学的応用"、第 26 回日本化学会九州支部シンポジウム、2006

・井原敏博、"プローブ間の協同性を利用した核酸の認識・分析"、第18回生体機能関連化 学若手の会サマースクール、2006

・井原敏博、"プローブの協同性を利用して核酸を認識し分析する"、日本分析化学会九州 支部創立 50 周年記念講演会、2006

・井原敏博、北村裕介、迎文都子、城 昭典、"化学修飾オリゴヌクレオチドを用いる協同的 DNA プロービング"、日本薬学会第 127 年会、2007

# (B) その他の主な成果

なし

# 研究課題別評価書

1. 研究課題名

二量体検出原理による新規免疫測定法の開発

2. 氏名

上田 宏

3. 研究のねらい

抗体を用いた特異的高感度分析法である免疫測定法は、その汎用性の高さから臨床診断をは じめ様々な分野で活用されている。従来免疫測定法は、その測定ターゲット(抗原)の分子量によ って(i)分子量 1000 以上の高分子抗原を二種類の抗体で抗原をサンドイッチして測定するサンドイ ッチ法,および(ii)分子量 1000 以下の低分子を標識(あるいは固相)抗原との競合反応を利用して 測定する競合法が使い分けられてきた。しかし、(i)では測定ステップが多く低分子が測定できない、 (ii)では測定可能な濃度範囲が狭く高感度を得るための条件設定が困難、といった欠点があった。 これらの欠点を潜在的に解決しうる新規免疫測定法として、さきがけ研究以前に私は遺伝子工学 的に抗体のH鎖L鎖それぞれの可変領域Fv(抗原結合部位V<sub>H</sub>/V<sub>1</sub>)を分離し,それらの抗原依存 的な再会合から抗原濃度を測定する「オープンサンドイッチ法(OS法)」を考案した(図1, Ref. 1)。 OS法は原理的に低分子でも非競合的に、 一回の反応洗浄サイクルのみで測定できる大きなメリ ットを有している。しかし同時にその一般性がまだ十分明らかではなく、特にタンパク質抗原に対 しては使える抗体が限られるとの見方があった。そこでさきがけ研究において、(a) OS法の一般性 を明らかにするため, 様々な抗体を用いて特に低分子の検出を試み, OS法が実用的な測定法た りうるかを評価した。また(b)免疫マウス由来の抗体ライブラリを作製し、ここからOS法による抗原 (低分子および高分子)検出に適した可変領域断片(V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>)あるいは非天然可変領域ペア(V<sub>H</sub>/V<sub>H</sub> など)を選択することで, よりバックグラウンド値の少ない高精度な測定系を構築できないか検討し た。またこの過程で、将来これをもとに抗体ライブラリを作製できるよう、OS法に適した可変領域 のフレームワークを得ることも目的とした。



図1 抗体構造とオープンサンドイッチ法の原理。可変領域の抗原結合による安定化を利用する。

138

### 4. 研究成果

# (i) OS法による低分子化合物の検出

まず低分子の非競合検出が可能、というOS法の第一の特長を生かすべく、数種の新規低分子 測定系の構築と評価を行った。例えば内分泌撹乱作用のあるカビ毒ゼアラレノン(FW:318)につい て、我々が開発した抗原による選択とOS-ELISAの両者が可能なファージ提示系Split Fvシステム (図 2, Ref. 2)を用いて抗体産生細胞から抗体可変領域遺伝子のクローニングを行った。これを用 いて通常の競合ELISAとOS-ELISAをファージ提示した抗体断片を用いて行ったところ、それぞれ 3-30 ng/ml, 0.3-1000 ng/mlの測定レンジが得られ、OS-ELISAは各国の規制値(30-1000 ng/ml) を一回でカバーできる広い測定レンジと高い感度を持つことがわかった(Ref. 3)。また同様の結果 を大腸菌で発現精製したマルトース結合タンパク(MBP)融合VLおよび大腸菌アルカリフォスファタ ーゼ(PhoA)融合V<sub>H</sub>を用いて再現することもでき、測定をMBP-VLの固相への直接固定とブロッキ ング、サンプルおよびV<sub>H</sub>-PhoAとの同時反応、最後に酵素反応という非常に簡便なプロトコルで 実施可能なことも明らかとなった。

同様に、副腎機能マーカーである 11-deoxycortisol (11DC, FW:346)の測定においても競合 ELISAよりも優れた感度と測定レンジが得られた。当初、野生型配列のV<sub>H</sub>断片を用いたファージ OS-ELISAで抗原濃度Oの測定値がやや高いという問題が見受けられたが、我々がV<sub>H</sub>断片中で V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> 相互作用に重要な残基として同定した(Ref. 4) Gln39 に変異を導入することで、応答性を向 上させることにも成功した。さらに、血清中に高濃度に存在するCortisolに対する選択性が、競合 法における交差反応(0.2%)と同程度に保たれることも明らかとなった。

この他, ネオニコチノイド系農薬等, 多くの分子量 300 程度の低分子化合物の測定に成功した。こ の理由として, 一般に低分子認識抗体はV<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>界面のくぼみで抗原を認識するため, 抗原結合に より安定化されるFvの割合が多い可能性がある。また競合法より感度が向上する理由としては, OS法が非競合系であって K<sub>d</sub>値による検出限界の制限がない利点が, 可変領域を分割して用い ることによるエントロピー的な不利を補って余りあるためと考えられる。



図2 Split Fv システムに用いるファージ提示用ベクターの構造(一部)と可能な ELISA。

# (ii) OS法によるペプチドの非競合検出とマイクロ化

さらに非競合測定のメリットが生かせる低分子と して、ペプチドの測定を試みた。骨代謝マーカーで あるオステオカルシン(別名BGP)の部分ペプチドを モデルに、抗体産生細胞からそのC末端7残基の ペプチド(BGP-C7, MW:894)を認識し高い結合能を もつV<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>を取得した。これを用いたOS-ELISAの 結果、予想通り競合法より優れた感度、測定濃度 域、更に応答レンジが得られた(図3, Ref. 5)。また 得られた測定濃度域は臨床検査に必要な濃度域を 十分カバーした。C末残基が認識に必須なこと、お よびブタBGPの立体構造から考え、BGP-C7はハプ テン様の構造をとりV<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>界面で特異的に認識さ れている可能性がある。将来同様の末端ペプチド 認識抗体を作製することで多くのペプチドあるいは タンパクについてOS-ELISAが実施できるかもしれない。



また,診断におけるOS-ELISAの有用性の更なる向上を目指し,この系を用いてマイクロ流路を 用いた微量高速測定系の構築を試みた(北森アドバイザーとの共同研究)。MBP- V<sub>L</sub>固定化ポリ スチレンビーズを流路に充填,ブロッキングの後サンプルとペルオキシダーゼ標識MBP-V<sub>H</sub>計 5 μ Iを導入し,洗浄後に基質と反応させ熱レンズ顕微鏡で検出した。結果,計 13 分程度でマイクロプ レート系とほぼ同等の検量線が得られた。さらにアルブミン除去のための簡単な前処理を行うこと で,血清中のペプチド濃度も同条件で測定できた。興味深いことに血清中では全長BGPの濃度に 比べBGP-C7 濃度測定値が顕著に高いことも判明した。BGPは血中で分解されやすいことから, 今後BGP-C7 が新たな診断マーカーとなりうる可能性もある。

### (iii)免疫ライブラリを用いた新規測定系の構築

既存の抗体由来でない,新規な抗体断片を用いたOS-ELISA測定系構築を目指し,抗原免疫マ ウスより10<sup>6</sup>サイズの一本鎖抗体提示ファージライブラリを作製した。抗原としてはタンパク質とし てニワトリリゾチーム(HEL),および低分子としてフルオレセイン(FL)を修飾したKLHを用いた。常法 に基づき固定化抗原(HELあるいはFL-BSA)を用いた選択により特異的結合ファージを濃縮したと ころ、3ラウンド以内の選択で抗原に特異的に結合するクローン多数を得ることができた。これら の遺伝子を用いて各2種類のOS-ファージELISA系を構築したところ,HEL認識抗体では両者で抗 原濃度依存的な信号増加を観測し、うち1つのクローンで極めて低いバックグラウンドと1 ng/ml からの良好な応答性を得ることができた。すなわちタンパク質認識抗体でもOS-ELISAに適した V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> ペアが予想以上に存在することが示唆された(図4)。

またライブラリ構築の際,通常のV<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>型一本鎖抗体提示ファージと同時にV<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>型提示のもの も作製したが,後者をFL-BSAにより選択した結果,予想に反しV<sub>H</sub>単独で強くFL(分子量 353)と結 合するクローンが得られた。このV<sub>H</sub>部分をMBP融合タンパクとして発現させ、BiacoreでFL-BSAに 対する平衡解離定数を評価したところK<sub>d</sub> = 25 nMと算出された。単量体でハプテンに結合する珍し いV<sub>H</sub>ドメインが得られたものと考えられる。同様の選択でV<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>ペアについては所期のクローンが 多数得られているので、これは天然に存在しないV<sub>H</sub>/V<sub>H</sub>ダイマーの選択が困難な結果の可能性も ある。



図4 免疫マウス由来ライブラリから得られたクローンを用いた OS-ELISA の結果 LxE は HEL 認識, LF は FL 認識クローンを示す。

# <u>まとめ</u>

今回, 自身の開発したオープンサンドイッチ法の低分子検出における汎用性と優位性を, 既存 の各種低分子認識抗体との比較をもとに確認できた。またペプチド認識抗体を用いた初の OS-ELISA の実施と, そのマイクロ迅速診断への応用も行うことができた。さらに, 免疫マウス由 来ライブラリから OS-ELISA に至適な性質を持つ抗体可変領域を選択することにも成功した。また 詳細は省略するが, オープンサンドイッチ原理を DNA 結合タンパク質に応用し, 生理的条件での 特異的二本鎖 DNA 配列の二量体形成原理による高感度検出にも成功した(Ref. 6)。

# <u>参考文献</u>

- 1. H. Ueda et al., *Nat. Biotechnol.*, **12**, 1714 (1996).
- 2. T. Aburatani, H. Ueda, et al., Anal., Chem., 75, 4057 (2003)
- 3. T. Suzuki, Y. Munakata, K. Morita, T. Shinoda & H. Ueda, Anal. Sci., 23, 65 (2007).
- 4. K. Masuda, H. Ueda et al., FEBS J., 273, 2184 (2006).
- 5. S.-L. Lim, H. Ichinose, T. Shinoda & H. Ueda, Anal. Chem., 79, 6193 (2007).
- 6. K. Yoshitake, S. Waki, & H. Ueda, Biosens. Bioelectron., 23,1266-1271 (2008)

5. 自己評価

目標のうち、(a) OS法の一般性を明らかにするため、様々な抗体を用いて特に低分子の検出を 試み、OS法が実用的な測定法たりうるかを評価する、に関してはペプチドを含む多数の低分子に ついて予想以上の結果を出すことができ、目標を達成することができたと考えている。また予定外 の成果として、共同研究によりマイクロ流路を用いた微量迅速測定への応用も行うことができた。 また(b)免疫マウス由来の抗体ライブラリを作製し、ここからOS法による抗原(低分子および高分 子)検出に適した可変領域断片(V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>)あるいは非天然可変領域ペア(V<sub>H</sub>/V<sub>H</sub>など)を選択すること で、よりバックグラウンド値の少ない高精度な測定系を構築できないか検討する、に関しては主た る目標であったV<sub>H</sub>二量体によるOS-ELISAには成功しなかったものの、特にHEL免疫マウス由来 ライブラリからOS-ELISAに最適な性質を持つ可変領域ペアを単離することができた。OS法に適し た可変領域のフレームワークを得ることも目的の1つであったので、目標の半分は達成できたの ではと考えている。

また当初の目的としてはあげていなかったが DNA 結合タンパク質の二量体形成を用いた特異 的二本鎖 DNA 配列の検出,トランススプライシングを用いた抗体酵素融合タンパクの発現,新規 抗体酵素融合タンパクによる高感度な低分子抗原濃度測定法の開発にも成功した。特に最後の 研究成果については JST による特許出願も行うことができたのでここに付記し感謝したい。

6. 研究総括の見解

自ら考案した非競合的免疫測定法である「オープンサンドイッチ法」を発展させ、小分子からタンパク質までを、1回の反応洗浄サイクルのみで検出可能とする測定法の開発である。測定操作の簡易化や測定時間の短縮などを行い、広い測定濃度域に対して高感度な特性を持つ生体関 連物質定量法の完成を狙う。主たる成果は次の3点である。

①分子量 300 程度であるカビ毒などの数種の化合物を対象に OS 法による高感度定量に成功した。

②ペプチドを認識し高い結合能を示すV<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>を取得し、OS-ELISAも実証した。これをマイクロチップに応用して血清のペプチド濃度の測定にも成功した。

③タンパク質およびハプテン免疫マウスから、ファージ提示法により多数の特異的可変領域の単 離に成功した。

着実な要素技術の積み上げにより低分子を中心に種々の生体関連物質を幅広い濃度範囲で 高感度に検出できる可能性を実証した。また、オープンサンドイッチ法により ELIZA のハイスルー プット化を前進させた。これらの成果を通じてオープンサンドイッチ法の一般性を実証し、応用範 囲を拡大に貢献したことは高く評価できる。

研究成果は8篇の原著論文、4件の学会招待講演にまとめられている。また、この研究成果に 基づく特許5件を出願している。

OS法の完成に向けて幅広い視点と手法を駆使して取り組む努力は賞賛に値する。抗体から可 変領域を単離した場合に抗原分子認識に及ぼす効果など解明すべき課題もある。さらなる幅広 い取り組みにより、この方法が生体物質や環境汚染物質の検出などの基盤技術として発展する ことを強く期待する。

# 7. 主な論文等

# (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

# 論文(国際)

 Kenji Masuda, Kenzo Sakamoto, Miki Kojima, Takahide Aburatani, Takuya Ueda and <u>Hiroshi</u> <u>Ueda</u>, "The role of interface framework residues in determining antibody VH/VL interaction strength and antigen binding affinity", FEBS J. 273 (2006) 2184–2194

Yoshiyuki Sasajima, Takahide Aburatani, Kenzo Sakamoto and <u>Hiroshi Ueda</u>, "Detection of protein tyrosine phosphorylation by Open Sandwich fluoroimmunoassay.", Biotechnol. Prog. 22, 968–973 (2006)

• Shean-Lee Lim, Hiroko Ichinose, Tatsuya Shinoda, and <u>Hiroshi Ueda</u>, "Noncompetitive detection of low molecular weight peptides by open sandwich immunoassay", Anal. Chem. 79 (16), 6193-6200 (2007)

 Kazutoshi Yoshitake, Shoko Waki and <u>Hiroshi Ueda</u>, "Dimerization-based homogeneous fluorosensor proteins for the detection of specific dsDNA", Biosens. Bioelectron. 23, 1266-1271 (2008)

### 論文(国内)

 Tatsuya Suzuki, Yuriko Munakata, Kazuki Morita, Tatsuya Shinoda, and <u>Hiroshi Ueda</u>, "Sensitive detection of estrogenic mycotoxin zearalenone by open sandwich immunoassay", Anal. Sci., 23(1), 65-70, 2007

# (2)特許出願

発明 者:上田 宏、小嶋美樹

発明の名称:抗原濃度測定法

- 出 願 人:科学技術振興機構
- 出 願 日:2007.8.1(未公開)
- 出 願 番 号: 特願 2007-187324
  - その他 国内特許 1件(未公開) 外国特許 1件(未公開)
- (3)著書

・上田 宏、"オープンサンドイッチイムノアッセイによる非競合的な低分子分析"、臨床化学 36(2), 116-124、2007

(4)学会発表

#### 口頭発表(国内)

・(学)呉 雨書・(KAST) 高橋 寛子・佐藤 香枝・志村 清仁・北森 武彦・(正)上田 宏、"マイ クロ流路を用いた骨代謝マーカーオステオカルシンペプチドの非競合高速度検出"、化学工 学会第 72 年会、2007

・小嶋 美樹・岩井 宏徒・伊原正喜・上田 宏、"抗体酵素融合タンパクを用いた,環境汚染物質指示菌の創製"、日本生物工学会 2007 年大会、2007

#### ポスター発表(国際)

 Hiroshi Ueda, Kazutoshi Yoshitake, Ryohei Iwasaki, Shoko Waki, "Dimerization-based homogeneous fluorosensor proteins for the detection of specific dsDNA", 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006

### ポスター発表(国内)

・岩崎 亮平,田辺 明人,上田 宏、"mRNA トランススプライシングを利用した抗体融合タン パク質作製"、日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006

・伊原 正喜, 黒田 翔, 吉田 将志, 上田 宏、"免疫ライブラリ由来抗体断片を用いたオー プンサンドイッチ免疫測定"、第 30回日本分子生物学会年会, 第 80回日本生化学会大会合 同大会、2007

(5)招待講演

### 招待講演(国際)

 Hiroshi Ueda, "Open Sandwich immunoassay as a general detection principle for low-molecular weight antigens", Antibody Engineering International Meeting (A satellite meeting of 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology), 2006
 Hiroshi Ueda, "Open sandwich ELISA for sensitive detection of various biomolecules", Antibody Engineering Asia (Singapore), 2008

### 招待講演(国内)

・上田 宏、"オープンサンドイッチ免疫測定法による低分子の高感度非競合的測定"、日本 薬学会第 126 年会、2006

・上田 宏, "オープンサンドイッチ原理による各種生体関連分子の非競合検出とその応用", 高分子学会 バイオ・高分子研究会, 2006

# (B) その他の主な成果

- (1)論文(原著論文)発表 なし
- (2)特許出願

国内特許 2件(未公開)

### 研究課題別評価書

1. 研究課題名

細胞生命現象解明に向けた高次光機能性分子の精密設計

### 2. 氏名

浦野 泰照

#### 3. 研究のねらい

生命現象の包括的な理解を目指す上で、生きている状態の生物試料で起きている様々な事象 を、リアルタイムかつ高感度に観測することは極めて重要である。このような観測を実現する手法 として、蛍光プローブ、蛍光顕微鏡を用いる手法が近年汎用され、優れた成果が多く挙げられて いる。しかし、生きている生物試料に適用可能な光機能性分子の種類はまだ極めて少なく、ごく限 られた検出対象分子の検出等しか出来ないのが現状である。ここで私は、自身のこれまでの研究 成果による「蛍光プローブの精密設計法」をさらに拡充し、それらを最大限に駆使することで、これ までは実現不可能であった高度な生命機能解析を可能とする、高次光機能性分子を創製するこ とを柱とする本さきがけ研究を開始した。すなわち本研究では、励起状態にあるプローブ分子の 緩和過程を、論理的かつ精密に制御することで、革新的な生体機能解析システムを多数構築す ることを狙いとした。

4. 研究成果

(1)可視光励起で機能する光機能性分子の論理的精密設計法の確立

本さきがけ研究において私はまず、蛍光プローブに代表される光機能性分子の論理的精密手 法の確立を目指した。蛍光プローブとは、検出対象分子と反応・結合することでその蛍光特性が 大きく変化する分子であるが、任意の有機化合物の蛍光特性を予想することは難しく、従来の蛍 光プローブ開発は、試行錯誤に頼る以外方法がなかった。ここで私は、光誘起電子移動 (Photoinduced electron transfer; PeT)過程による消光は、実用性の高い可視光励起蛍光団にも 十分適用可能であることを見いだし、蛍光団とはπ電子的に独立した蛍光制御部位の HOMO、 LUMO エネルギーレベルを制御することで、蛍光団の蛍光を論理的に消光させる手法を独自に考 案した。この PeT に基づく手法の確立により、経験則に頼ることなく論理的に蛍光プローブを設計 することが可能となった。また PeT の観点から古典的なフルオレセイン骨格を大胆に見直すことで、 蛍光プローブ母核として極めて有用な新規蛍光団 TokyoGreen(TG)類を創製することに成功し(図 1上)、この骨格の蛍光特性を活用することで、全く新たな蛍光プローブ群の創製を可能とする設 計法の確立にも成功した。さらにごく最近、TG 類のある特定の誘導体では、従来知られていなか った分子内環化による吸収波長の大きな変化を引き出すことが可能であることも見いだし、さらに 幅広い蛍光プローブ設計が可能となった。



図1 左上:光誘起電子移動の観点からフルオレセイン骨格を改変することで誕生した新規蛍光団TokyoGreen(TG)類 左下:TG 類の蛍光特性を活用することで全く新しい蛍光ブローブの論理的設計法を確立し、生細胞系への適用が可能な世界初の&-ガラクトシ ダーゼ活性検出蛍光ブローブTG-&Galの開発に成功した。右:同設計法を活用し、極めて少ない紫外線照射光量によって、最大 限の蛍光活性化を実現する新規Caged蛍光色素(Caged TG類)の開発に成功した。TG-NPEを負荷した細胞では、市販されている同 目的のCaged蛍光色素に比べて少ない照射光量で、高効率に単ー生細胞の蛍光染色が可能であった。

(2)確立した設計法に基づく、各種新規光機能性分子類の精密設計・開発

上述の PeT、分子内環化に基づく設計法に則り、15 種類を超える全く新たな観測を実現する蛍 光プローブの開発に成功した。以下具体的にいくつか紹介する。フルオレセインは、そのキサンテ ン環部位がアニオンである場合と、電荷がない場合で還元電位が大きく変わるため、適切な電子 ドナー部位を有する TGを開発することで、加水分解酵素に対する蛍光プローブの設計が可能と なる。この原理を活用し、図1左下に示した $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブ TG- $\beta$  Gal の開発に成功した。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ(遺伝子名 lacZ)は、生物学研究領域で最も汎用されて いるレポーター酵素の1つであるが、従来この活性を生細胞系で検出するプローブは開発されて おらず、専ら細胞を固定した後比色性試薬による染色によってその検出が行われてきた。私が開 発することに成功した TG- $\beta$  Gal プローブは生細胞での検出が可能であり、かつ従来のプローブ に比べて極めて高感度に $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を検出可能であるなど優れた特長を有するこ とから、今後の lacZ 解析のスタンダードとなることが大いに期待される。実際本プローブは 2006 年から市販され、現在では多くの研究者に使用されるようになっている。

上記の設計原理の適用範囲は極めて広く、例えば TG-β Gal のガラクトース部位を光感受性保 護基であるニトロベンジル基に変換することで、高感度 Caged 蛍光色素として機能する TG-NPE が開発された(図1右上)。本プローブ自身はほぼ無蛍光であるが、350 nm の光を照射することで 光解除性保護基が外れ、高蛍光性の TG が生成し、劇的な蛍光強度の上昇が起こることが明ら かとなった。また TG-NPE は生細胞へ容易に導入可能であり、ここに 10 秒程度の短い解除光を、 照射部位を限局して照射することで、単一細胞の明確な追跡が可能であることも確かめられた (図1右下)。従来の Caged 蛍光色素は光感受性保護基を1分子内に 2 つ有していたため、蛍光 上昇を実現するためには高い照射光量が必要であり、生細胞に対する傷害が問題となっていた が、TG-NPE はこの問題を解決し、高効率に細胞、タンパク質などのラベル化が可能であり、極め て実用性の高い Caged 蛍光色素である。

次にニトロ化ストレス検出蛍光プローブの開発事例を紹介する。パーオキシナイトライトによる グアニンのニトロ化などを引き起こす生体ニトロ化ストレスは、最近新たな病態要因として注目さ れており、またごく最近では、新しい生体分子修飾モードの初発反応としての重要性が指摘される など、生物・医学領域で大きな注目を集めているが、このニトロ化ストレスを特異的に検知するプ ローブはこれまで開発例がなかった。ここで私は、従来特殊な消光団として考えられてきたニトロ 基であるが、実はその消光は強い電子吸引性に由来する PeT によるものであることを物理化学 的に明らかにし、さらにその知見に基づきニトロ化されることで初めて蛍光を発する蛍光プローブ NiSPY 類の開発に成功した(図2)。本プローブは私がこれまでに確立してきた Pe T に基づく蛍光 特性制御技術を駆使することで初めて誕生したものであり、極めて高選択的に生細胞内のニトロ 化ストレスを検知することが可能である。本プローブもまもなく市販されることになっている。

最後に図3上に、分子内環化による吸光特性の変化を原理とする、次亜塩素酸イオン検出蛍 光プローブの開発例を示した。本プローブ(HySOx)は、活性酸素種の中でも次亜塩素酸を高選択 的に検出可能であり、またローダミンを蛍光骨格とするため光褪色に強く、連続観測実験に適用 可能であるという特長を有するプローブであることも明らかとなった。



図2 分子内光誘起電子移動過程を精密に制御することで、 全く新しいニトロ化ストレス検出蛍光プローブNiSPY類の開 発に成功した。本プローブはニトロ化されることで飛躍的に 蛍光強度が増大するため、パーオキシナイトライトの極めて 高感度な検出が可能となった。



図3 全く新たな分子内開環・閉環による蛍光制御が可能 な新規ローダミン骨格の構築に成功し、これを活用して極 めて選択性の高い次亜塩素酸検出蛍光プロープHySOxの 開発に成功した。またHySOxを用いることで、好中球貪 食時に貪食胞内で生成する次亜塩素酸をリアルタイムに可 視化することに初めて成功した。



図4 がん部位を認識して初めて蛍光を発するプローブを開発し、これを用いて高感度・高選択的ながんイメージングの実現に成功した。 具体的には、がん細胞特異的な酵素活性ターゲティング手法と、新た に開発した細胞内滞留性の高い $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性検出プロー ブを組み合わせることで、がんモデルマウス腹腔内のmm以下の微小 がん部位を高選択的、高感度に検出・可視化することに成功した。

(3)開発に成功した蛍光プローブの活用による、全く新たな細胞現象イメージング・超早期微 小がんイメージングの実現

開発に成功したプローブを活用することで、従来法で実現できなかった細胞現象の可視化、ある いは従来技術では検出不可能であった超早期がんのイメージングに成功した。まず上述の HySOx プローブを用い、ブタ好中球の貪食時における次亜塩素酸生成のリアルタイム可視化に 成功した(図3下)。すなわち好中球は、異物を貪食したファゴソーム内にのみ選択的に次亜塩素 酸を発生させ、異物消化につなげている様を可視化することに成功した。

次に、上述した TG-β Gal の細胞内滞留性を向上させた新規β-ガラクトシダーゼ蛍光プローブ を開発し、これを活用した微小がんイメージングを試みた。がん細胞表面レクチンを活用して、が ん細胞にのみβ-ガラクトシダーゼ活性をまず付与し、その後蛍光プローブを投与するという2ス テップ法を用い、腹腔がんモデルマウス中のがん細胞のみを光らせることに成功した(図4)。本 手法に用いたプローブ自身はほぼ無蛍光であり、かつがん細胞膜上でのみ強蛍光性物質を生成 するため、極めて高選択的ながん検出が可能であり、実際本手法は、0.1 mm サイズの超早期が んを検出・診断可能な画期的な方法であることが明らかとなった。

5. 自己評価

光励起エネルギーを吸収して生成する一重項・三重項励起状態の分子の緩和過程を、光誘起 電子移動(PeT)を活用して精密に制御することで、様々な生命現象を可視化し、生命機能要因解 析などを画期的に進展させる分子ツールを開発することが、私のさきがけ研究のテーマである。3 年半の研究期間で、PeT に基づく励起状態寿命、経路の制御法を数多く確立し、これに基づき TokyoGreen 骨格など新規蛍光骨格を見いだすことにも成功し、その結果、極めて広範な検出対 象に対する蛍光プローブを数多く開発することに成功した。開発したプローブは全て、生きている 生物試料に直接適用可能なものばかりであり、生物学領域研究にすぐに活用できる実用性を持 っている。実際4種類のプローブについては既に市販され、多くの研究者が使うところとなっている。 さらに研究開始当初は予定していなかったが、蛍光シグナルの劇的な ON/OFF を活用し、動物個 体の微小がん部位を高選択的に検出可能なプローブ・技法を複数開発することにも成功した。本 成果はがん研究領域に大きなインパクトを与えており、最近、がん関連の多くの学会で招待講演 を依頼されるようになった。三重項励起状態の制御についての成果については紙面の都合で省 略したが、これについても多くの画期的な成果を上げることが出来、全く新たな光増感ツール、蛍 光ツールの開発に成功した。以上の成果は、私が研究開始当初考えていた3年半後の到達点を はるかに超えるものであり、高い自己評価を与えて良いと考えているが、これらの成果は、本さき がけ領域のアドバイザーの先生方、さきがけ研究者仲間との数多くの共同研究、議論によるとこ ろが大きく、この様な研究機会を与えていただいた寺部総括をはじめとするアドバイザーの先生 方に深く感謝いたします。

6. 研究総括の見解

生体内反応を可視化するために目的に応じて発光する蛍光プローブの精密設計法を確立した。
その方法に基づいて各種優れた蛍光プローブを開発し、その有用性を多くの例で実証している。 主たる成果は次の3点である。

①光誘起電子移動過程による消光に基づいて、広い応用範囲を有する蛍光プローブ母核となる 蛍光団 TokyoGreen(TG)類の開発に成功した。

②この手法を用いて 15 種類を超える有用な蛍光プローブを開発し、設計理論の汎用性を実証した。

③さらに、この蛍光プローブ設計法を早期がんのイメージングに展開し、がん細胞のみで強い蛍 光性を示すプローブを実現した。

オリジナルな発想に基づく極めて優れた成果である。学術的に独立性が高く、しかも波及効果 が大きいという点で高く評価したい。蛍光プローブの幾つかが実際に市販されるに到っていること も特筆に価する。

研究成果は27篇の原著論文、30件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づ く特許4件を出願している。また平成17年には、「第16回加藤記念バイオサイエンス研究助成」、 平成18年度には、「文部科学大臣表彰若手科学者賞」、「Invitrogen-Nature Biotechnology Award 2006」を受賞している。

今後、フルオレセイン以外の色素分子への一般化など、様々な化学的・物理的性質のプローブ として発展することを強く期待する。本研究で確立した方法論のさらなる発展は、将来バイオ・医 療応用分野に大きな革新をもたらすと考えられる。

7. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

# 論文(国際)

 Yasuteru Urano, Mako Kamiya, Kojiro Kanda, Tasuku Ueno, Kenzo Hirose and Tetsuo Nagano, "Evolution of Fluorescein as a Platform for Finely Tunable Fluorescence Probes", J. Am. Chem. Soc., 127, 4888–4894 (2005).

 Tasuku Ueno, Yasuteru Urano, Hirotatsu Kojima, Tetsuo Nagano, "Mechanism-Based Molecular Design of Highly Selective Fluorescence Probes for Nitrative Stress", J. Am. Chem. Soc., 128, 10640-10641 (2006).

 Mako Kamiya, Hisataka Kobayashi, Yukihiro Hama, Yoshinori Koyama, Marcelino Bernardo, Tetsuo Nagano, Peter Choyke, Yasuteru Urano, "An Enzymatically Activated Fluorescence Probe for Targeted Tumor Imaging", J. Am. Chem. Soc., 129, 3918–3929 (2007).

 Suguru Kenmoku, Yasuteru Urano, Hirotatsu Kojima, Tetsuo Nagano, "Development of a Highly Specific, Rhodamine-Based Fluorescence Probe for Hypochlorous Acid and Its Application to Real-Time Imaging of Phagocytosis", J. Am. Chem. Soc., 129, 7313-7318 (2007).

· Takatoshi Yogo, Yasuteru Urano, Akiko Mizushima, Hisato Sunahara, Takanari Inoue, Kenzo

Hirose, Masamitsu Iino, Kazuya Kikuchi, Tetsuo Nagano, "Selective Photoinactivation of Protein Function through Environment-sensitive Switching of Singlet Oxygen Generation by Photosensitizer", Proc. Natl. Acad. Sci., 105, 28-32 (2008).

(2)特許出願

発明者:長野哲雄、浦野泰照、上野匡
発明の名称:蛍光プローブ
出願人:東京大学
出願日:2005.11.14

出 願 番 号:US60/735,815

発明者:長野哲雄、浦野泰照、高倉栄男
発明の名称:生物発光プローブ
出願人:東京大学
出願日:2006.03.29
出願番号:特願2006-089936

発明者:長野哲雄、浦野泰照、高倉栄男
発明の名称:生物発光プローブ
出願人:東京大学
出願日:2005.09.30
出願番号:特願2005-286948

発明者:長野哲雄、浦野泰照、見目勝
発明の名称:蛍光プローブ
出願人:東京大学
出願日:2006.03.03
出願番号:特願2006-057792

(3)受賞

平成 17 年 3 月	第 16 回加藤記念バイオサイエンス研究助成
平成 18 年 4 月	平成 18 年度 文部科学大臣表彰若手科学者賞
平成 18 年 6 月	Invitrogen-Nature Biotechnology Award 2006

(4)学会発表

# 口頭発表(国際)

· Yasuteru Urano, Tasuku Ueno, Mako Kamiya, Yoko Wada, Tetsuo Nagano, "Rational and

Flexible Design Strategies of Novel Fluorescence Probes Based on the Evolution of Fluorescein Molecule", Pacifichem2005, 2005

• Yasuteru Urano, Mako Kamiya, Kojiro Kanda, Tetsuo Nagano, "Rational design of novel fluorescence probes for pH, hydrolase and reactive oxygen species based on photoinduced electron transfer", Gordon Research Conference 2005 on Bioanalytical Sensors, 2006

Yasuteru Urano, "Sensitive and Selective Tumor Imaging with Novel and Highly Activatable
 Fluorescence Strategies", BiOS 2008, SPIE Photonic West, 2008

#### 口頭発表(国内)

・浦野泰照、上野匡、長野哲雄、"光誘起電子移動に基づくパーオキシナイトライト高選択蛍 光プローブの開発"、日本ケミカルバイオロジー研究会 第1回年会、2006

・浦野泰照、神谷真子、長野哲雄、"論理的設計法に基づく高感度β-ガラクトシダーゼ蛍 光プローブの開発"、第1回日本分子イメージング学会学術集会、2006

### (5)招待講演

## 招待講演(国際)

・Yasuteru Urano、"Highly sensitive and selective fluorescence imaging of tumors using novel activatable strategies"、高松宮妃癌研究基金国際シンポジウム 2006、2006

 Yasuteru Urano, "Development of Novel Functional Fluorescence Probes Based on Rational and Flexible Design Strategies", Joint German-Swiss Meeting on Medicinal Chemistry / Frontiers in Medicinal Chemistry, 2007

Yasuteru Urano, "Sensitive and Highly Selective Tumor Imaging with Novel "Smart"
 Fluorescence Probes", The 4th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences
 "On the Frontiers of Chemical Biology", 2007

## 招待講演(国内)

・浦野泰照、"蛍光、発光、増感能を制御して、新しい生物研究ツールを創り出す"、第 19 回 バイオメディカル分析科学シンポジウム、2006

・浦野泰照、"スマートプローブの精密設計に基づく高 S/N がん蛍光イメージング"、第 66 回 日本癌学会学術集会、2007

# (B) その他の主な成果

なし

# 研究課題別評価書

1. 研究課題名

三重鎖核酸形成を基盤とする革新的DNA分析

2. 氏名

小比賀 聡

3. 研究のねらい

ヒトゲノム計画も終了し、我々は約30億塩基対ものヒトゲノムのDNA配列を手にすることとなった。この莫大な量のDNA配列情報を如何に活用すべきかという点が、我々科学者に課せられた大きな課題であるといえる。迅速、簡便でかつ一度に多くの一塩基多型(SNP)について網羅的に解析できる新たな手法の確立は、次世代のテーラーメード医療を実現するために必要不可欠なものであるばかりか、幅広いゲノム関連科学の更なる発展にも大きく貢献するものである。我々はこれまでに、天然のDNAに比べ、標的RNAとの結合親和性が10万倍以上、二重鎖DNAとの三重鎖形成能が数百倍以上という新たな架橋型人工核酸BNA(Bridged Nucleic Acid)の開発に成功している(図1)。これらの研究成果に立脚し、本研究では、標的となる二重鎖DNAの配列を三重鎖核酸形成によって厳密に認識し、さらに、その三重鎖核酸形成をトリガーとして自己分解反応を引き起こすインテリジェントな人工核酸分子の開発を目的と

している。これにより、PCR増幅を行わず簡便且つ迅速にそ して高感度に DNA 配列を分析することが可能となる。医師 が診察の傍らで、或いは外科手術の最中でさえも即座に必 要な DNA 情報を手にできるというレベルの新しい分析技術 を確立することで、これからの医療の質を飛躍的に向上さ せることが期待できる。



図1. DNAとBNAの化学構造.

4. 研究成果

# [1] 任意の配列に三重鎖形成可能な核酸塩基の開発

一般に、三重鎖核酸は図2に示すような Hoogsteen型水素結合を介して形成されるが、生 理的条件下(中性条件下)において安定性が十 分ではないとされてきた。また、三重鎖を形成で きる配列にも大きな制約が存在する。すなわち、 三重鎖核酸形成には標的二重鎖 DNA 中にアデ ニン(A)やグアニン(G)といったプリンが連続する 領域が必要であり、このホモプリン配列中に一カ 所でもチミジン(T)やシトシン(C)といったピリミジ



図2. Hoogsteen 型水素結合.

ンが存在するとその安定性は極端に低下してしまうことが知られている。三重鎖の安定性が低い という第一の問題に関しては、既に図1に示す架橋型人工核酸BNAを用いることで解決が可能で ある。そこで、第二の問題である三重鎖形成における配列の制約を解決すべく、様々な非天然核 酸塩基を設計・合成しその機能評価を行った。その結果、BNAの核酸塩基部分にピリドン或いは ピリジン類縁体を導入することで、従来極めて困難であったホモプリン・ホモピリミジン配列中の C·G 塩基対認識を達成した。また、これらの知見を基に新たに T·A 塩基対を認識する非天然塩基

を設計・合成したところ、フェノールや インドールを有する BNA が T・A 塩基 対との親和性に優れていることを見 いだした。これらフェノール、インドー ル類は当初の設計通り、T・A 塩基対 の T の4位カルボニル基を水素結合 にて認識していることが示唆された。 さらに、チアゾール類などの新規な 複素環を核酸塩基に持つ BNA の設 計・合成を行った(図 3)。その結果、 これら新規核酸塩基を持つ BNA 類 が T・A 塩基対の形状を認識し、高い 親和性を示すことが明らかとなった。



図 3. 新規な複素環を塩基に有する BNA と T-A 塩基対との 相互作用図.. 右図は対応する静電ポテンシャルマップ.

# [2] 5' 位窒素原子上に置換基を有する 5'-amino-2',4'-BNA の合成

このように、三重鎖核酸の安定性向上、並びにホモプリン・ホモピリミジン配列以外の塩基配列 認識に関して満足いく結果が得られたため、次に三重鎖核酸形成をトリガーとした自己分解反応 の実現に向けた検討を行った。核酸の 5'位酸素原子を窒素原子に置換した 5'-aminoDNA(図 4) は、緩和な酸性条件下、部位特異的に酸加水分解を受けるという非常に興味深い特徴を有して いたが、同時にこの 5'-aminoDNA は標的二重鎖 DNA との結合親和性を大きく低下させることも知 られていた。そこで、5'-aminoDNA と BNA のハイブリッド型分子である 5'-aminoBNA(図4)を新た に合成し、その機能評価を行ったところ、当初の予想通り、5'-aminoBNA は 5'-aminoDNA の優れ た酸加水分解特性を維持したまま、標的二重鎖 DNA との結合親和性の大幅な向上を示した。次

に、この 5'-aminoBNA を導入したオリゴヌクレオチド の酸分解反応に与える標的二重鎖 DNA の影響につ いて精査した。まず、5'-aminoBNA を含むオリゴヌク レオチドを標的二重鎖 DNA と三重鎖形成させた後、 酸処理を行い反応物の HPLC 分析を行ったところ、非 常に興味深いことに三重鎖を形成することによってオ リゴヌクレオチドの酸分解が飛躍的に加速されること がわかった(図5)。5'-Amino-DNA (図5a)と



図4.5'-aminoDNAと5'-aminoBNAの 化学構造

5'-amino-2',4'-BNA (R = H) (図5b) の場合には、いずれも三重鎖形成によって、60 分間で半分 以上のオリゴヌクレオチドが分解した (pH3条件下)。これに対して、同条件下における一本鎖状 態での酸加水分解速度はどちらも有意に低下した。特に、5'-amino-2',4'-BNA (R = H) (図5b) では4時間後でも約80%のオリゴヌクレオチドが残存していた。また、5'位窒素原子上の置換基が 反応性に与える影響は大きく、特に5'位窒素原子上にメチル基を有する5'-amino-2',4'-BNA (R = Me) では、三重鎖形成により、pH3条件下わずか10分間で80%ものオリゴヌクレオチドの分解 が観測された (図5c)。さらに、より緩和なpH4条件下においても5'-amino-2',4'-BNA (R = Me) は、三重鎖形成した場合に20分間で約半分のオリゴヌクレオチドが分解を受けている(図5d)。こ

の結果から、5'-amino-2',4'-BNA (R=Me)を導入したオリゴヌクレオチ ドを用いることで、標的となる二重鎖 DNAの迅速な検出が可能であると考 えられた。

この結果を基にして、本反応の反 応性向上を目指し5'-aminoBNAの化 学構造を種々変換したところ、わず か数秒から数十秒の半減期で三重 鎖核酸形成をトリガーとしたオリゴヌ クレオチドプローブの自己分解反応 が進行するという結果につながった。 さらに、本原理に基づく DNA 配列の 蛍光分析についても検討を加えた。 酸によって分解を受ける 5'-aminoBNA の近傍に蛍光基、消光 基を導入したオリゴヌクレオチドプロ ーブを合成し、三重鎖形成に伴う酸 加水分解反応を行ったところ、反応 の前後で蛍光強度が大きく変化する という良好な結果を与えた。これらの 結果から、本法は迅速簡便な SNP 解析法、遺伝子検出法として極めて 有望であることがわかった。



図5. 三重鎖形成をトリガーとしたオリゴヌクレオチドの自己分 解反応.

a) 5'-amino-DNA, pH3; b) 5'-amino-2',4'-BNA (R = H), pH3; c) 5'-amino-2',4'-BNA (R = Me), pH3; d) 5'-amino-2',4'-BNA (R = Me), pH4. いずれも青線はプローブのみ、赤線は三重鎖形成 時; e) 本反応の概念図.

## 5. 自己評価

本研究は迅速で簡便かつ高感度な DNA 分析手法の開発を目指したもので、これを実現するための当初目標として、(1)任意の配列に三重鎖形成可能な核酸塩基の開発、(2)三重鎖形成時に自己分解を起こす人工核酸の開発を掲げてきた。まず、第1の目標である任意の配列に三重

鎖形成可能な核酸塩基の開発については、様々な非天然型核酸塩基を合成し、その物性評価を 行うことで、CG塩基対を厳密に認識する人工核酸塩基の開発に成功している。また、極めて困難 であった TA塩基対の認識についても、生体での分子認識メカニズムを利用した手法、及びコンピ ュータモデリングを利用した理論的手法といった複数の戦略でアプローチすることにより目標を達 成することができた。一方、第2の目標である三重鎖形成時に自己分解を起こす人工核酸の開発 についても順調に研究が進展し、自己分解を起こす結合周りの化学構造の変換や隣接するヌク レオシド残基の綿密な化学修飾の結果、研究開始当初には1時間程度であった反応の半減期を、 わずか数秒程度にまで短縮することに成功した。このように、概ね設定した目標通りの成果が得 られたと考えている。さらに、これらの成果をもとに、三重鎖核酸形成による遺伝子発現制御とい う当初目標にはなかった興味深い知見を得ることにも成功した。このように、三重鎖核酸形成によ り標的二重鎖 DNA の配列を認識し、連鎖的な化学反応を DNA 上で誘導させるという従来に無い 方法を実現できたことで、今後の DNA 分析手法の開発にも大きく貢献できると考えている。

6. 研究総括の見解

標的となる2 重鎖 DNA と結合して三重鎖らせん構造を形成し、かつ連鎖的な化学反応を DNA 上で誘導する人工核酸を開発し、極微量の DNA を配列特異的に検出することを目的とした研究 である。PCR 増幅を行わずに簡便かつ迅速に DNA 配列の分析を可能とする実用性の高い研究 である。主たる成果は次の2点である。

1)架橋型人工核酸塩基を開発し、三重鎖核酸形成における課題であった C-G, T-A 塩基対の 認識に成功した。

2)三重鎖核酸形成をトリガーとして半減期約 30 秒以内に自己分解するオリゴヌクレオチドプロ ーブの開発に成功した。また、蛍光基と消光基を導入したオリゴヌクレオチドを合成し、標的 DNA を短時間で検出できることを示した。

独自性の高い方法でこれらの成果を得たことは高く評価できる。検出感度数十アトモルレベル の迅速な診断の見通しも得ており、SNP 解析や特定遺伝子の解析法において幅広く応用が進展 することが期待される。また、目的外の成果として、三重鎖核酸形成による遺伝子発現制御の可 能性を見出している。

研究成果は 18 篇の原著論文、3 件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づ く特許 4 件を出願している。またこれらの成果により「平成 17 年度大阪大学教育・研究功績賞」を 受賞している。

迅速で簡便かつ高感度な DNA 分析手法の確立は、これからのテーラーメード医療実現の大きな鍵となる研究分野であり、本研究成果が実用化できれば計測法としてのインパクトは非常に大きい。実用化に向けたさらなる改良と幅広い評価実験の積み重ねが必要である。

7. 主な論文等

#### (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

# 論文(国際)

• S. Obika, A. Hiroto, O. Nakagawa, T. Imanishi, "Promotion of stable triplex formation by partial incorporation of 2',5'-phosphodiester linkages into triplex-forming oligonucleotides", Chem. Commun., 2793-2795 (2005)

• S. M. A. Rahman, S. Seki, S. Obika, K. Miyashita, T. Imanishi, "Highly stable pyrimidine-motif triplex formation at physiological pH values by a bridged nucleic acid analogue", Angew. Chem. Int. Ed., 46, 4306–4309 (2007)

S. Obika, M. Tomizu, Y. Negoro, A. Orita, O. Nakagawa, T. Imanishi, "Double-stranded DNA-templated oligonucleotide digestion triggered by triplex formation", ChemBioChem, 8, 1924–1928 (2007)

 $\cdot$  S. Obika, H. Inohara, Y. Hari and T. Imanishi, "Recognition of T·A interruption by 2',4'-BNAs bearing heteroaromatic nucleobases through parallel motif triplex formation", Bioorg. Med. Chem., in press

• S. M. A. Rahman, S. Seki, S. Obika, H. Yoshikawa, K. Miyashita, T. Imanishi, "Design, synthesis and properties of 2',4'-BNA<sup>NC</sup>: A bridged nucleic acid analogue", J. Am. Chem. Soc., in press

(2)特許出願

発 明 者:小比賀 聡、今西 武 発明の名称:オリゴヌクレオチド類縁体 出 願 人:大阪大学 出 願 日:2005.08.31

出 願 番 号:特願 2005-252034

発明者:小比賀 聡、今西 武
 発明の名称:人工核酸プローブを用いた三重鎖核酸形成を基盤とした標的核酸の検出
 出願人:大阪大学

- 出 願 日:2005.08.31
- 出 願 番 号: 特願 2005-251992

発明 者:小比賀 聡、今西 武

発明の名称:人工核酸プローブを用いた三重鎖核酸形成を基盤とした標的核酸の検出

出 願 人:大阪大学

- 出 願 日:2006.08.31
- 出願番号:PCT/JP2006/317223

発明者:小比賀 聡、今西 武

発明の名称:オリゴヌクレオチド類縁体

出 願 人:大阪大学

出 願 日:2006.08.31

出願番号:PCT/JP2006/317224

# (3)学会発表

#### 口頭発表(国際)

・小比賀 聡、戸水 真治、根来 佳憲、折田 文子、尾崎 朋久、今西 武、"三重鎖形成核酸 を利用した迅速・簡便な SNP 検出"、日本ケミカルバイオロジー研究会第2回年会、2007 ・小比賀 聡, 戸水 真治, 根来 佳憲, 今西 武、"三重鎖核酸形成を基盤とする革新的 DNA 分析"、日本薬学会第 127 年会、2007

#### ポスター発表(国際)

 S. Obika, M. Tomizu, Y. Negoro, T. Osaki, A. Orita, Y. Ueyama, O. Nakagawa, T. Imanishi, "Acid-mediated cleavage of oligonucleotide P3'->N5' phosphoramidates triggered by sequence specific triplex formation", XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (Bern), 2006

 M. Tomizu, O. Nakagawa, S. Obika, T. Imanishi, "Promotion of acid-mediated cleavage of oligonucleotide P3'->N5' phosphoramidates by triplex formation: A novel approach to sequence-specific DNA detection", 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2005

# ポスター発表(国内)

・小比賀 聡, 戸水 真治, 根来 佳憲, 今西 武、"三重鎖核酸形成を基盤とする革新的D NA分析"、日本ケミカルバイオロジー研究会第1回年会、2006

(4)招待講演

## 招待講演(国内)

 ・小比賀 聡、"迅速簡便な SNP 検出法の開発 –DNA 三重らせんの利用–"、第8回地域研 究交流フォーラム、2007

・小比賀 聡、"架橋型人工核酸 BNA の開発とその応用"、第10回生命化学研究会シンポジ ウム・熊本、2008

・小比賀 聡、"遺伝子の発現制御と解析に向けた機能性人工核酸 BNA の開発"、日本薬学 会第 128 年会、2008

# (B) その他の主な成果

# なし

# 研究課題別評価書

1. 研究課題名

生体単一分子ダイナミクスの多次元計測法

2. 氏名

影島賢巳

3. 研究のねらい

タンパク質に代表される生体高分子の構造相転移現象は、生命現象においてきわめて本質的 な役割を演じている。その中で大きな関心を集めている側面の一つが、特定の空間構造を形成 (フォールディング)する過程である。一般に、タンパク質は複雑で階層的な空間構造を持つため、 そのフォールディング時間のスケールも同様に階層的で幅広い時間スケールにわたる。そこで、 本研究では、生体分子を1つの高分子鎖とみなし、時間スケールに代表されるその動的性質を、 高分子物理の視点から捉えられないかと考えた。

一般に高分子や流体などの複雑系の非平衡応答は、その外力に対する弾性的な応答と粘性 的な応答で決まる、ある特徴的な緩和時間を持つ。タンパク質のフォールディング現象を、天然状 態という自由エネルギーの極小へと落ち込んでいく非平衡過程と見なせば、フォールディング時 間は、その構造がもつ種々の緩和時間の重ね合わせで表わされるはずである。実際に、 cytochrome c や tryptophan cage といったタンパクのフォールディング時間が、分子鎖内の内部摩 擦に支配されていることを示唆する報告が最近相次いでなされている。このような非平衡過程を 詳細に議論するには、多数分子の集団計測における統計性を排除した単一分子レベルでの計測 を行うことが有用である。

そこで、本研究では、近年提案されている単一分子計測の手法の中で、もっとも動的応答計測 に優れた原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、分子鎖を伸張してその構造を段階的に変化させながら、 粘弾性を計測する手法を極限まで突き詰めることにした。具体的には、(1)従来型の装置を用いて 粘弾性応答を計測し、これが分子の構造相転移現象と結び付けられることを示すこと、さらに、(2) 広帯域で計測可能な AFM 装置を開発して、周波数依存の粘弾性応答計測を行い、ダイナミクス を議論すること、の 2 点を目的とした。

4. 研究成果

一般に、立体構造をとる生体高分子の両端を捕捉して張力を印加すると、分子は力学的に構 造相転移して最終的にはランダムコイル化し、真っ直ぐな鎖へと引き伸ばされていく。ランダムコイ ル化するまでの途上では、この経路上に存在する中間体を経由していくと考えられ、各状態での 粘弾性計測を計測すれば、この特定のフォールディングの経路を力学的に追跡できることになる。 ここでもし、周波数を広帯域で可変にできれば、各状態の特徴的な緩和時間応答を切り分けられ るであろう、というのが本研究の着眼点である。 原子間力顕微鏡(AFM)のカセンサーとして使用されるカンチレバーは良好な弾性体であり、その振動は調和振動子で比較的よく表わされる。従って、振動現象を利用して粘弾性応答を計測する常套的アプローチが使用可能であり、その局所性と併せて考えると、他の研究手法にはない、 微視的・局所的な粘弾性応答計測手段となりうることがわかる。実際に、さきがけ研究採択以前 に、単一ペプチド分子内の粘性的な散逸量が弾性とともにAFMを用いて計測できることを示して いる<sup>1)</sup>。

そこで、高次構造をもつタンパク質分子への 適用可能性を検討するため、試験的に、筋肉中 の巨大タンパク質であるコネクチン分子の伸張 に伴う力及び粘弾性プロファイルを計測した<sup>2)</sup>。 この計測は、市販の液中用AFM装置に電磁石 を付加して、磁気粒子を取り付けたカンチレバ ーに 600 Hzの変調をかけながら実施した。この 分子は、βシートがバレル状に構造化したドメイ ンが直列に多数連なった構造を持つ。1つのドメ インが張力により転移する様子の力および弾性 プロファイルを図1に示す。張力を増していくと 以前に崩壊したドメインがランダムコイル的に応 答しエントロピー弾性を示すが、張力が増加し てあるレベルに達するとドメイン内の特定の水 素結合だけが断裂した中間状態に転移し(図 1b-c)、さらに高い臨界張力でドメインは瞬時に



図1 コネクチン分子1ドメインの伸張中の力, 分子弾性,およびその積分のプロファイル。

崩壊する(図 1d-e)。データを見ると、カのプロファイルには中間体への転位による変曲点が現わ れているが、分子弾性を伸張距離で積分したプロファイルにはこれが見られない。これは、600 Hz の変調周波数では中間体への転位が不可逆的・非平衡な応答であるために生じていると解釈さ れる。しかし、同程度の周波数でも変調振幅を増加させた場合には、中間体への転移にあわせて 分子弾性にピークが現われているように見えるデータもある。カ学的な変調が相転移現象自体に 影響している可能性もあり、解釈には今後の検討を要する。

通常、ドメインの完全な崩壊は瞬時に起こるが、1つのデータ中の1つのドメインについてだけ、 50 ms程の長い崩壊が観測され、粘性抵抗係数も特異的な挙動を示した。その原因は不明である が、この際の粘弾性データから特徴的な緩和時間を算出すると 10<sup>-4</sup> sとなり、高分子鎖が溶媒の 粘性抵抗から直接受ける摩擦に起因する緩和時間より2桁程度大きな値になる。これは、溶媒摩 擦以外の内部摩擦メカニズムの存在を示唆する結果であり、1分子粘弾性計測が高分子物理の 分野で新しい知見を与えうることを示唆している。

しかし、複雑な高分子の緩和現象を分析するには、単一の周波数での計測では十分ではなく、 周波数を変えて各緩和モードをその応答時間で切り分けていく過程が不可欠である。図2はこれ を模式的に表わした図である。このような計測を実現するため、新規な AFM の開発を以下のよう に行った。AFM を用いて周波数応答を計測 しようとする際に、もっとも障害となるのは、 その帯域の狭さである。帯域を制限する要 因はいくつか挙げられるが、最大の障害は カンチレバーの共振周波数である。近年、 カンチレバー製作技術が向上し、0.1 N/m という比較的小さい弾性定数を保ちながら、 1 MHz という共振周波数を持つものも開発 されるようになったので、このようなカンチレ バーを利用し、かつ、共振より十分低い範 囲で周波数域で任意に変化させて周波数

応答を計測することは可能である。また、カンチレバー の共振現象を逆に利用し、高次共振の周波数で粘弾 性応答を計測すれば、離散的な周波数でではあるが、 やはり粘弾性の周波数依存を計測することは可能で ある。これを実現するには、以下のような AFM 装置が 必要である。①溶液環境でも、粘弾性計測に障害とな る寄生振動を引き起こすことなく、カンチレバーを制御 性よく励振できる機構を有すること。②上記のカンチレ バーの振動を、十分な帯域で検出できること。③カンチ レバーの変位を計測するためのレーザー光スポットが、 1 MHz の共振を持つ微小なカンチレバーにも対応でき るように十分小さいこと。④十分な計測感度を持つた め、全測定帯域において、理論限界である熱振動ノイ ズにリミットされる高い S/N 比を持つこと。そこで、これ らの条件を満たす装置を開発することにした。



図2 最終目標とする生体分子の力学的構造相転移と粘弾性スペクトル測定の概念図。





Translational stage

図3 (a)開発した AFM 本体の外観。 (b)溶液セル・電磁石周辺の断面図。コイル はセル直下に近接し、水平方向に可動。 ①で挙げた、寄生振動のないカン チレバー励振方法として、カンチレバ ーだけに限定して力を印加することの できる磁気励振法を採用した。これは、 粒子もしくは薄膜状の永久磁石をカン チレバーに付与し、外部から電磁石に よって交番力で励振する方式であり、 励振力を電気的に制御しやすい利点 をもつ。しかし、一般的に電磁石は誘 導性負荷であり、高周波で電流駆動



図4 電磁石に流れる電流の周波数特性。電流設定値 850 mA<sub>p-p</sub>で計測。1 MHzまでの範囲でゲイン変動量 1.5 dB以 下、位相遅れ 15°以下に制御されている。

することは困難である。そこで、小さなインダクタンスで集中した磁場勾配を実現するため、初期透 磁率が1MHz程度までフラットなフェライト材を用いて直径1mm、全長15mmのコアを製作し、4.5 μ Hの電磁石とした。図3に装置全体の外観と、電磁石周囲の断面図を示す。電磁石は、励振力が 極大となる位置に調整できるよう、並進ステージの上に取り付けている。電磁石を駆動する回路 には、OPアンプで作られる電圧—電流変換回路に広帯域・大電流の増幅器をブースターとして 挿入したものを製作した。その結果、図4に示すように1 MHzまでの帯域にわたって、1A<sub>p-p</sub>近い振 幅レベルでほぼ平坦な電流特性を実現することができ、高周波磁気励振が可能になった。

光学系は、光学顕微鏡用の無限遠光学系仕様対物レンズを用い、真円ビームを持つ波長 635 nm の半導体レーザを光源として構成した。ショットノイズを低減させるため、フォトダイオードの極 板上での不要なビーム部分をカットできるように、入射段にスリットを用いてビームを整形したため、 カンチレバー上でのビームスポットは縦長な形状になっている。このスポットの横幅は入射ビーム 東の径に反比例し、直径4mmのビームのレーザを使用した場合の値は約1.8 µmとなり、前述の 微小カンチレバーにも対応可能なものとなった。

カンチレバーの変位を検出する電気系は、広帯域で応答する SiPINフォトダイオードを反射光 のセンサーとして用い、この光電流を高速 FET 入力のOPアンプで電圧変換する構成をとり、約10 MHz の帯域を実現した。この信号を処理するための加減算回路等も、この帯域を損なわないよう に、ビデオ信号用のOPアンプ等を使用して十分広い帯域を持つように構成した。

図5に、市販のカンチレバー上のビームスポットの様子と、これを用いて大気中で計測したノイ ズ特性を示す。カンチレバーの3次までの熱振動ピークが明瞭に見えており、1 MHz 以下の領域 ではバックグラウンドの電気系ノイズはこれよりも有意に低いことから、この帯域ではこの装置は 熱振動にリミットされた良好な S/N 比を持っていることがわかる。



図5 (a)全長 85µm のカンチレバー上のレーザスポット。回折による複数のスポットが見えているが、 中央の最強のものが真のスポット。光路に挿入されたスリットのために縦長になっている。(b)その熱振 動ノイズのパワー密度スペクトル(赤)。矢印で示すのが3次までの共振ピーク。レーザ光源をオフにし て測定した電気系のバックグラウンドノイズ(青)も示す。

図6に、Nd-Fe-Bの永久磁石粒子を貼付した弾性定数 0.1 N/m、全長約 37 µmのカンチレバ ーの写真と、これを純水中で磁気力を用いて強制振動させた振幅と位相の周波数特性を示す。こ の図からわかるように、この帯域内で不要な寄生振動は観測されず、1 MHz の帯域内にある 3 次 までの共振ピークが明瞭に観測され、これらのピーク位置で位相がほぼ 180° 転回する、ローレ ンツ型共鳴曲線の特徴が明瞭に現われている。これは、液中では磁場による励振によってはじめ て計測可能となったものである。1 次ピークより高い周波数帯では、共振をはずれた領域の応答 関数は、変位検出用レーザ光スポットがカンチレバー振動の節や腹にまたがるため非常に複雑で あり、これらの周波数領域の情報を取り出すことは困難である。しかし各共振ピークをローレンツ 型共鳴曲線で近似し、かつ1次ピークよりも十分低いオフレゾナンス領域での計測をも併用するこ とによって、広帯域の離散周波数で粘弾性スペクトルを得ることが可能になった。



図6 (a)磁石粒子を貼付した全長 35 µm のカンチレバー。(b)これを磁気力で強制振動させた特性。 3 次までの共振ピークとこれに付随した位相の転回が見える。

そこで、予備実験として、生体分子よりも単純な構造を持つ多糖類であるデキストランの高分 子鎖を AFM 探針が捕捉した状態で周波数掃引を行った結果、得られたカンチレバーの共振スペ クトルから、複数の離散周波数での分子の粘弾性を算出することができた。しかし、装置の安定 性や測定状況から判断してデータの信頼度にまだ問題があるうえ、物理的解釈においても検討を 要する面があり、あくまでも試験的な結果と認識している。装置のさらなる改良と解析方法の確立 を目指して今後も研究に取り組み予定である。

また、共振周波数約 1 MHz の高周波カンチレバーの磁気変調も試みた。このカンチレバーは 全長が約 10μm、横幅が 2μm 約と非常に小さく、磁気粒子を貼付する方法ではその有効質量が 増えすぎて共振周波数が下がる恐れが高かったため、強磁性である Co の薄膜を蒸着して行った。 しかし、現時点では実用に耐えるような振幅の磁気変調は実現できていない。これは、カンチレバ ーの面積が小さいため付与できる磁性体の体積が限られているためであると考える。より磁場を 集中させて、急峻な磁気勾配を実現するなどの工夫が必要と思われ、今後の検討事項としたい。

#### 参考文献

- [1] M. Kageshima, S. Takeda, A. Ptak, C. Nakamura, S. P. Jarvis, H. Tokumoto and J. Miyake, Jpn. J. Appl. Phys. Lett. 43 (2004) L1510.
- [2] M. Kageshima, Y. Nishihara, Y. Hirata, T. Inoue, Y. Naitoh and Y. Sugawara, AIP Conference Proceedings, Vol. 982, 2008.

## 5. 自己評価

研究を進行させていく過程で、研究の基礎となる高分子物理だけではなく、より一般のソフトマ ターを中心とする非平衡系・複雑系の物理学など、これまで触れる機会の少なかった知識や概念 などを積極的に吸収した。その結果として、研究着想時と比べると、現象に対する自身の物理的 認識は大きく進歩し、また描像も明瞭になった反面、当初の構想とは若干異なってきた点も多々 あり、それに伴い研究方針も多少の修正を余儀なくされた。従って、単純に当初の目的のどれだ けが達成できたかという形で評価することはできない。ただし、研究開始時の最大の研究目標は、 先の図2にその概念を示すように、単一の生体分子鎖の力学的な構造相転移現象の各段階での 粘弾性周波数スペクトルを取得し、それを構造相転移と結びつける手法を実現することであり、こ の点においては現在の認識と大きな隔たりはない。

新しい AFM 装置の開発では、さきがけ採択後に装置の仕様の検討から始めたことに加え、想 定外の設計変更や試行錯誤も多分に余儀なくされ、実質的に研究期間と労力の大半を割かざる を得なかった。結果的に、研究期間内で実現された成果は、まだ最終目標まで到達するものでは ない。しかし、目指した測定をほぼ可能とする装置が開発でき、予備実験のデータも得られ始めて いることなどから、最終目標に向けて確実に近づく途上にあるものと位置づけている。

また、ここで開発し、ようやく実用レベルに近づけた装置は、いわば今後の研究の上での最重 要なプラットホームであり、これを手にできたことは、自身の研究の将来の可能性が大きく拓ける ものであると考えている。過去に定めた目標に対してではなく、未来に対して持つ意義において、 本さきがけ研究で実施した研究は計り知れない価値を持つものであると確信していることを申し添 えておきたい。

#### 6. 研究総括の見解

原子間力顕微鏡を利用して、タンパク質単一分子の構造相転移に伴う粘弾性応答の時間スケ

ール依存性計測の解明に挑戦した。タンパク質分子内の多面的な力学特性をAFMの磁場変調を 利用して計測する提案である。主たる成果は次の2点である。

①コネクチン分子を用いて巨大たんぱく質の粘弾性プロファイルを測定し、高次構造をもつタンパク質のカ学特性の概要と、その精密測定に必要な新規 AFM の目標仕様を明らかとした。

②外部電磁石によりカンチレバーだけに限定して力を印加する励振方式により、1MHz までの幅 広い帯域でタンパク質のコンフォメーションの精密測定が可能な新方式 AFM を完成させた。

また、新方式AFMを用いてデキストラン高分子鎖の粘弾性測定の予備実験を行い、磁気力によるカンチレバーの強制振動により液中での測定が可能な見通しも得ている。

研究成果は1篇の原著論文、2件の学会招待講演にまとめられている。

かなり挑戦的な提案であり、装置作製に時間がかかり当初計画の生体高分子の1分子粘弾性 測定を達成するまでには至っていない。測定装置はほぼ完成することができたので、研究期間終 了後もこの研究を継続し、生体高分子のみならず、合成高分子も含めた1分子粘弾性スペクトル 測定を行い、高分子物理学の進展に寄与していただきたい。タンパク質分子の物性を単一分子レ ベルで探る AFM 装置開発において磁気力の確保、検出系の最適化とノイズ抑制などに取り組み、 目的の測定を可能とする装置を完成したことは高く評価できる。

7. 主な論文等

#### (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

# 論文(国際)

• M. Kageshima, Y. Nishihara, Y. Hirata, T. Inoue, Y. Naitoh and Y. Sugawara "Viscoelasticity and Dynamics of Single Biopolymer Chain Measured with Magnetically Modulated Atomic Force Microscopy", AIP Conference Proceedings, Vol. 982, 2008

(2)特許出願 なし

・影島賢巳、"タンパク質の力学プロファイルをはかる"、バイオニクス、2005

(4)学会発表

### 口頭発表(国際)

• M. Kageshima, Y. Nishihara, Y. Hirata, T. Inoue, S. Kimura, Y. Naitoh and Y. Sugawara "Viscoelastically Analyzed Unfolding Process of Single Biopolymer with Intermediate", International Conference on Nanoscience and Technology (ICN&T) 2006, 2006

• M. Kageshima, Y. Hirata, T. Inoue, S. Kimura, Y. Naitoh and Y. Sugawara "Equilibrium and non-equilibrium processes and internal friction in dynamics of single biopolymer", Kanazawa Workshop on Atomic Force Microscopy (KWAFM' 07), 2007

<sup>(3)</sup>著書

# ポスター発表(国際)

• M. Kageshima, Y. Nishihara, Y. Hirata, T. Inoue, Y. Naitoh and Y. Sugawara "Viscoelasticity and Dynamics of Single Biopolymer Chain Measured with Magnetically Modulated Atomic Force Microscopy", The 5th International Workshop on Complex Systems, 2007

• M. Kageshima, Y. Nishihara, Y. Hirata, T. Inoue, S. Kimura, Y. Naitoh and Y. Sugawara "Viscoelasticity measurement to probe equilibrium and non-equilibrium properties in transformation of single biopolymer chain", International Conference on Nano Science and Technology, 2007

• M. Kageshima, T. Chikamoto, Y. Naitoh, Y. J. Li and Y. Sugawara, "Wide-band magnetic excitation of atomic force microscopy cantilever for study of soft matter dynamics", 15th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM15), 2007

## (5)招待講演

## 招待講演(国内)

・影島賢巳、"生体単一分子の力学的プロファイル計測"、日本顕微鏡学会第61回学術講 演会、2005

・影島賢巳、"生体単一分子のカ学プロファイル計測"、日本分析化学会第 55 年会、2006

(B) その他の主な成果

なし

# 研究課題別評価書

1. 研究課題名

修飾 DNA をセンサ素材とする新しいバイオセンサの開発

2. 氏名

桒原 正靖

3. 研究のねらい

核酸分子(DNA, RNA)は遺伝情報の保持・伝達に主要な役割を果たす分子として知られてい るが、その配列によっては、抗体のように特定の物質を特異的に認識し結合する機能をもつもの (DNA アプタマー, アプタマー)がある。抗体は腫瘍マーカー検査やインフルエンザ検査、妊娠検 査などの診断薬として既に実用化されており、最近ではガンや免疫疾患などの治療薬としての応 用に大きな注目が集まっている。しかし、抗体は一般に生物を用いて作製・製造されるため、抗体 作製(開発)の効率化や抗体製造の低コスト化などが課題となっている。一方、核酸分子でできた アプタマーは抗体に代わる安価な機能分子として注目されているが、生体内のヌクレアーゼ(核 酸分解酵素)によって容易に分解されるという欠点がある。さらに、核酸のモノマーユニットは4種 類しかないため、約20種類のモノマーユニットから構成されるタンパク質に比べて、活性や機能 の多様性が劣っている。そこで本研究では、活性の向上および機能の多様化、ヌクレアーゼ耐性 などを指向して、修飾 DNA ライブラリを用いたインビトロ・セレクション法による修飾 DNA アプタマ ーの創出を試みた。

4. 研究成果

DNAアプタマーやアプタマーなどの機能性核酸は、インビトロ・セレクション法と呼ばれるコンビナトリアル的手法によって、人為的に創出することができる。修飾DNAを用いてインビトロ・セレクション法を行うには、修飾ヌクレオシド三リン酸がポリメラーゼ反応の良い基質として作用する必要が

ある。即ち、天然のヌクレオシドミリン酸の代わりに修 飾ヌクレオシドミリン酸を基質としたポリメラーゼ反応 がうまく進行し、修飾DNAが生成しなければならない。 しかし、修飾ヌクレオシドミリン酸の化学構造やDNA ポリメラーゼの種類などを吟味しなければ、収率良く 修飾DNAが得られなかったり、高頻度に誤った取り込 み(ミスインコーポレーション)を生じたりする。そこで、 収率よく修飾DNAを与えるDNAポリメラーゼと修飾ヌク レオシドミリン酸の組み合わせを見出すために、種々 の修飾ヌクレオシドミリン酸を合成し、それらのDNAポ リメラーゼに対する基質特性を、PCR(ポリメラ



図1 修飾がポリメラーゼ反応に及ぼす影響

166

ーゼ連鎖反応)アッセイなどによって精査した。その結果、修飾基の嵩高さや電荷の有無、リンカ ーの長さや柔軟性など化学構造の違いによって、生成物である修飾 DNA の収量が大きく変わる ことが分かった。特に、負電荷をもつ修飾基の導入は、修飾 DNA の生成を著しく減少させた。また、 DNA ポリメラーゼの種類は、遺伝子進化ファミリーA および D に属するものよりも、ファミリーB に 属するものの方が、塩基部位の修飾に対して寛容であることが分かった。ファミリーB に属する *Vent(exo-)* DNA ポリメラーゼや *KOD Dash* DNA ポリメラーゼは種々のタイプの修飾に幅広く寛 容であり、対応する修飾 DNA を比較的収率良く生成したが、クローニング法を用いた生成物の配 列解析を行ったところ、後者の方がヌクレオチド取り込みのフィデリティ(忠実度)が高く、インビト ロ・セレクション法への利用に適していることが分かった。次に、PCR のどのステップが生成物の 多寡を決定付けているのかを特定するために、DNA 伸長末端に修飾チミジンを含むプライマーお よび伸長末端近傍に修飾チミジンを含む鋳型 DNA を用いて、*Vent(exo-)* DNA ポリメラーゼが触 媒する修飾 DNA 生成反応の速度論的解析を行った。その結果、ピリミジン環 C5 位の修飾基がポ リメラーゼ反応に及ぼす負の効果は、その修飾基が、基質三リン酸上(A)、プライマー鎖上(B)、鋳 型鎖上(C)のうち、プライマー鎖上(B)にある場合に最も大きいということが示唆された(図 1)。これ らの傾向は、種類の異なる *KOD(exo-)* DNA ポリメラーゼでも同様に見られた。

PCR アッセイで得られた実験結果に基づいて、天然型のチミジンの代わりに5-(2-(6-アミノヘキ シルアミノ)-2-オキソエチル)-2' -デオキシウリジンを含む修飾 DNA ライブラリを構築し、サリドマ イド誘導体に特異的に結合する修飾 DNA アプタマーの選別を行った。インビトロ・セレクション法 によって修飾 DNA ライブラリから修飾 DNA アプタマーを作製するスキームを図 2 に示した。まず、 化学合成したランダム配列を含むオリゴヌクレオチド(110mer)を鋳型として、ポリメラーゼ反応によ って修飾 DNA ライブラリを調製した。次に、ターゲット分子を固定化したゲルを用いて、アプタマー 活性をもつ修飾 DNA 分子を選別した。選別した修飾 DNA 分子を PCR によって増幅し、再び修飾 DNA ライブラリを調製した。これら一連の工程を 15 サイクル繰り返した後、クローニング法によっ て単離し、表面プラズモン共鳴法(SPR)や蛍光偏光法等により結合親和性や特異性を評価した。

最も高い結合親和性を示した修飾DNAアプタマーについて、その活性部位を調べるために、配列から予測される二次構造に基づいて全体を4つのパートに断片化した。それぞれのフラグメントの結合活性を調べたところ、ステム・バルジ・ループというシンプルな構造をとるフラグメント

1(31mer)に結合活性があることが分か った(図 3)。そのフラグメント1の改変体 をいくつか化学合成し、それらの結合 活性を比較検討したところ、サリドマイ ド誘導体が結合する部位を同定するこ とができた。同様の方法で、サリドマイ ド誘導体の他に、グルタミン酸や DNA 二重鎖中のミスマッチ構造に結合親和 性を示す修飾 DNA アプタマーなどの取 得にも成功した。



図2 修飾 DNA ライブラリを用いたインビトロ・セレクション法

催眠、鎮痛剤として汎用されたサリドマイドは、 妊婦が服用すると胎児に四肢欠損症などの異常 を引き起すために市場から淘汰されたが、自己免 疫疾患や癌、エイズなどの治療薬の候補として近 年再び脚光を浴びている。また、グルタミン酸は、 神経細胞のプログラム死に関与する重要物質で あり、パーキンソン病などの神経変性疾患との関 連が研究されている。このように、生体内には生 体関連物質や薬剤が引き起こす興味深いイベント がたくさん存在し、未だ作用機序が明らかにされ てないものも少なくない。特定の物質を特異的に 認識するアプタマーは、基礎研究のための分子ツ ールとしてだけでなく医薬や診断薬などへの応用 も検討されている。さらに、修飾基を導入したアプ タマーは、生体内における安定性や機能の拡張 性において、高いポテンシャルを有している。



図3 取得したサリトマイト結合修飾 DNA アフタ マーとサリドマイド結合部位の同定

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、群馬大学大学院工学研究科教授・澤井宏明先生および准教授・ 尾崎広明先生,庄司敦士氏,永島潤一氏より多大なるご尽力を賜りました。また、KOD(exo-) DNA ポリメラーゼを提供して下さいました東洋紡株式会社に厚く御礼申し上げます。

5. 自己評価

本研究期間中に当初の目標であった修飾 DNA アプタマーと修飾 DNA ザイムを組み合わせた 修飾 DNA アプタザイムの創製には至らなかった。セレクションの過程における修飾 DNA の調製に 予想以上に手間取ったことが一因として挙げられる。しかし、それでもサリドマイド誘導体に結合 する修飾 DNA アプタマーをはじめとする幾つかのユニークな修飾 DNA アプタマーの取得に成功し たことは、核酸ライブラリを用いるインビトロ・セレクション法の応用と今後の発展に大きく寄与する ものと考えている。さらに、種々の修飾ヌクレオシドを含むオリゴマーや修飾基質三リン酸を用い た独創的な研究によって、KOD Dash および KOD(exo-) DNA ポリメラーゼが、「高いフィデリティ (忠実度)」と「修飾に対する幅広い寛容性」という一見して相反する特性を併せ持つことを明らか にし、修飾 DNA の酵素的合成における有用性を示した。その機構の解明については現在研究中 であるが、これらの知見は修飾 DNA の酵素的合成法を用いる機能性修飾核酸の創製に大いに 役立てられると考えている。

6. 研究総括の見解

低分子化合物に対して抗体様機能をもつDNA(アプタマー)を得るために、合成化学的手法を 用いて修飾 DNA ライブラリを調製し、その中からインビトロ・セレクション法により特定の化合物に 優れた識別能を持つアプタマーを創出するための方法論を展開した。主たる成果は次の2点である。

①各種修飾ヌクレオシド三リン酸を合成し、その PCR を可能とする幅広い寛容性と反応忠実性を 両立させる2種の DNA ポリメラーゼの選択に成功した。

②修飾DNAライブラリを用いてR-サリドマイド誘導体などの低分子化合物に特異的に結合するアプタマーの取得に成功した。

これらの成果は、幅広い種類の修飾ヌクレオシド三リン酸を合成し、各種 DNA ポリメラーゼを用 いた修飾 DNA ライブラリの調製、インビトロ・セレクションを着実に実行することにより得られてい る。中でも、光学活性サリドマイド誘導体を高選択的に認識できるアプタマー取得に成功したこと は高く評価される。

研究成果は 7 篇の原著論文、2 件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づく 特許 1 件を出願している。また、平成 18 年に「日本化学会第 86 春季年会優秀講演賞」を受賞し ている。

アブタマー開発は医薬や検査薬への応用が期待できる重要な研究課題である。本研究成果は 実用的に有用なアプタマーを効率よく創製する方法論として生命科学におけるユニークな計測・ 分析技術に発展すると考えられる。アプタマーと特異的に結合する分子との相互作用機構を調べ、 有用なアプタマー設計への指針を得ることも期待したい。

7. 主な論文等

## (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

### 論文(国際)

 Tsutomu Ohbayashi, Masayasu Kuwahara, Masatoshi Hasegawa, Toshiyuki Kasamatsu, Takehiro Tamura and Hiroaki Sawai, "Expansion of repertoire of modified DNAs prepared by PCR using KOD Dash DNA polymerase.", Organic & Biomolecular Chemistry, 3,(13), 2463–2468 (2005)

 Masayasu Kuwahara, Kazuo Hanawa, Kazuomi Ohsawa, Rina Kitagata, Hiroaki Ozaki and Hiroaki Sawai, "Direct PCR amplification of various modified DNAs having amino acids: convenient preparation of DNA libraries with high-potential activities for in vitro selection", Bioorganic & Medicinal Chemistry, 14, (8), 2518-26 (2006)

Masayasu Kuwahara, Jun-ichi Nagashima, Masatoshi Hasegawa, Takehiro Tamura, Rina Kitagata, Kazuo Hanawa, Shin-ichi Hososhima, Toshiyuki Kasamatsu, Hiroaki Ozaki and Hiroaki Sawai, "Systematic characterization of 2'-deoxynucleoside-5'-triphosphate analogs as substrates for DNA polymerases by polymerase chain reaction and kinetic studies on enzymatic production of modified DNA.", Nucleic Acids Research, 34, (19), 5383-5394 (2006)

· Atsushi Shoji, Masayasu Kuwahara, Hiroaki Ozaki and Hiroaki Sawai, "A modified DNA

aptamer that binds the (R)-isomer of a thalidomide derivative with high enantioselectivity.", Journal of the American Chemical Society, 129, (5), 1456-1464 (2007)

Kazuomi Ohsawa, Toshiyuki Kasamatsu, Jun-ichi Nagashima, Kazuo Hanawa, Masayasu Kuwahara, Hiroaki Ozaki and Hiroaki Sawai, "Arginine-modified DNA Aptamers That Show Enantioselective Recognition of the Dicarboxylic Acid Moiety of Glutamic Acid", Analytical Sciences, 24, (1), 167–172 (2008)

# (2)特許出願

発明者: 桒原正靖、澤井宏明
発明の名称: 新規核酸誘導体及びそれを用いたポリヌクレオチドの製造方法
出願人: 群馬大学
出願日: 2006.3.15.

出 願 番 号:特願 2005-217479

#### (3)受賞

·平成 18 年 5 月 日本化学会第 86 春季年会優秀講演賞

# (4)学会発表

#### 口頭発表(国際)

 Masayasu Kuwahara, Kazuomi Ohsawa, Toshiyuki Kasamatsu, Atsushi Shoji, Hiroaki Sawai and Hiroaki Ozaki, "Screening of a glutamic acid-binding aptamer from arginine-modified DNA library", Nucleic Acids Symposium Series, 49, 81-82 (2005) (The 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry), 2005

Atsushi Shoji, Masayasu Kuwahara, Hiroaki Sawai, Masayasu Kuwahara, Masatoshi Hasegawa, Jun-ichi Nagashima, Hiroaki Sawai, Hiroaki Ozaki , "Enzymatic synthesis of modified DNA and its application: Selection of thalidomide-binding modified DNA aptamer", PACIFICHEM 2005 (International chemical congress of pacific basin societies), 2005

 Jun-ichi Nagashima, Satoshi Minezaki, Satoshi Obika, Takeshi Imanishi, Masayasu Kuwahara and Hiroaki Sawai, "Polymerisation of a DNA strand using oligo-DNA template with modified bases, sugars and phosphates", Nucleic Acids Symposium Series, 51, 55-56 (2007) (The 5th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry), 2007

# 口頭発表(国内)

・桒原正靖,長谷川雅俊,田村壮広,須藤佳之,澤井宏明、"種々の修飾ヌクレオチドの酵素的取り込みによる DNA ライブラリの多様化"、日本化学会 第86回春季年会、2006

• Masayasu Kuwahara, Yoshiyuki Suto, Satoshi Minezaki, Rina Kitagata, Jun-ichi Nagashima and Hiroaki Sawai, "Substrate property and incorporation accuracy of various dATP analogs during enzymatic polymerization using thermostable DNA polymerases.", Nucleic Acids Symposium Series, 50, 31–32 (2006) (Thirty-third Symposium on Nucleic Acids Chemistry), 2007

(5)招待講演

## 招待講演(国内)

・ 桒原正靖、"インビトロ・セレクション法による機能性修飾 DNA 分子の創製"、日本薬学会・ 第 127 年会、2007

・桒原正靖、"人工核酸分子の可能性~核酸医薬·診断薬の創製をめざして~"、第 22 回 生体機能関連化学シンポジウム「若手フォーラム」、2007

# (B) その他の主な成果

(1)論文(原著論文)発表 なし

(2)特許出願 なし

(3)著書

.

Hiroaki Ozaki, Masayasu Kuwahara and Hiroaki Sawai, "Oligonucleotides Bearing a 5-substituted Pyrimidine Nucleoside: Their Synthesis, Properties, and Application", (pp63-78), Frontiers in Organic Chemistry, 1, (1), Edited by Yoshihiro Hayakawa, Bentham Science Publishers (2005)

#### 研究課題別評価書

1. 研究課題名

生体情報分子の先端的可視化計測法の開発

2. 氏名

佐藤 守俊

3. 研究のねらい

生体分子の可視化計測技術(分子イメージング技術)は、生きた一つ一つの細胞内における生 体分子動態の時空間可視化解析を可能にする.そのため、100万個の細胞をすりつぶして構成 成分を分析する従来法では得られない「生きた情報」を与え、生命科学研究のための先端計測分 析技術としてその発展が強く望まれている.また、ポストゲノム時代に入り、この生体分子の可視 化計測技術は、基礎研究のみならず、創薬研究、スクリーニング、副作用の有無の判定、あるい は疾患細胞の分子診断においても不可欠な研究手法になると期待されている.この生体分子の 挙動を可視化する分子イメージング研究においては、興味ある生体分子もしくはタンパク質リン酸 化などの生体反応を捕まえて光を発生する、いわゆるプローブ(probe)と呼ばれる機能性分子の 開発が必須である.本さきがけ研究では、細胞機能やその破綻の結果である疾患の理解を目的 として、鍵となる生体情報分子が細胞の中のどこで・いつ・どの程度生成し、機能しているのか、そ の動態を可視化計測する蛍光プローブの開発を行った.特に、生体脂質や生体小分子ならびに キナーゼによるタンパク質リン酸化をそれぞれ可視化計測するプローブを新しく開発すると共に、 開発した蛍光プローブを活用して、従来の手法では明らかに出来なかった当該生体情報分子の 動態を明らかにした.

# 4. 研究成果

<u>生体脂質の蛍光プローブ</u>ホスファチジルイノシトール 3,4,5-トリスリン酸(PI(3,4,5)P3)やジアシルグリセロール(DAG)等の生体脂質が多様な細胞機能を制御することは明らかにされているが,その細胞内動態については未知の部分が多い(図 1).本研究では生体脂質を可視化計測すべく新しい蛍光プローブを開発した(図 2).本プローブは二つの蛍光タンパク質(CFP,YFP)と計測目的の脂質と特異的に結合するドメイン(PI(3,4,5)P<sub>3</sub>の場合はPHD)とを有し,それらがGlu-Ala-Ala-Argの繰り返し配列からなる剛直なαへリックスで連結されている.へリックスの一カ所に,側鎖が最も小さいアミノ酸であるグリシンを二個導入し,計測目的の脂質が存在しない場合,ここを蝶番としてプローブが自由回転できるように設計した.一方目的の生体脂質が膜に生成してプローブの脂質結合ドメインが結合すると,プ



図1 生体脂質の構造. (a) PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. (b) DAG. ローブの動きやすさが大幅に減 少し、ドナーであるCFPからアク セプターであるYFPへ安定的に 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)が生起することになる. このFRETを蛍光顕微鏡で計測し 生体脂質の細胞内動態を可視 化する.



このプローブには二つ重要な 部分がある.一つは脂質結合ド

図2 生体脂質(例としてPI(3,4,5)P<sub>3</sub>)の蛍光プローブの原理.

メインであり、プローブの脂質選択性を決める. もう一つがプローブに連結する膜局在化配列 (MLS)であり、様々なオルガネラ膜での脂質計測を可能にする. 選択性と局在を自由自在に変え ることが可能な本法に基づいてPI(3,4,5)P<sub>3</sub>の蛍光プローブ(Fllip; フリップ)(Nature Cell Biol. 2003) とDAGの蛍光プローブ(Daglas; ダグラス)(Nature Methods 2006)を開発し、当該脂質の細胞内動 態を可視化計測した. DAGについては以下のことが明らかとなった(図 3). (1)細胞膜における

DAG濃度は極めて低く保たれているも のの,リガンド刺激により,速やかに一 過性のDAG生成が誘起されること. (2)細胞内膜においては,DAG濃度は リガンド刺激以前から高く保たれており, その濃度はリガンド刺激によりさらに上



昇すること.(3)ミトコンドリアの外膜でも, 図3 蛍光プローブが明らかにした DAG の動態 細胞内膜同様に、リガンド刺激以前からDAGが生成しているが、その濃度はリガンド刺激によりほ とんど変化しいこと.また、Daglasでの可視化計測と薬理学的手法を組み合わせることにより、 (4)細胞膜でのDAGはホスホリパーゼCによるホスファチジルイノシトール 4,5-ニリン酸 (PI(4,5)P<sub>2</sub>)の加水分解により一過的に生成すること、(5)細胞内膜およびミトコンドリア外膜での DAGはホスホリパーゼC経路ではなく、ホスファチジン酸ホスファターゼによるホスファチジン酸の 脱リン酸化により生成すること、を明らかにした.PI(3,4,5)P<sub>3</sub>について本研究者は、先行研究により PI(3,4,5)P<sub>3</sub>が細胞膜のみならず細胞内膜(ゴルジ体膜、小胞体膜)にも生成していることを既に明 らかにしている.本さきがけ研究においては、ミトコンドリア外膜に蛍光プローブ(Fllip)を局在化さ せてそのオルガネラ膜でPI(3,4,5)P<sub>3</sub>を可視化計測し、当該脂質がリガンド刺激依存的にミトコンド リア外膜に生成していることを始めて明らかにした。 <u>タンパク質リン酸化の蛍光</u> <u>プローブ</u>タンパク質のリン 酸化は細胞内シグナル伝達の ON/OFF調節に関わる最も主 要なメカニズムの一つである. 本研究者はタンパク質リン酸 化を可視化計測する蛍光プロ ーブ(Phocus; フォーカス)を既 に開発し, これを報告している (図 4)(Nature Biotechnol.



2002).本さきがけ研究では、 図4 タンパク質リン酸化を可視化する蛍光プローブの原理. 本研究者の独自の技術を展開し、生命機能と疾患の理解に重要なキナーゼによるタンパク質リン 酸化を可視化する蛍光プローブを新しく開発した.ERKは細胞の増殖など数多くの生命機能を制 御するセリン・スレオニンキナーゼである.蛍光プローブに導入する基質配列としては、ERKの細 胞内基質由来のアミノ酸配列(Lys-Arg-Glu-Leu-Val-Glu-Pro-Leu-Thr-Pro-Ser-Ile-Glu-Ala-Pro-Asn-Gln-Ala-Leu-Leu-Arg)を用いている.蛍光プローブに導入するリン酸化認 識ドメインとして、リン酸化スレオニン配列に結合するFHA2ドメインを用いた.このように作製した

蛍光プローブ(Erkus: アーカス)にさらに核内局在アミノ 酸配列と細胞質局在アミノ酸配列をそれぞれ連結して 細胞内にプローブを局在化させ(それぞれErkus-nuc, Erkus-cyto), これを用いて核内, 細胞質でのERKによる タンパク質リン酸化の動態をそれぞれ可視化計測した (図 5). この結果, (1)リガンド刺激によりERKの活性化 は細胞質では一過性であること(つまり細胞質では、活 性化されたERKは 10 分程度で不活性化されてしまうこ と),(2) 一方の核内では,ERKの活性化は持続的であ ること(つまり核内では、一端活性化されたERKは一時間 程度その活性を失わないこと), が明らかとなった(Anal. Chem. 2007). またチロシンキナーゼのSrcによるタンパ ク質リン酸化を可視化計測する蛍光プローブ(Srcus; サ ーカス)を開発した.これを用いた蛍光イメージングの結 果.(1)リガンド刺激の種類によってSrcが活性化する膜 系が異なること(例として, 男性ホルモンは細胞膜でしか Srcを活性化しないが、女性ホルモンは細胞膜のみなら ずオルガネラ膜でもSrc活性化すること)およびその分子



図 5 核内外での ERK によるタンパク 質リン酸化の可視化計測.



メカニズム(J. Biol. Chem. 2007), (2)Srcは生体膜において一様に活性しているのではなく, 生体

膜上に存在する数十ナノメートルサイズの微小ドメイン群(lipid raft; リピッドラフト)においてのみ 活性していること(図 6)(Cancer Res. 2007), を明らかにした. また, (3)リピッドラフトにおけるSrc の活性化が, 乳ガン細胞の細胞接着および細胞周期の亢進を制御することを明らかにした (Cancer Res. 2007).

<u>酵素工学に基づく超高感度蛍光プローブ</u>以下,本研究者が酵素工学に基づいて設計・開発 した増幅検知型の超高感度蛍光プローブとその応用研究について説明する.一酸化窒素(NO) は心血管系や神経系において重要な生体小分子である.本研究者は従来にない全く新しいアプ ローチでNOの超高感度蛍光プローブ(NOA; ノア)を開発した(図 7)(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005). NOAは酵素ドメインと蛍光ドメインを有する.酵素ドメインとしては, NO依存的にセカンドメ ッセンジャーのサイクリックグアノシン 3',5'-

ーリン酸(cGMP)を生成する可溶性グアニル 酸シクラーゼ(sGC)を用い, 蛍光ドメインとし ては本研究者が開発したcGMP蛍光プローブ (CGY; シージー)(Anal. Chem. 2000)用いた. 酵素ドメインからNO依存的に大量生成され たcGMPを蛍光ドメインが効率よく蛍光シグナ ルに変換するため, NOAはサブナノモル濃度 領域のNOを可視化する超高感度蛍光プロー ブとなる. NOAは応答可逆性を有し, 複雑な NO濃度変動も可視化計測できる. 感度, 可 逆性の両面に於いて優れたNOAは, 既存の 手法では明らかにできなかったNO動態の可 視化計測を実現した.



図7 NOの超高感度蛍光プローブの原理.

<u>細胞型蛍光プローブ</u>酵素工学に基づく上述の超高感度蛍光プローブ(NOA)のコンセプトを一 般化する目的で細胞型蛍光プローブを開発し,種々の生細胞から放出される生体分子の超高感 度可視化計測を実現した. 一例として, NOの細胞型蛍光プローブ(Piccell; ピクセル)を開発した (Anal. Chem. 2006). PiccellはNOを増幅検知するため,ピコモル濃度領域のNOを超高感度に検 出する(検出限界は 20 pM).また,選択性,可逆性,再現性についても,Piccellは極めて優秀な

Piccell は細胞型の 蛍光プローブである ので, 血管内皮細胞, 神経細胞, マクロフ ァージなどとPiccell を共培養することに

蛍光プローブである.



図8 NOの細胞型蛍光プローブ (Piccell)を神経細胞と共培養し(a), ネッ トワークを形成した神経細胞からの NO の放出パターンを可視化計測. 175

よって、それらの細胞から放出されたNOを可視化計測することが出来る.例えば、ラット海馬より 抽出した神経細胞とPiccellとを共培養し、神経細胞から放出されるNOの動態を可視化計測した (図 8a).大変興味深いことに、ネットワークを形成した神経細胞は外部から刺激を与えなくとも、 自発的かつ周期的に 100 pM 程度のNOを産生していることがわかった(図 8b).この周期的なNO 放出は、グルタミン酸受容体(NMDAレセプター)を介した自発的な神経伝達によっていることを明 らかにした.このように、Piccellは細胞から放出されたNOの動態を知る上で強力なツールを提供 し、NOによる細胞機能の時空間制御を明らかにする.なお、酵素工学に基づいて細胞型蛍光プ ローブを構築する本アプローチは一般性が高く、一酸化窒素のみならず、ペプチドホルモンや神 経伝達物質など、細胞から放出される生体分子一般について、それらの受容体タンパク質を活用 して高感度の細胞型蛍光プローブを開発できることを示した.

【参考文献】

- M. Sato, N. Hida, T. Ozawa and Y. Umezawa, "Fluorescent Indicators for Cyclic GMP Based on Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase Iα and Green Fluorescent Proteins", Anal. Chem., 72, 5918–5924 (2000)
- M. Sato, T. Ozawa, K. Inukai, T. Asano and Y. Umezawa, "Fluorescent Indicators for Imaging Protein Phosphorylation in Single Living Cells", Nature Biotechnol., 20, 287–294 (2002)
- M. Sato, Y. Ueda, T. Takagi and Y. Umezawa, "Production of PtdInsP<sub>3</sub> at Endomembranes is Triggered by Receptor Endocytosis", Nature Cell Biol., 5, 1016–1022 (2003)

#### 5. 自己評価

本さきがけ研究では新しい方法、すなわち新しい蛍光プローブの設計・開発と共に、それを用いた細胞内分子過程の可視化計測を目標として開始された.前者の「方法の開発」については、おおむね当初の目標に沿う形で開発研究を展開でき、生命機能の理解に重要な生体分子の蛍光プローブを開発することができた。一方の応用研究については、脂質や一酸化窒素、活性化したキナーゼの動態など可視化計測により得られた知見は、決してそのすべてを予め予想し得たものでなく、まさに新しい発見であるとその成果を位置づけることが出来る.しかし、確かに可視化計測の結果は既存の知見にはない望外なものであったが、これらは必ずしも偶然の発見でないと本研究者は認識している.本研究者の姿勢は、単に生体分子に応答して蛍光シグナルを発するプローブを作ればそれでよいというのではなく、生体分子の細胞内動態に関する情報をうまく抽出するには蛍光プローブにどのような機能を備えるべきかという点、どのようにプローブを用いれば生体分子の細胞内動態やその制御機構に関する情報を抽出できるのか等にその重心が置かれている.これがあってこそのそれぞれの発見であり、必ずしも偶然のものではないと本研究者は理解している.

#### 6. 研究総括の見解

独自の可視化法によって種々の生体情報分子の動態を明らかにするプローブの開発を目指す。 主なターゲットは生体脂質、タンパク質リン酸化、一酸化窒素(NO)の蛍光プローブの開発である。 主たる成果は次の3点である。

①脂質結合ドメインと局在化配列を有する蛍光プローブを2種作成し、生体脂質の細胞内動態に いくつかの新しい知見を得た。

②リン酸化認識ドメインと局在アミノ酸配列を有する蛍光プローブの作成に成功し、In vivo で2種のキナーゼによるリン酸化の細胞内動態について新規性の高い数多くの知見を得た。

③神経伝達物質である NO の超高感度可視化プローブを開発し、細胞内で時空間可視化検出す ることにより、NO の動態に関して新規性の高い知見を得た。

これらの成果により、開発したプローブを用いて生体分子の細胞内動態に関する情報をうまく 抽出できることを証明した。研究者の培ったプローブ設計理論の一般化をより前進させたことは高 く評価できる。

研究成果は18篇の原著論文、14件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づ く特許6件を出願している。また、これら成果により「平成18年度日本化学会進歩賞」、「平成19 年度日本分析化学会奨励賞」を受賞している。

これらの成果は、いずれも世界最高性能を有するプローブ開発によるものであり、細胞でのマ イクロドメインにおけるタンパク質の局在活性の可視化の幅広い展開は極めて高く評価できる。今 後、生化学や生物学、生理学の研究分野に対して大きなインパクトをもたらすことが期待できる。

7. 主な論文等

#### (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

# 論文(国際)

• M. Sato, N. Hida, and Y. Umezawa, "Imaging the nanomolar range of nitric oxide with an amplifier-coupled fluorescent indicator in living cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA,102, 14515-14520 (2005)

• M. Sato, Y. Ueda and Y. Umezawa, "Imaging diacylglycerol dynamics at organelle membranes", Nature Methods, 3, 797–799 (2006)

 M. Sato, T. Nakajima, M. Goto and Y. Umezawa, "Cell-Based Indicator to Visualize Picomolar Dynamics of Nitric Oxide Release from Living Cells", Anal. Chem., 78, 8175-8182 (2006)

 M. Sato, Y. Kawai and Y. Umezawa, "Genetically Encoded Fluorescent Indicators to Visualize Protein Phosphorylation by Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) in Single Living Cells", Anal. Chem., 79, 2570-2575 (2007).

 T. Hitosugi, M. Sato, K. Sasaki and Y. Umezawa, "Lipid Raft-Specific Knockdown of Src Family Kinase Activity Inhibits Cell Adhesion and Cell Cycle Progression of Breast Cancer Cells", Cancer Res., 67, 8139-8148 (2007).

#### (2)特許出願

発 明 者:佐藤守俊、梅澤喜夫、一杉太郎

発明の名称:キナーゼ阻害性融合タンパク質と医薬組成物

出 願 人:梅澤喜夫

出 願 日:2007.6.8(未公開)

出願番号:PCT/JP2007/61650

#### 発 明 者:佐藤守俊、梅澤喜夫

発明の名称:タンパク質リン酸化インディケーター

- 出 願 人:東京大学
- 出 願 日:2007.3.6(未公開)

出願番号:PCT/JP2007/054333

## (3)受賞

·平成 19 年 3 月 平成 18 年度日本化学会進歩賞

·平成 19 年 9 月 平成 19 年度日本分析化学会奨励賞

### (4)著書

 M. Sato and Y. Umezawa, "Fluorescent Indicators for Imaging Protein Phosphorylation in Single Living Cells" Cell Biology: A Laboratory Handbook 3rd Edition, Julio E. Celis (Ed.), Chap. 42, 325–328, Elsevier (2005).

• M. Sato and Y. Umezawa, "FRET-Based Reporters for Intracellular Enzyme Activity" Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics, Wiley (2005).

・佐藤守俊「細胞の分子イメージング」医療ナノテクノロジーテキスト, 杏林図書, 2007 年, p2-17.

・佐藤守俊「生細胞内の分子過程を時空間計測するプローブ」蛋白質核酸酵素増刊号「ケミカルバイオロジー」,共立出版,2007年,p1568-1580.

・佐藤守俊「細胞内のシグナル伝達を可視化する蛍光プローブ」化学フロンティア,化学同人, 印刷中..

(5)学会発表

# 口頭発表(国内)

・佐藤守俊、"細胞内の分子過程を可視化する遺伝子コード型蛍光プローブ"、日本化学会 第87春季年会、2007

・佐藤守俊、"遺伝子コード型蛍光プローブによる生体情報分子の動態分析法"、第56回日 本分析化学会年会、2007

(6)招待講演

# 招待講演(国際)

・佐藤守俊、"Methods to Visualize Molecular Events in Living Cells"、NanoBio-Tokyo 2006、 2006

・佐藤守俊、"Imaging the Nanomolar Range of Nitric Oxide with an Amplifier-Coupled Fluorescent Indicator in Living Cells"、4th International Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide、2006

・佐藤守俊、"Illuminating molecular processes in living cells"、The Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences "On the Frontiers of Chemical Biology"、2007 招待講演(国内)

・佐藤守俊、"生体情報分子の可視化計測法"、日本薬学会第127年会、2007

・佐藤守俊、"細胞内の分子過程の可視化計測法"、第7回蛋白質科学会年会、2007

(B) その他の主な成果

なし

# 研究課題別評価書

1. 研究課題名

高感度テラヘルツ光学活性計測技術の開発

2. 氏名

島野 亮

3. 研究のねらい

光と電波の中間に位置するテラヘルツ(THz)周波数帯では、半導体の自由キャリア応答や誘電体のフォノン、生体分子の分子振動等、多くの物質系で固有の応答が観測される。近年、超短光パルス(フェムト秒)レーザーの進歩普及とともに、未開拓であったこの周波数帯でのコヒーレントな光源および検出技術が大きな進歩を遂げつつあり、様々な物質の計測分析手法として急速に発展しつつある。本研究は、この THz 波の「偏光」に着目し、時間空間コヒーレンスの優れた THz パルスの特徴を活かして、高感度の THz エリプソメトリーの開発し、光学活性計測、磁気光学測定へと応用することを目的とした。

4. 研究成果

4-1)テラヘルツ帯の円偏光変調法の開発 可視光あるいは中赤外領域の偏光測 定では、偏光子、波長板、偏光変調器等 の光学素子が確立しており高精度の偏光 測定が行われている。一方、THz 周波数 帯では、偏光子としてはワイヤーグリッド 偏光子が用いられるが、簡便な波長板や 偏光変調素子が欠如していた。そこで、 THz周波数帯での偏光計測技術を支える 一つの素子として、本研究では波長可変 の円偏光発生器を開発した。原理を図 1 上段に示す。偏光の直交するフェムト秒 光パルス対でTHz波パルス対を発生させ、 光パルス対の間隔を変えることにより、そ れぞれから発生するTHz波の位相を変調 し、実効的に偏光を制御することができる。 この原理により 0.3-2.5THz(1.2-10meV、 10-83cm<sup>-1</sup>)の範囲で可変な円偏光発生器 を開発した(図1下段)。



図1 上段:光パルス対による円偏光テラヘルツ波発生の 概念図。下段:生成された円偏光テラヘルツ電場の軌跡。 光パルス対の間隔を変えることで左回りから右回りへと 楕円率を制御できる。 4-2)高いダイナミックレンジを有するテラヘルツ分光系 の開発

高感度偏光計測のために、THz 検出の SN 比の向上 を行った。THz 波発生には p 型 InAs 表面からの高強度 THz 波発生を用い、THz 波検出には量子雑音(ショットノ イズ)レベルで動作する差動光検出器による EO サンプ リング法を用いて、電場振幅にして 5 桁、強度で 11 桁弱 (図 2)に及ぶ高いダイナミックレンジを有する簡便な THz 分光法を確立した。



4-3) THz ファラデー効果測定による半導体の非接触キャリア濃度及び移動度の評価

上記の高いSN比を有するTHz分光法を用いて、磁気光学ファラデー効果を高感度に計測する 手法を確立した。磁気光学ファラデー効果は、磁場下あるいは磁化がある試料に直線偏光の光 (ここではTHz波)が入射した際、透過波の偏光面が回転する現象である。偏光回転角は物質中の キャリア濃度および磁場(磁化)に依存することから、回転角測定から非接触にキャリア濃度を決 定することができる。本研究では直交検光子配置(クロスニコル配置)を採用し、ファラデー回転角 にして 1 ミリラジアン以下の偏光回転検出感度を達成した。同計測手法を用いて半導体のキャリ ア濃度を高感度非接触に評価することが可能となった。図3に一例として、厚さ 525µmのn型Si基 板でファラデー回転角と楕円率角スペクトルを計測した結果を示す。得られたスペクトルからドル ーデモデルによるフィッティングを用いて、キャリア濃度と移動度を非接触で決定することができる。 その温度依存性を図4に示す。10<sup>13</sup>cm<sup>-3</sup>以下の低いキャリア濃度領域でもその評価が可能である ことを実証した。比較のため、直流(dc)ホール効果測定により決定したキャリア濃度、およびこれと



図3 n型Si基板のファラデー回転角 θと 楕円率η。磁場は 0.01T。実線はドルーデ モデルによる理論曲線。フィッティングか らキャリア濃度 6x10<sup>14</sup>cm<sup>-3</sup>、移動度 1.7x10<sup>4</sup>cm<sup>2</sup>/Vsと求まる。



図4 Si のキャリア濃度(左)と移動度(右)の温度依存性。黒 丸:THz ホール効果計測によるもの(非接触法)。白丸:直 流ホール効果測定、電気抵抗測定によるもの(接触法)。ド ナー(P)からの熱励起モデルによる理論曲線。

抵抗測定から見積もられた移動度を白丸で示している。THz分光法で評価されたキャリア濃度は dc電気伝導測定の結果とよく一致しており、Siに関してはdc測定と相補的な非接触キャリア濃度 評価として有用であることが確認できた。温度依存性はドナーからの熱励起による理論でよく説明 され、これよりドナー束縛エネルギーを45meVと決定した。移動度も高温 60K以上ではTHz測定と dc測定とはよく一致している。低温ではdcホール測定との差異が見られたが、これはキャリアの 散乱機構のエネルギー依存性を反映している可能性がある。

4-4) 低温強磁場環境下でのテラヘルツ分光システムの開発

高感度 THz ファラデー効果計測 の対象範囲を広範な物質に拡張 するために、低温(≧1.6K)、強磁場 (≦7T)環境下での THz 分光システ ムの開発を行い、同システムに偏 光計測手法を導入した。同装置を 用いて、半導体のサイクロトロン共 鳴スペクトルの観測が可能になっ た(図 5 左)。また、偏光計測から、 サイクロトロン共鳴周波数領域で のファラデー回転スペクトルと楕円 率(円二色性)スペクトルの観測(図 5右)、交流ホール伝導度スペクト ルの評価が可能になった。



図5 n型 Si におけるサイクロトロン吸収スベクトル(左) とファラデー回転角スペクトル(右)の磁場依存性。二つ の有効質量に対応する共鳴吸収(●、O)が観測される。 ファラデー回転角は共鳴前後で分散型を示す。

# 5. 自己評価

本研究では、テラヘルツ波を用いた高感度の光学活性計測法の開発を主眼とした。特にミリラ ジアン以下の偏光回転角を低温かつ磁場環境下で計測する技術を確立し、広範な物質系で非接 触ホール効果計測を可能にすることを目指した。さらにTHz光学活性計測を分子キラリティ計測に 応用することも検討した。当初段階では、THz波の高出力下のために大がかりなフェムト秒レーザ ー増幅システムが必要になることが予想された。また低温磁場中でのTHz偏光分光装置は、クラ イオスタット窓材の制約により難航することが予想されたが、THz波発生法、発生素子、検出法、 検出器、偏光分光法それぞれの要素で最適化を進めた結果、レーザー増幅器を用いることなく 15cm<sup>-1</sup>-70cm<sup>-1</sup>(2meV-8meV)の周波数範囲で、目標としたミリラジアン以下の高感度偏光回転計 測を実現することができた。低温磁場中のTHz偏光分光は、異常ホール効果の起源の解明、量子 ホール効果のダイナミクス、高温超伝導体を含めた強相関電子系のキャリア散乱機構の探求な ど、物性物理学研究における新計測技術及び物質開発を支える新技術として有用な手法となる。 本研究の期間内では、同手法を金属超伝導体に適用し、磁束量子の運動機構をピン止めの影響 を受けずに探ることも可能となった。また本手法によって、光学的に、即ち非接触にキャリア濃度 を広い濃度範囲で計測することが可能になった。実証実験として、半導体Si基板(厚さ 525µm)の キャリア濃度、移動度評価を行った結果、10<sup>13</sup> cm<sup>-3</sup>以下の低キャリア濃度までの評価が可能であ ることがわかった。これは従来のTHz分光法の検出可能キャリア濃度範囲を約2桁拡張させるも のであり、薄膜や界面の伝導特性評価への応用も興味深い。高い検出感度を簡便なレーザー発 振器単体のシステムを用いて達成できたことで、本手法は今後広く普及発展するものと期待され る。当初提案した円偏光変調法は期待通りに実現しTHz領域での円偏光生成と制御のさきがけと なった。これらの成果は本さきがけ研究のもと、新しい計測手法の開発に正面から取り組むことが できたことに因る。本研究では、新しい分子構造評価法としてキラル分子の光学活性計測も視野 に入れ、テラヘルツ帯に吸収のあるアミノ酸結晶粉末や螺旋ポリマー試料の計測を行ったが、効 果は小さく有意な信号を得ることができなかった。試料による偏光解消効果を低減するとともに試 料構造最適化を進める必要があると考えられる。

6. 研究総括の見解

高感度な光学活性計測、磁気光学効果測定を可能とするテラヘルツ周波数帯エリプソメトリー を開発し、半導体の非接触伝導特性評価、低温強磁場環境下でのテラヘルツファラデー効果計 測、高温超伝導体の強磁場下でのテラヘルツ分光などへ展開した。主たる成果は次の2点であ る。

①テラヘルツ発生方法、テラヘルツ周波数帯で波長可変な円偏光発生器、高いダイナミックレン ジを持つテラヘルツ分光系などの光学測定システム全体に抜本的な要素技術の改善を積み重ね、 テラヘルツ領域でミリラジアン以下の高感度偏光回転計測を実現した。

②上記分光法を用いた磁気光学測定により、従来は困難であった低キャリア濃度半導体の非接触キャリア濃度評価、低温強磁場中の半導体のサイクロトロン共鳴周波数領域のスペクトル測定などに成功した。

これらの研究成果は2篇の原著論文、4件の学会招待講演にまとめられている。

上記以外にも超伝導体薄膜への適応、キラル高分子計測への適用も進めるなど、幅広い分野 に対する実用性を証明しつつあることは高く評価できる。これらの成果を基に、平成 19 年 10 月よ り強相関電子系のスピン構造をプローブする手法開発を狙う ERATO 十倉マルチフェロイクスプロ ジェクトのグループリーダーとして活躍していることも評価できる。今後、この手法でなければ見え ない数多くの現象の観察が可能となると予測され、物性物理研究に対する波及効果は極めて高 いと考えられる。

7. 主な論文等

### (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

# 論文(国際)

• R. Shimano, H. Nishimura, T. Sato, "Frequency Tunable Circular Polarization Control of Terahertz Radiation", Japanese Journal of Applied Physics 44, L676-L678 (2005)

· Y. Ikebe and R. Shimano, "Characterization of doped silicon in low carrier density region

by terahertz frequency Faraday effect", Appl. Phys. Lett. 92, 012111 (2008)

(2)特許出願 なし

(3)著書

・島野 亮 テラヘルツ技術総覧(執筆分担)「磁気光学」、(有)エヌジーティー、2007年

(4)学会発表

口頭発表(国内)

・島野 亮 "高感度 THz 磁気光学測定と半導体評価への応用"、応用物理学会 THz 電磁波 技術研究会 主催「テラヘルツデバイス研究会」、2005 年

・池辺洋平、島野 亮 "THz 時間領域分光法による n 型 Si の高感度ファラデー効果測定"、
 日本物理学会 2007 年春季大会

・池辺洋平、 島野 売、池田将洋、福村知昭、川崎雅司 "THz 時間領域分光法による超 伝導 NbN 薄膜の磁場下伝導度測定"、日本物理学会 2007 年秋季大会

ポスター発表(国際)

・池辺洋平、島野亮 "High Sensitive THz Faraday Rotation Measurements in Doped Semiconductors(ドープ半導体の高感度テラヘルツファラデー効果測定)"、量子エレクトロニクスに関する国際会議(CLEO/QELS2007)、2007年

ポスター発表(国内)

・西村久明、島野 亮、"周波数可変円偏光テラヘルツ波の発生法の開発"、日本物理学会 2005 年秋季大会

(5)招待講演

# 招待講演(国際)

- Ryo Shimano, Terahertz Hall measurements by magneto optical spectroscopy, The 3rd COE workshop "Frontiers of Laser and Optical Sciences", 2005
- Ryo Shimano, Terahertz spectroscopy of multiferroics and superconductors,2007CERC International Symposium, 2007
- Ryo Shimano, Low energy electromagnetic responses of Condensed matter, 1<sup>st</sup> Joint workshop between Yonsei University and Tokyo University, 2007

# 招待講演(国内)

・島野 亮、"テラヘルツエリプソメトリーの開発"、第 52回応用物理学関係連合講演会 シン ポジウム「テラヘルツ波による化学・バイオ・電子材料評価の最前線」、2005年

- (B) その他の主な成果
  - (1)論文(原著論文)発表 なし
  - (2)特許出願 なし
  - (3)学会発表
## 口頭発表(国内)

・貴田徳明、池辺洋平、島野亮、山崎裕一、有馬孝尚、十倉好紀 "テラヘルツ電磁波時間 領域分光法を用いたマンガン酸化物強誘電体における磁気励起の観測"、日本物理学会 2007 年春季大会

### 研究課題別評価書

1. 研究課題名

スピン偏極ーイオン散乱分光法の開発

2. 氏名

鈴木 拓

3. 研究のねらい

磁性の解明には、磁気構造(スピン配列)の解析が欠かせない。磁気構造とは磁気モーメント (スピン)の配列状態を反映した結晶構造であり、物性の理解が結晶構造解析から始まるように、 磁性の理解やその制御には、この磁気構造の解析が不可欠である。しかし、既存の分析法では、 表面(最表面原子層)に限定した元素選別スピン状態が得られないため、表面の磁気構造解析が 困難であった。

表面の磁気構造解析は、基礎的な表面科学の分野以外に、表面の効果が相対的に重要とな る微小化した先進の磁気デバイス開発においても重要な課題となっている。とりわけ、その基本 動作が非磁性体/強磁性体界面で発現するスピントロニクスの開発では、表面・界面の磁気構造 解析が強く要請されている。

本研究では、表面・界面の磁気構造解析を可能にする新手法として「スピン偏極-イオン散乱 分光法」(SP-ISS)の開発に取り組んだ。この SP-ISS の基本原理は、これまで分析手法に用いら れたことのない物理現象である「イオン中性化のスピン依存」で、これによって最表面の元素選別 スピン分析が初めて実現できると提案して、本さきがけ研究に至った。本研究の目的は、SP-ISS を開発し、この手法によって表面・界面の磁気構造分析が可能なことを実証することである。 SP-ISS によって表面・界面の磁気構造分析が広く可能となれば、表面磁性発現機構の解明や、 スピントロニクスの開発等の飛躍的な発展が期待される。

4. 研究成果

偏極ビームとは、スピンを人為的に揃えたビームであり、物質の特定のスピンと相互作用する ので、スピンのプローブとなる。なかでも、ヘリウムイオン(<sup>4</sup>He<sup>+</sup>)の偏極ビームである「偏極He<sup>+</sup>ビー ム」は、表面に接近すると高い確率で中性化されることから、電子や光子等の各種プローブビー ムの中で、表面の電子スピンに最も敏感である。表面のスピンに敏感なプローブとしてはこの他 に偏極準安定He原子(He\*,2<sup>3</sup>S<sub>1</sub>)ビームがあるが、He\*は電荷を持っておらず、そのためビームの 運動エネルギーの制御が困難である。この運動エネルギーの制御性は、後述の散乱分光計測を 通じた元素選別スピン分析に不可欠な要素であるので、表面の元素選別スピン分析は偏極He<sup>+</sup>ビ ームによってのみ可能である。

偏極He<sup>+</sup>ビームの発生は、米国ライス大グループによって初めて実現された(1998年)。これを受けて私は、さきがけ研究課題として「パウリの排他律に従う表面におけるイオンの中性化はスピン

に依存すると考えられるので、偏極イオンを用いたイオン散乱分光法(SP-ISS)からこの中性化の スピン依存性を求めることで、個々の標的元素のスピン状態が得られる」と提案した。ここで、イオ ン散乱分光法とは、運動エネルギーの揃ったイオンを試料表面に入射し、散乱イオンのエネルギ ー分析から表面の組成や構造を分析する、既に確立された手法である。ただし、その測定感度が (ビーム偏極率)×(ビーム電流密度)<sup>1/2</sup>に比例するSP-ISSを実現するには、ライス大グループが 報告した高々18%程度のビーム偏極率や、1nA以下のビーム電流の改善が不可欠であった。

このライス大グループでは、次の多段プロセスによって偏極He<sup>+</sup>ビームの発生に初めて成功した。即ち、①放電によってHe\*を発生し、②このHe\*を光ポンピング(2<sup>3</sup>S→2<sup>3</sup>P)によって偏極し、③ 偏極したHe\*のペニングイオン化で偏極He<sup>+</sup>を発生させる。③のペニングイオン化ではスピンは保 存されるので、He<sup>+</sup>の偏極率の改善に最も有効なのは、②の過程で高偏極He\*を発生させることで ある。

偏極He<sup>+</sup>ビーム発生方法としてはこの他に、強磁性体表面での電界イオン化や核スピン偏極 <sup>3</sup>Heの超微細相互作用の利用が提案されているが、未だ実現されていない。そこで本研究では、 まずライス大の方法(光ポンピング+ペニングイオン化)を踏襲することから出発し、次にその方 法を改良することでビームの高偏極化と大電流化を目指すことを基本方針とした。

このような基本方針の下に、まず偏極He<sup>+</sup>ビームの開発に取り組み、世界で2番目にその発生 に成功した。次に、He\*の高偏極化に不可欠な、放電環境下におけるHe\*の偏極率計測方法の開 発に取り組んだ。放電中のHe\*偏極率に関しては、従来から吸収測定によって評価されてきたが、 ドップラー効果による異種吸収線の重なりや誘導放出成分の混入の問題があった。そこで本研究 では、この吸収測定に 1083nm D<sub>0</sub>線の円偏光と直線偏光とを用いることでこれらの問題を回避し て、より高い精度で放電中のHe\*偏極率が計測可能な方法を開発した[1]。図 1 は、このようにし て可能となったHe\*偏極率と、(a)導入Heガス圧および(b)RF出力との関係を調べた結果である。



図2 本研究で開発した1083nm D<sub>0</sub>線(σ+ π)を用いた光ポンピング



(D<sub>0</sub>line)及び従来の光ポンピング(D<sub>1</sub>line)に よるHe<sup>+</sup>偏極率(P<sub>He+</sub>)と導入へリウムガス圧 との関係

これらの結果は、放電中のHe\*密度とHe\*偏極率との間の負の相関を示しており、このことから ラディエーショントラッピングによるHe\*の脱偏極が初めて明らかとなった。また、脱偏極のメカニズ ムとして従来から提唱されてきたHe2<sup>3</sup>PとHeとの衝突によるP準位内でのスピン緩和は、実際には

脱偏極にほとんど寄与しないことも明らかとなった[2]。ラディエーショントラッピングとは、光ポン ピングで発生する2<sup>3</sup>Pの2<sup>3</sup>Sへの緩和に伴う自発放出光を、周囲に存在するHe\*が再吸収すること で起こる。この自発放出光は全体としては無偏光なので、これを偏極He\*が吸収すると脱偏極が 起こる。したがって、ラディエーショントラッピングを抑制できれば、He\*偏極率の改善が期待できる。 この抑制の方法として、本研究では 1083nm D₀線を用いた新しい光ポンピング方法を開発した。こ れは、He\*のD<sub>0</sub>線に対する光吸収断面積が、従来の光ポンピングで用いられてきたD<sub>1</sub>線やD<sub>2</sub>線に 対するそれに比べて小さいので(無偏光に対しては、それぞれ 1/3 と 1/5)、ラディエーショントラッ ピングの抑制が期待できるからである。ただし、従来の円偏光のみを用いる方法では、原理的に 偏極率の上限は 50%となる。この上限を排除するために、円偏光(σポンピング)と直線偏光(π ポンピング)とを組み合わせる光ポンピング方法を考案した。そして、He\*偏極率が 0.1Wcm-2程度 のポンポング光密度で飽和することを割り出した上で、1083 nm D₀線(σ+π)光ポンピングを実 現するための光学系を構築し(図 2)、それによって従来比 1.5 倍以上(25%程度)の偏極率を持つ He<sup>+</sup>ビーム発生に成功した(図3) [3]。この結果は、ラディエーショントラッピングが脱偏極の主要 な因子であることを支持している。また、この新しい光ポンピング技術の開発過程において、光ポ ンピングによるイオンビーム電流の増大効果を発見した「4]。この増大効果は、イオンビーム電流 やペニングイオン化速度の圧力依存の解析から、He2<sup>3</sup>PによるHe\*のペニングイオン化によると結 論された。また、この解析から、ペニングイオン化/ダイレクトイオン化速度比の圧力依存を初め て明らかにした。

このように開発に成功した偏極He<sup>+</sup>イオン源を用いて、図4に示すSP-ISS装置を構築した[5]。 このSP-ISS装置では、排気効率の改善を目的に、全てのレンズ電極をパンチングメタルで製作し た。その結果、ビームライン中の残留Heガスとの相互作用で支配されるビーム電流が、過去に報 告のある偏極He<sup>+</sup>イオン源と比べて、一桁以上改善した。さらに、(ビーム偏極率)×(ビーム電流) <sup>1/2</sup>が最大となるように引き出し電極形状を最適化する、放電管断面をホーン形状として光ポンピ

ング照射光の放電管内での反射を防止するこ とで脱偏極を抑制する、ビームに接する全ての 部品を非磁性の銅製とする、等の工夫を施した







188

結果、図5に示すSP-ISSスペクトルの測定に成功した。このスペクトルは、1.7keVの運動エネルギ ーを持つ偏極He\*イオンを用いて、Fe(100)単結晶薄膜を3ラングミュア(L)の酸素雰囲気に暴露し た表面で得られた。入射角と散乱角はそれぞれ、45°と115°である。ISSとSP-ISS強度は、それぞ れ、I<sub>1</sub>+I<sub>1</sub>とI<sub>1</sub>-I<sub>1</sub>と定義される。ここでI<sub>1</sub>(I<sub>1</sub>)は、試料の多数スピンと平行(反平行)に偏極したHe\* イオンの散乱強度である。このSP-ISSスペクトルでは、二体衝突エネルギーから計算された鉄と 酸素のピーク位置(青矢印)でそれぞれ、散乱イオン強度に明瞭なスピン依存が観測され、これか らイオン散乱のスピン依存が初めて明らかとなった。更に、酸素の暴露量の関数として鉄と酸素 のスピン非対称率を調べた結果(図 6)からは、鉄と酸素との間に有意な差が検出され、イオン散 乱のスピン依存が表面の標的原子のスピンを反映していることが明らかとなった[6]。これらの結 果は、SP-ISSの元素識別性を示しており、解析の結果、SP-ISSは標的原子のフェルミレベル付 近のスピンを検出することが明らかとなった。さらに、SP-ISSの入射角度分解測定を通じてシャド ーコーンを利用することにより、表面2~3原子層程度に限定された深さ領域で、原子層を選別し たスピン解析の可能性も示された。ただし、SP-ISSの元素識別性や原子層識別性は試料の電子 状態に依存すると考えられ、定量測定のためには「イオン中性化のスピン依存」機構の更なる詳 細な検討が必要である。

ところで、偏極イオンビームの発生技術開発にはイオンビームそのものの偏極率を評価する手 法が不可欠である。しかし、この評価手法は一般には確立されておらず、これが偏極イオンビー ム開発の障害となってきた。本研究では、まずStern-Gerlach分析器を用いてHe\*の偏極率を調べ ておいて、次にHe\*とHe<sup>+</sup>との間で電子スペクトルを比較することによってHe<sup>+</sup>偏極率を評価した [7]。しかし、この評価方法では、偏極率を求めるまでに時間がかかることや試料表面の状態に 結果が左右される等問題が多かった。

そこで本研究では、イオンビームのスピン偏極率分析器の実現を目指して、Longitudinal Stern-Gerlach 計測の要素技術となる静電型線形イオントラップを開発した。

静電型線形イオントラップとは、静電ポテンシャルのみを用いてイオンを線形空間に蓄積するイ オントラップであり、1997年にイスラエルワイズマン科学研究所のZajfmanとローレンスバークレー 国立研究所のBennerによって独立に開発された。その後、質量分析や原子衝突実験への応用を 目指して、世界の数グループがこのイオントラップの開発に着手した。これまでに、このイオントラ ップを利用して1keV以上の運動エネルギーを持つ種々のイオンビームの安定した蓄積が報告さ れている。これに対し、本研究目的のイオンビーム偏極率計測の実現には、1keV以下の低速イオ ンビームの蓄積が不可欠である。そこで、①1keV以下の低速イオンを効率よくイオントラップに注 入可能な構造とする、②蓄積されたイオンビームそのものを飛行時間法で検出可能な構造とする、 の2点を基本方針として、図7に示すイオントラップを開発した。そして、このイオントラップを用い



ントラップ内の寿命測定

て、200eV程度の低速He<sup>+</sup>ビームに対して 5mS以上の蓄積寿命を初めて達成した(図8)。また、蓄 積されたイオンビームを任意の時間にイオントラップから取り出し、これを飛行時間法で測定する ことにも成功した。この飛行時間測定から、ポテンシャルの動的変化による所謂パルスバンチング 現象が、静電型線形イオントラップでは初めて確認された。さらに、蓄積寿命が残留ガスとの衝突 で支配されていることを明らかにした[8]。これにより、イオンビームのスピン偏極率計測の実現 に必要な蓄積寿命 50mSを達成する見通しを得た。

#### 参考文献

[1] T. Suzuki and Y. Yamauchi, *Jpn. J. Appl. Phys.* 46 (2007) 3673.

[2] T. Suzuki and Y. Yamauchi, Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B256 (2007) 451.

[3] T. Suzuki and Y. Yamauchi, Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. A575 (2007) 343.

[4] T. Suzuki and Y. Yamauchi, *J. Phys.* B40 (2007) 2817.

[5]T. Suzuki and Y. Yamauchi, Ana. Sci. 24 (2008) 81.

[6] T. Suzuki and Y. Yamauchi, *Surf. Sci.* 602 (2008) 579.

[7] T. Suzuki and Y. Yamauchi, *Phys. Rev.* A 77 (2008) 022902.

[8] T. Suzuki and Y. Yamauchi, Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. A562 (2006) 53.

#### 5. 自己評価

本研究の当初の目標は、新しい表面・界面磁気構造分析手法として、SP-ISSを開発することで あった。この目標に向けて、まず偏極He<sup>+</sup>ビーム発生の技術開発に取り組み、従来比 1.5 倍以上 の 25%程度の偏極率を持つHe<sup>+</sup>ビーム発生を実現した。次に、この偏極He<sup>+</sup>イオン源を用いた SP-ISS装置を開発し、これにより当初の目標であったSP-ISS計測に成功した。さらに、この SP-ISS計測から表面の元素選別スピン解析が可能であることを、世界で初めて実証した。また、 当初の目標以外の成果として、イオンビームのスピン偏極率分析を目指した静電線形イオントラ ップの開発に成功し、200eV程度の低速He<sup>+</sup>イオンビームの蓄積に初めて成功した。

このように本研究では、SP-ISS の開発に成功し、これによる表面・界面の磁気構造分析の可能性を示すことが出来たので、当初の目標は達成出来たと考えている。

SP-ISS を今後、実用レベルの分析手法として確立するには、ビーム偏極率改善による測定感度の向上や、定量分析に向けた「イオン中性化のスピン依存」現象の詳細な理解が必要である。 これらを今後の研究の課題としたい。また本研究では、Longitudinal Stern-Gerlach 計測の要素技術として静電型線形イオントラップの開発に成功したので、今後、イオンのスピン偏極率分析器の 実現に向けた研究も併せて推進したい。

6. 研究総括の見解

イオン中性化のスピン依存という物理現象に着目して、表面・界面のスピン配列を調べる独創 的なスピン偏極イオン散乱分光計測システムの開発に挑戦した。主たる成果は次の2点である。 ①へリウム励起過程におけるラディエーショントラッピング現象を解明し、円偏光と直線偏光を最 適化したポンピング法によりHe<sup>+</sup>偏極率25%を達成した。 ②上記高偏極率He<sup>+</sup>を用いて、表面から 2~3 原子層の元素の識別とそのスピン状態の計測に成功した。

スピン偏極ビームの脱励起や中性化の基本的メカニズムを解明し、目的達成に必要な全要素の技術開発を計画的に実施し、スピン偏極イオン散乱分光計測法を完成させ、その測定例を示したことは極めて高く評価できる。また、スピン偏極率分析計の開発のために静電型イオントラップの開発にも成功した。

研究成果は 16 篇の原著論文にまとめられている。この研究成果に基づく特許 4 件を出願して いる。

今後、偏極率向上を主とする装置面の改良を行い、本開発の計測法が表面磁気構造研究への応用が更に進展すると考える。既存の分析手法では不可能な表面・界面のスピン配列解析を可能にし、スピンエレクトロニクス等の電子スピン応用技術の進展に寄与することが強く期待される。

7. 主な論文等

## (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

・鈴木拓、山内泰"Development of spin-polarized ion scattering spectroscopy", Ana. Sci. 24 (2008) 81.

•鈴木拓、山内泰"Spin polarized ion scattering spectroscopy as a novel analytical method of magnetic structure at outermost surfaces", Surf. Sci. 602 (2008) 579.

·鈴木拓、山内泰"Determination of spin polarization of a <sup>4</sup>He<sup>+</sup> ion beam", Phys. Rev. A 77 (2008) 022902

•鈴木拓、山内泰"Generation of polarized 4He+ ion beam by optical pumping using circularly and linearly polarized radiation tuned to D0 line (He metastables 23S1->23P0)", Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. A 575 (2007) 343.

•鈴木拓、山内泰"Current enhancement of a He+ ion beam by optical pumping", J. Phys. B 40 (2007) 2817.

(2)特許出願

発明者:鈴木拓、山内泰
発明の名称:イオンビーム発生方法とそれを実施するためのイオンビーム発生装置
出願人:独立行政法人物質・材料研究機構
出願日:2006.11.29(未公開)

出願番号:特願2006-321053

発明 者:鈴木 拓、山内 泰

発明の名称:偏極イオンビーム発生方法とその実施に使用する偏極イオンビーム発生装置

- 出 願 人:独立行政法人物質·材料研究機構
- 出 願 日:2006.11.29(未公開)
- 出願番号:特願2006-321044
- 発明 者:鈴木 拓、山内 泰

発明の名称:磁気構造解析方法とそれに使用するスピン偏極イオン散乱分光装置

- 出 願 人:独立行政法人物質·材料研究機構
- 出 願 日:2007.7.23(未公開)

出 願 番 号: 特願 2007-190277

### 発明 者:鈴木 拓、山内 泰

発明の名称:スピン偏極イオンビーム発生装置及びそれを用いたスピン偏極イオン散乱分光 装置並びにスピン偏極イオンビームを用いた試料加工装置

- 出 願 人:科学技術振興機構
- 出 願 日:2007.11.29(未公開)

出願番号:PCT / JP2007 / 73121

(3)学会発表

### 口頭発表(国際)

・鈴木拓、"Development of spin-polarized ion scattering spectroscopy"、18th International Conference on Ion Beam Analysis、2007

## ポスター発表(国際)

· 鈴木拓、"Spin-polarized ion scattering spectroscopy as a new analytical tool of surface and interface magnetism"、Atomic Level Characterizations、2007

· 鈴木拓、山内泰、"Generation of polarized 4He+ ion beam by optical pumping using circularly and linearly polarized radiation tuned to D0 line"、12th international conference on ion sources、2007

· 鈴木拓、山内泰、"Development of electron-spin-polarized 4He+ ion source and application to spin-polarized ion neutralization spectroscopy"、International conference of atomic collision in solids、2006

### (B) その他の主な成果

なし

#### 研究課題別評価書

1. 研究課題名

高感度3次元蛍光 X 線分析装置の開発

2. 氏名

辻 幸一

3. 研究のねらい

材料開発研究や生物試料の機能発現の解析などにおいては、試料表面の元素分布のみなら ず、試料内部の分析を可能とする3次元元素分布測定が求められる。そこで、本研究では実験室 で使用可能な高感度な3次元蛍光X線分析装置の開発を目的とした。蛍光X線強度は励起X 線強度に比例するため、分析したい微小空間に励起X線を効率よく集光することが重要である。 そこで、複数のX線管から発生する1次X線を微小空間に共焦点配置で集光させ、微小空間に 存在する試料から高強度の蛍光X線を計測することを目指した。検出用のX線集光レンズの焦点 を励起X線ビームの焦点に合致させることにより、微小空間での蛍光X線のみを測定し、さらには、 試料を3次元的に走査することにより、3次元蛍光X線分析が可能となる装置を開発する。この際、 異なるターゲットのX線管を使用することができ、2波長励起の3次元蛍光X線分析が可能となり、 軽元素(K, Ca など)から重元素(Pb, As など)の3次元分布が得られる。

一方で小型・携帯型の微小部蛍光 X 線分析装置も求められている。従来の蛍光 X 線分析装置 の配置では X 線管と検出器が物理的に干渉することが小型化への1つの障害である。そこで、リ ング状の X 線によって効率的に多方向から試料に X 線を照射するとともに、X 線検出器および検 出用 X 線レンズはリング状 X 線発生部の中空部に同軸に配置させることにより、小型化を実現す る装置構成を考案した。このような対称性の良い設計は世界で始めてであり、装置の小型化に加 え、検出効率も向上することが期待される。以上、2つの分析法においても、非破壊的に常圧下で の「生体物質の構造・機能」や「溶液試料を含めた材料内部の界面の計測・制御」の研究に広く利 用されることを期待する。

4. 研究成果

本研究では「共焦点3次元蛍光X線分析装置の開発」、および、「リング状X線励起・小型蛍光 線分析装置の開発」を主課題として取り組んだ。さらに、これらの研究の応用や研究過程で新た に発想し行った研究テーマも加えて、以下には研究課題毎に研究成果をまとめる。また、課題ご とに主要論文を参考文献として記載する。

1)ポリキャピラリーX線集光レンズの基礎特性評価

実験室でマイクロ X 線ビームの形成に有効なポリキャピラリーX 線レンズの特性を詳しく評価した。金属ワイヤーの素材(Mo, W, Cu, Ni-Cr など)を変えて異なるエネルギーの蛍光 X 線をモニター

1

することにより、同一の X 線ビームに対してビーム径を評価した。その結果、高エネルギーの蛍光 X 線を計測する程、ビーム径は小さく評価された。この結果はポリキャピラリーX 線ビームにより形 成された X 線ビーム内にエネルギー分布があることを示唆している。つまり、X 線ビームの中心部 には高エネルギーX 線が、周辺部には低エネルギーX 線が分布していると考えられる[1,2]。このこ とは、実験室での X 線管とポリキャピラリーX 線レンズを組み合わせて使用する際に注意すべき 点として重要である。

[1] 辻 幸一、「X 線発光分光」、分光研究、57 (2008) 29-41.

[2] A. Matsuda, Y. Nodera, K. Nakano, K. Tsuji, X-ray energy dependence of the focused beam properties produced by polycapillary x-ray lens, *Anal. Sci.*, accepted.

### <u>2) 共焦点 3 次元蛍光X線分析装置の開発</u>

Fig. 1 に示すように、微小空間における 蛍光 X 線の発生効率を高めるため、Mo 管とCr 管の独立した2つのX線管からの X 線をポリキャピラリーX 線レンズを用い て 1 点に集光させた。Mo 管は遷移金属 から重金属の効率的な励起が可能であ り、Cr 管は Ti などの軽元素の蛍光 X 線 励起に有利である。2つの X 線管を同時 に動作させ、軽元素から重元素の微量元 素の分析時の感度向上に有効となった

[1]。エネルギー分散型 X 線検出器にもポリキャ ピラリーX 線レンズを取り付けた。このレンズの

焦点を2つの励起用 X 線ビームの焦点と合致させ、微小空間内で 発生した蛍光 X 線のみを検出できる装置を試作した。3 次元自動試 料ステージ、スペクトル取得と蛍光 X 線強度解析はパソコンにより 自動制御・測定できる。

薄膜多層膜試料を作成し、空間分解能を評価したところ、Mo Kα エネルギーにおいて約 80 μm であった。Fig.2 に示すように、直径1 mm 程度のアマランサス種子に対して得られた Ca の 3 次元元素分 布像が得られた[2]。Ca(K についても同様)については種子の表皮 部分に偏在していることがわかる。その他、固液界面分析への適用 [3]、プラスチック内部の金属片の非破壊分析、マイクロ化学チップ のマイクロ流路内の 3 次元元素像の取得などに応用した。

- K. Tsuji, K. Nakano, X. Ding, Development of Confocal Micro-XRF Instrument using Two X-ray Beams, *Spectrochim. Acta B*, 62, 549–553 (2007).
- [2] K. Tsuji, K. Nakano, Development of Confocal 3D micro XRF Spectrometer with Cr-Mo Dual



X-Y-Zステージ

Fig.1 Experimental setup of 3D-XRF.



Fig.2 3D image of Ca in amaranth seed.

Excitation, X-Ray Spectrom., 36 (2007) 145-149.

[3] K. Tsuji, T. Yonehara, K. Nakano, Application of confocal 3D micro XRF for solid/liquid interface analysis, *Ana. Sci.*, 24, 99-103 (2008).

### 3)リング状X線励起・小型蛍光線分析装置の開発

本装置では、Fig. 3 に示すように、X 線管からの一次 X 線をリング状二次ターゲット外周部に照 射し、二次 X 線を発生させる。発生した二次 X 線を試料に照射し、試料からの蛍光 X 線はリング 状二次ターゲットの開口部を通過し検出器へと導かれる。このように配置は世界で初めての試み であり、リング状二次ターゲット外周部は励起源、中央開口部は検出用コリメーターの役割を担っ ている[1]。発生した二次 X 線を試料の蛍光 X 線励起に用いることで、バックグラウンドの低下を目 指し、装置の小型化にも有利な配置である。

な微小部 XRF 分析法では、照射 X 線をポリキャピ ラリーレンズにより集光する手法が用いられている が、X 線管の焦点とポリキャピラリーレンズの焦点 を合わせるという煩雑な操作が必要である。一方、 ハーフレンズを検出器側に装着する本装置では、 煩雑な光学的調整が不要である特徴を有する。

- T. Yonehara, K. Tsuji, Development of a compact XRF probe using a ring-type secondary target, X-Ray Spectrom., in press.
- [2] 米原 翼、辻 幸一、照射・検出同軸型の微
   小部 XRF プローブの開発、X 線分析の進歩、
   39 (2008) 95-104.



coaxial micro-XRF.

## 4)マイクロ化学チップへの蛍光X線分析の適用

マイクロ化学チップにおける最終検出方法として全反射蛍光 X 線分析法(TXRF)、および、3 次 元蛍光線分析法を適用した。TXRF 法ではマイクロ化学チップの平坦ガラス基板上に測定対象溶 液を展開させ、分析するアイデアである[1]。 卓上型の TXRF 装置も市販されていることを考えると、 TXRF 法は元来サイズが小さいマイクロ化学チップとの組み合わせに適しており、溶液の混合から 検出までをマイクロ化学チップ上で行える小型分析システムの構築が可能となった。

[1] K. Tsuji, Y. Hanaoka, A. Hibara, M. Tokeshi, T. Kitamori, Total reflection X-ray fluorescence analysis with chemical microchip, *Spectrochim. Acta B*, **61**, 389-392 (2006). 5)注射針を用いる微小空間の蛍光X線その場分析

通常、蛍光 X 線分析法で分析できる深さは、多くの場合、試料表面から数 mm 以下である。そ こで、X 線を注射針中を通しながら試料内部に導く微小空間蛍光 X 線分析を提案した。軟試料の 内部で発生した蛍光 X 線は同様の注射針コリメーターを通して検出した。一定濃度の元素を含む 寒天標準試料を準備し、試作した装置の分析性能の評価を行った。寒天中 K, Ca, Zn の検出下限 は、それぞれ 154 mg / kg, 85.4 mg / kg, 5.95 mg /kg であった。また、生物試料への応用として牡 蠣に対して任意の場所と深さにおいて蛍光 X 線分析が可能であることが確認された[1]。

[1] K. Tsuji, A. Matsuda, K. Nakano, A. Okhrimovskyy, X-ray fluorescence analysis of soft materials using needle-type collimators enabling greater tolerance in analysis depth, *Spectrochim. Acta B*, **61**, 460–464 (2006).

### 6) 生きている植物試料に対する蛍光X線微小部分析

大気圧下で測定できるという蛍光 X 線分析法の特徴を活かして、生きている植物や生物試料 への応用が重要と考える。実験室で試料を成長させながら成長過程に伴う元素移動・分布の情 報が得られるように時間分解型の蛍光 X 線分析装置を試作し[1]、ステビアというハーブの一種で ある植物が栄養分を吸い上げる様子を観察することに成功した[2]。

- [1] K. Tsuji, K. Tsutsumimoto, K. Nakano, K. Tanaka, A. Okhrimovskyy, Y. Konishi, and X. Ding, Time-Resolved  $\mu$ -XRF and Elemental Mapping of Biological Materials, *Advances in X-ray Analysis*, **49**, 296-301 (2006).
- [2] K. Tsutsumimoto, K. Tsuji, Time-resolved X-ray fluorescence for monitoring the intake of mineral nutrients in living plants, X-Ray Spectrom., 36 (2007) 324-327.

5. 自己評価

本研究では、蛍光 X 線微小部分析や3 次元分析を念頭に置きながら、励起効率を上げる工夫を 提案し、実際にいくつかの装置を試作することができた。2 波長励起型の共焦点 3 次元装置では K, Ca といった軽元素から重元素に至るまで多くの元素に対して高感度に3 次元分布を非破壊的 に得ることに成功したことは大きな成果と考える。また、蛍光 X 線の励起効率の向上と装置の小 型化を図るためにリング状 2 次ターゲットを世界で初めて考案し、小型蛍光 X 線プローブを試作で きた。リング状 2 次ターゲットの開口部にポリキャピラリーX 線レンズを挿入することも可能であり、 微小部の携帯型蛍光 X 線分析装置の開発の目処がたった。さらには、さきがけ研究の機会を活 かして、様々な研究を試みることができた。すなわち、蛍光 X 線分析法を、マイクロ化学チップにお ける元素分析法や、注射針を用いた試料内部の微小空間その場分析、植物に対する時間分解 測定などに応用することができた。これら付加的な研究成果はまさしく「芽」の段階ではあるが、今 後、多くの「花」を咲かせていける可能性を持っていることが明らかとなった。以上の成果は国内 外で38編の論文発表、7 件の特許出願、8件の著書としてまとめることができ、「さきがけ」研究の 機会を最大限に活かせた。 6. 研究総括の見解

3次元元素分布測定が可能な小型蛍光X線分析装置の開発である。微小空間への1次X線照 射効率の向上、2線源の同時照射、蛍光X線の効率的集光を行っている。主たる成果は次の2点 である。

①2つの X 線管からの X 線をポリキャピラリーレンズで1点に集光した共焦点蛍光 X 線装置を開発し、3次元蛍光 X 線分析の高感度化を図り、軽元素から重元素までの微量分析に成功した。 ②蛍光 X 線検出部の周囲に設けたリング状ターゲットで発生する円錐状の X 線を試料に照射し、 発生する蛍光 X 線をターゲット中心を通してポリキャピラリーレンズで集光する装置を試作し、装置の小型化が可能なことを確認した。

また、これらの成果とともに固液界面分析、マイクロチップ試料分析、固体内部の分析など実用 的な計測分析に応用展開したことも高く評価できる。

研究成果は38篇の原著論文、14件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づ く特許7件を出願している。また平成17年度に「第54回 デンバーX線会議、ベストポスター賞」、 「第34回 CSI国際分光学会議ポスター賞」、平成19年度に「第19回アジア国際分析会議ポスタ 一賞」を受賞している。

当初計画のリング状 X 線光源の開発には至らなかったが、着実に研究成果を挙げており有用 な分析技術の開発が達成されている。蛍光 X 線分析は生体、材料、環境などの研究ツールとして だけではなく、製造から流通に至る品質管理にも必要不可欠な計測分析手段であるので、高感度 化と小型化の研究の更なる進展が強く期待される。3次元元素分布測定の有用性をより多くの例 で示すことを望む。

## 7. 主な論文等

### (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文) 発表

## 論文(国際)

 $\cdot$  K. Tsuji, A. Matsuda, K. Nakano, A. Okhrimovskyy, "X-ray fluorescence analysis of soft materials using needle-type collimators enabling greater tolerance in analysis depth", Spectrochim. Acta B, 61,460-464 (2006)

· K. Tsuji, Y. Hanaoka, A. Hibara, M. Tokeshi, T. Kitamori, "Total reflection X-ray fluorescence analysis with chemical microchip", Spectrochim. Acta B, 61,389-392 (2006)

 K. Tsuji, K. Nakano, X. Ding, "Development of Confocal Micro-XRF Instrument using Two X-ray Beams", Spectrochim. Acta B, 62, 549-553 (2007)

• K. Tsuji, T. Yonehara, K. Nakano, "Application of confocal 3D micro XRF for solid/liquid interface analysis", Ana. Sci., 24, 99–103 (2008)

## 論文(国内)

· 辻 幸一、「X 線発光分光」、分光研究、57, No.1 (2008)

(2)特許出願

発明者:辻幸一、田中啓太、中野和彦
発明の名称:全反射蛍光 X 線分析方法及び装置
出願人:科学技術振興機構
出願日:2005.9.01
出願番号:特願2005-254037

発 明 者:辻 幸一、北森武彦、渡慶次学

発明の名称:マイクロチップ並びにそれを用いた分析方法及び装置

出 願 人:科学技術振興機構

出 願 日:2005.9.02

出願番号:特願2005-254240

発 明 者:辻 幸一、田中啓太、中野和彦

発明の名称:マイクロチップ並びにそれを用いた分析方法及び装置

出 願 人:科学技術振興機構

出 願 日:2006.08.30

出 願 番 号:PCT/JP2006/317078

(3)受賞

·平成17年9月、第34回CSI国際分光学会議ポスター賞

(4)著書

・辻 幸一、"ポリキャピラリーX 線レンズの基礎と応用"、ぶんせき「解説記事」, 8 月号、 378-382 (2006)

K. Tsuji, "X-ray Technology", Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 5th ed., ed. A. Seidel, John Wiley & Sons, Inc., Vol. 26, pp. 411-444 (2007)

・辻 幸一、"蛍光X線法"、表面物性工学ハンドブック 第2版、3-5-1節、184-188(2007)
 ・辻 幸一、「実験室における微小部高感度蛍光 X 線分析」、「ナノイメージング」、エヌ・テイー・エス、印刷中(2007)

・中野 和彦、辻 幸一、「共焦点三次元蛍光 X 線分析」、「ナノイメージング」、エヌ・テイー・エ ス、印刷中(2007)

(5)学会発表

## 口頭発表(国際)

・Kouichi Tsuji, "TXRF analysis with chemical microchip and 3D XRF analysis of solid/liquid interfaces", ドイツ、ドルトムントの ISAS(分析科学研究所)での講演, 2006

· K. Nakano, K. Tsuji, "Development and Application of confocal 3D-micro-XRF spectrometer", 19th International Conference on X-Ray Optics and Microanalysis (ICXOM2007), 2007

### 口頭発表(国内)

・辻幸一、中野和彦、"ポリキャピラリーX線レンズを用いた 2次元・3次元蛍光 X線分析"、 日本学術振興会製鋼第 19委員会製鋼計測化学研究会、2006

 ・辻 幸一、中野 和彦、堤本 薫、松田 晃典、米原 翼、野寺 雄太、"共焦点型の 3 次元 蛍光 X 線分析装置の開発と試料内部の非破壊分析"、日本表面科学会第 26 回表面科学講 演大会、2006

・辻 幸一、「鉄鋼試料の微小部 X 線分析」、日本鉄鋼協会 評価・分析・解析部会セミナー、 大阪市立大学、2006

## (6)招待講演

### 招待講演(国際)

• K. Tsuji, K. Tanaka, K. Nakano, A. Okhrimovskyy, Y. Konishi, X. Ding, "Micro-XRF Analysis of Biological Materials", Denver X-ray Conference 2005, 2005

・K. Tsuji, K. Tsutsumimoto, K. Tanaka, K. Nakano, X. Ding, T. Nagamura, "Micro-XRF Studies using Polycapillary X-ray Lens and AFM Instrument", 第 18 回 ICXOM 国際会議、2005

• K. Tsuji, "Grazing-Exit and Micro Wavelength-Dispersive X-Ray Spectrometry (GE-WDXRS and •-WDXRS)", EXRS (European X-Ray Spectrometry), 2006

· K. Tsuji, A.Von Bohlen, "Improving the detection limits by TXRF and GEXRF", 55th Denver X-ray Conference, 2006

 K. Tsuji, "Special Configurations in X-ray Fluorescence for Environmental Analysis", The 9th Asian Conference on Analytical Sciences (Asianalysis), 2007

### (B) その他の主な成果

- (1)論文(原著論文)発表 なし
- (2)特許出願 なし
- (3)受賞
  - · 平成 17 年 8 月、 第 54 回 デンバーX 線会議、ベストポスター賞
  - ・平成 19 年 11 月、第 19 回 アジア国際分析会議 ポスター賞

### 研究課題別評価書

1. 研究課題名

再衡突電子を用いたアト秒分子内電子波束の測定

2. 氏名

新倉弘倫

3. 研究のねらい

近年、測定の時間分解能は1フェムト秒(10<sup>-15</sup>秒, fs)から数百アト秒(1アト秒=10<sup>-18</sup>秒、as)にま で向上している。フェムト秒の時間領域では、主に分子の振動運動やその構造変化などが測定の 対象であったが、アト秒の領域では、原子や分子の内部を動く電子の運動を直接観測することが 目標となる。本研究では、高強度のレーザーパルスを気相の原子または分子に照射したときに生 成する「再衝突電子波束」を用いて、分子内の電子運動をアト秒の時間分解能で測定することを 目標とする。具体的な研究プロセスは、(a)数サイクルしか振動しない短いレーザーパルス (few-cycle laser pulses)のキャリアエンベロープ位相(CEP)の長時間安定化 (b)連続したスペクト ルを持つ高次高調波(アト秒軟X線光パルス)の発生(c)そのスペクトル上にマッピングされる分子 内に発生した電子運動の観測である。本研究を通じて、超高速レーザー技術の進展およびアト秒 領域での新たな計測法の開発をねらいとする。

4. 研究成果

(1) 再衝突電子によるアト秒分子内束縛電子波束運動の測定法の理論的な提案[1]

測定対象の分子(原子)に強い(~10<sup>14</sup>W/cm<sup>2</sup>)レーザーパルスを照射すると、分子の電子波動 関数の一部がイオン化する(トンネルイオン化過程)。イオン化された電子波動関数の一部は、一 旦分子から離れるが、レーザー電場の符号が変わると元の分子の方向に加速されて戻り衝突す る。この過程を再衝突過程とよぶ。この再衝突してくる電子(再衝突電子)はレーザー電場の一周 期以内のパルス幅を持つ電子パルスと見なすことができ、これを用いて元の分子の振動運動等 を数百アト秒の時間分解能で測定することが可能である[2]。もし再衝突してくる電子が、分子内 に残された電子波動関数(分子軌道)とコヒーレントに相互作用すると、双極子が誘起され高次高 調波と呼ばれる軟X線が発生する。この軟X線のスペクトルから、電子波動関数(分子軌道)の情 報を得ることができる[3]。

本研究では、もし分子中に電子の動き(電子波束)が生成していれば、高次高調波のスペクト ルにその電子波束の動きに応じた強度変化が生じることを計算によって示した。図1に、その測定 原理を示す。まず高強度(~0.5mJ/pulse)の、数サイクルしか振動しないキャリアエンベロープ位 相が制御されたレーザーパルスを用意する。ここで、キャリアエンベロープ位相は、電子の再衝突 が一回だけ起こるような条件に設定する。このレーザーパルスを真空チャンバー中に噴出された 試料分子(原子)に集光し、電子の再衝突過程によって高次高調波を発生させる。そのスペクトル



図1 アト秒の時間分解能での電子(波束)運動測定の原理図。



図2 原子内に生成している電子波束の一周期 が(1)290as (b)330as (c) 444as のときの、計算 された高次高調波(アト秒軟X線)のスペクトル.

を測定することで、測定試料内に生じている電子運動の情報を得る。

電子波束が生成している場合に予測さ れる高次高調波のスペクトルを、時間依 存のシュレーディンガー方程式を解くこと で計算した。まず、分子の束縛状態にそ の周期が(a)290as, (b)330as, (c)444asの電 子波束がそれぞれ生成している状態を (計算上で)作りだした。これは基底状態と 第一電子励起状態の電子波動関数をコヒ ーレントに重ね合わせることで生成できる。 次にパルス幅 8fs,中心波長 1600nm,強度 1 x 10<sup>14</sup>W/cm<sup>2</sup>のレーザーパルスが分子に 照射されたとする。この条件下で計算され た高次高調波のスペクトルを図2に示す。 電子波束が生成していない場合はスペク トルは連続になるが、電子波束が生成し

ている場合には、図に示すようにスペクトル上にへこみが観測されることがわかった。このへこみ の周期は、電子波束の運動の周期が長くなると長くなる。高次高調波のエネルギーは再衝突まで の時間に変換することができ、20eVから 90eVまでがおよそ 2fsの間に相当する。その期間内に、 分子内を動く電子波束が再衝突電子の進入方向と逆向きに動いているときに、へこみ(干渉)が 生じることがわかった。すなわち分子内の電子波束運動が、高次高調波のスペクトル上にマッピ ングされることになる。 (2)8fs のレーザーパルスによる分子振動波束の測定と制御[4]

強度が 10<sup>14</sup>W/cm<sup>2</sup>程度のレーザーパルスを分子に照射したとき、分子にシュタルクシフトが生じ る。シュタルクシフトの大きさが分子座標(位置座標や回転座標)に依存する場合、分子にはレー ザー誘起の力(Laser induced dipole force)が生じる。このレーザー誘起の力を利用して分子の並 進運動や回転運動を制御することが出来る。この方法は分子光学(Molecular Optics)と呼ばれて いる。本研究では、分子の振動周期よりも短いレーザーパルスを用いて、分子中の電子を操作す ることで、分子の振動運動が制御できることを重水素分子を用いて実験的・理論的に示した。重 水素分子イオン(D,\*)に、高強度レーザーパルス(~10<sup>14</sup>W/cm<sup>2</sup>)をその偏光軸が分子軸と平行にな るように照射すると、シュタルクシフトにより電子基底状態と第一電子励起状態がそれぞれ押し下 げ・押し上げられる。これは、電子基底状態においては、Dゥの二つの原子を結びつけている結合 電子がレーザー電場によって揺らされ、基底状態でその結合が弱くなることに相当している。また シュタルクシフトの大きさは結合距離が長いほど大きいが、これは基底状態では結合距離が短い ときに比べて長いときの方が、基底状態ではより分子結合が弱くなる(解離しやすくなる)ことに対 応している。すなわち、振動波束がその振動の外側の古典的回帰点に到達したときに(分子振動 が伸びたときに)レーザー電場を与えると分子は解離しやすくなる。一方、結合距離が短い場合に は、シュタルクシフトの大きさは小さいので、振動波束が内側の古典的回帰点に来たときにレーザ ー電場を与えても分子は解離しにくい。すなわち振動波束の運動の周期に応じて、異なるタイミン グで制御用高強度レーザー電場を与えることで、分子の解離過程が制御できることになる。この ことをD,⁺の振動波束を用いて実験的に示した。まずパルス幅約 40fsのレーザーパルスを 8fsに圧 縮し、光学系を用いて時間的に三つに分離した。それぞれ(1) 重水素分子イオンの振動波束の生



成(ポンプ)(2)振動波束の制御(制御)(3) 振動波束の検出用に用いた。ポンプパル スにより、D,分子はイオン化され、D,⁺の電 子基底状態に振動波束が生成する。その 後時間差をおいて、制御パルスを用いて 分子中の電子を動かし解離させる。最後 に、プローブパルスにより重水素分子イオ ンをさらにD。<sup>++</sup>にイオン化し、解離生成した D<sup>+</sup>の運動エネルギー分布を測定した。そ の運動エネルギーをD。\*\*のポテンシャルに 投影することにより、プローブ時の核間距 離に変換した。図 3 に、制御パルスを (a)35fs秒のとき (b)25fsのときにそれぞれ 与えたときに観測された振動波束の時間 変化を示す。プローブパルスの、ポンプパ ルスからの経過時間を 5fsおきに 40fsから 60fsまで変えることで、振動波束の時間変

化を測定した。図の縦軸は、D2+から解離して生成したD<sup>+</sup>の信号数、横軸は核間距離を表す。プ ローブ時間が40fsのとき(一番上の図)には、振動波束は1-4 Åに局在化しているが、プローブ時 間が長くなるにつれて、核間距離が短い領域(解離しない成分)と、核間距離が長い領域(解離す る成分)との二つに分離していくことがわかる。ここで、制御パルスを25fsに与えたときに比べて、 35fsに与えたときには解離する成分の比率が高い。D<sub>2</sub><sup>+</sup>振動の一周期は約25fsであり、このことは、 もし分子振動のその外側の古典的回帰点に制御パルスを与えたときには解離は促進され、内側 の回帰点に来たときには抑制されるという直感的な描像と一致する。左側のコラムに制御パルス を35fsに与えたとしたときの、計算された振動波束|Ψ<sub>v</sub>(x,t)]<sup>2</sup>の時間変化を示すが、実験と良く一致 していることがわかる。レーザー電場を用いて、分子の結合を自在に切断し、またそのときの振動 波動関数の変化の様子を直接測定することは化学反応動力学の研究に置いて重要な目的の一 つであるが、本研究では振動波束が運動するにつれてシュタルクシフトによりポテンシャル曲面を 歪めることでその行き先を制御し、また波動関数の変化の測定という観点から化学反応(解離)が 起こる様子を直接観測したものである。

(3)高強度レーザーパルスのキャリアエンベロープ位相安定化

アト秒科学・レーザー科学の基盤技術の一つに、高強度(数 mJ / pulse)でレーザーパルスのキ ャリアエンベロープ位相(CEP)を安定化させることがある。物理現象の測定に充分な精度(位相ノ イズ)で測定が可能な、mJ / pulse に近い強度のレーザーパルスで CEP が安定化された成功例 に、2003 年のプリズム対および分散補正鏡を用いたパルス増幅レーザーシステムがよく知られて いる。しかし、その装置はレーザー強度が 0.8 mJ / pulse までであり、時間分解測定を含む幅広い 研究に用いるには、数 mJ / pulse 以上の強度で CEP を充分安定化させる装置の開発が重要とさ れてきた。本研究では、グレーティング対によるパルス増幅器を備えた汎用のチャープパルス増 幅チタンサファイアレーザーシステム(KM 社, Dragon)と、CEP 位相安定化装置(Menlo-systems 社, XPS-800, APS800)を組み合わせることにより、~2.1 mJ / pulse のパルス強度で CEP の安定化を 達成した。本装置は、(1) f-to-2f 光学干渉計による CEP の測定(2)オシレーター部の CEP をキャ ビティ長を調整することによる CEP 安定化(3)グレーティング対によるマルチパスパルス増幅(4)増 幅用チタンサファイア結晶の冷却に、クライオポンプを用いる(5)アンプ通過後の CEP のドリフトを、 パルス圧縮のためのグレーティングの位置を動かすことで補正する、という特徴を備えている。本 装置系の導入時には、結晶を冷却するためのクライオポンプからの振動等により CEP がほとんど 安定しなかったが、振動除去装置および新型のクライオポンプに換装することで、最終的に位相ノ イズの標準偏差△ф(std.) = 0.19 radian (シングルショット測定、10 パルス平均では 0.15 radian)まで 減少させることに成功した。レーザーの強度は2.1mJ/pulse,パルス幅は35fsで中心波長は800nm である。図 4(a)にシングルショットで測定された測定された CEP の時間変化を示す。次に、このレ ーザーパルス(パルス幅 35fs)の一部(1.0 mJ / pulse)を、アルゴンガスを封入した中空ファイバー に導入し、自己位相変調によりパルス幅を広げ、分散補償鏡でその分散を補正することにより~ 6fs のパルス幅に圧縮した。このパルスを、真空チャンバー内に噴出した原子(アルゴンガス)また は分子(二酸化炭素、窒素など)に照射し、そこから発生した高次高調波のスペクトルを測定した。



<sup>(</sup>a) f-to-2f 光学干渉計を用いてシングルショットで測定されたCEP.

(b) 高次高調波のスペクトルから算定されたCEP.

パルス幅が充分に短く、数回しか再衝突過程を含まない場合には、高次高調波のスペクトルは元 のレーザーパルスの CEP に依存する。本研究では、二酸化炭素から生成した高次高調波のスペ クトルを用いて CEP を測定した。パルス圧縮後、高調波発生に使用したパルス強度は 0.35mJ/pulse である。二酸化炭素の高次高調波のスペクトルは、レーザーのパルス幅が短い場 合、もとのレーザーの CEP のπを一周期として変化する。そこで、もとのレーザーの CEP をある値 に設定し、そのときの高次高調波のスペクトルの変化から、CEP のゆらぎ(ノイズ)を測定した。そ の結果を図 4(b)に示す。ここで、縦軸は高次高調波のスペクトルから読み取った CEP、横軸は測 定数である。この分布の標準偏差を見積もると、位相ノイズΔφ(std.) = 0.17 radian であった。従来 の光学系を用いた測定では、積算時間を長くすればそれだけ見かけ上安定化しているように見え るのに対して、本研究では f-to-2f 光学系によるシングルショットでの測定に加え、実際に物理現 象(高次高調波)を測定してその安定度を確認した。この位相ノイズで、装置系に手を触れずに五 時間以上の安定化が可能である。グレーティング対を用いた 2mJ/pulse 以上の出力のレーザー 増幅システムで、CEP が物理現象を測定するのに有用な精度で安定化できることを示した。

[1] H. Niikura et al., Phys. Rev. Lett. 94, 083003 (2005).

[2] H. Niikura and P.B. Corkum, Advances in atomic, molecular and optical physics 54, 511 (2006)

[3] J. Itatani et al., Nature 432, 867-871 (2004).

[4] H. Niikura et al., Phys. Rev. A 73, 021402(R) (2006).

5. 自己評価

電子波束運動をアト秒の精度で測定するために、本研究では当初 (a)高強度(>2mJ/pulse)で CEP 制御されたパルスの発生(b)それをパルス圧縮し、連続した高次高調波の発生(c)第2高調波 発生を組み合わせることによる電子波束の測定というプロセスを経ることを計画していた。成果(1) は、本研究の基礎となる測定概念を理論的に示したものである。また成果(2)については圧縮され たパルスを用いて、分子中の電子運動をレーザー電場で制御し、分子解離において振動波束が 変化(分裂)する時々刻々の様子を測定した結果である。成果(3)はレーザーパルスの CEP 制御 が達成されたことを示した。すなわち、当初の予定の(a)は完全に遂行されたことになる。(b)の連 続した高次高調波の発生については、少なくとも二回再衝突が起こるところまで、連続した高次高 調波(一回だけ再衝突が起こる)の少し手前までは行うことが出来た(未発表)。(c)については第2 高調波を発生して、基本波との位相差を<30as 以下の精度で制御し、電子波束運動または電子 波動関数の形状を反映すると思われる測定結果を得た(未発表)。当初の計画では、完全に一回 しか再衝突が起こらない条件下で電子波束運動を測定することを計画していたが、これはその前 段階として、数回以上電子再衝突が起こる場合についてである。その場合でも、電子波束運動が 測定できる(出来ている)可能性があり、それは今後データ解析を行うことによって明らかにされう ると期待される。全体として、高強度でレーザーパルスの CEP 安定化という基盤的な技術問題が 解決され、電子波束運動を測定できるところまで期間内で到達することが出来たと考えられる。

6. 研究総括の見解

分子の構造や反応性と密接な関係のある分子や原子の中を動く電子の運動を直接観測するこ とを目的とする先端的な課題に挑戦した。強い短パルスレーザー電場を測定対象に照射すること により生成させた再衝突電子によって生成する高次高調波スペクトルを観測、解析することにより 電子波動関数(分子軌道)に関する情報を得ようとする独創的な手法の実現を図った。そのため にキャリアエンベロープ位相を制御したレーザーパルス調整を行った。主たる成果は次の2点で ある。

①再衝突電子により生じる高次高調波スペクトルを計算により明らかとし、この測定に必要なキャリアエンベロープ位相のノイズ低減に取り組み、二酸化炭素を対象にした実測で実証に必要な位相ノイズ 0.17radian を安定的に得ることを達成した。

②キャリアエンベロープ位相制御されたパルスにより再衝突回数2回を実現し、連続した高次高 調波発生に近づいた。

また、分子中の電子運動をレーザーで制御して分子振動波束の制御にも挑戦し、波動関数の 変化の測定から化学反応過程の解析の可能性を示している。

これらの研究成果は 4 篇の原著論文、5 件の学会招待講演にまとめられている。また、この研 究成果により平成 16 年度に"SIMS NRC, annual awards for scientific breakthrough"を受賞してい る。

分子の中の電子の挙動という従来観測不可能であったものを見えるようにすることが本研究に より実現に近づいている。キャリアエンベロープ位相安定化のために光学的要素を一つ一つチェ ックしていく地道な作業により、制御系を高度化した努力は高く評価できる。この研究により明らか となる電子波束の研究が、原子物理から化学反応の基礎的な研究に画期的な情報をもたらすと 強く期待する。

## 7. 主な論文等

## (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

# 論文(国際)

- H. Niikura and P. B. Corkum, "Attosecond and Angstrom Science", Advances in atomic, molecular and optical physics 54, 511-548 (2006)
- H. Niikura, D. M. Villeneuve and P. B. Corkum, "Mapping attosecond electron wave packet motion", Phys. Rev. Lett. 94, 083003 (2005).
- H. Niikura, D. M. Villeneuve and P. B. Corkum, "Controlling vibrational wave packets with intense, few-cycle laser pulses" Phys. Rev. A 73, 021402(R) (2006).

(2)特許出願 なし

# (B) その他の主な成果

(1)論文(原著論文)発表

# 論文(国際)

- J. Itatani, J. Levesque, D. Zeidler, H. Niikura, H. Pepin, J. C. Kieffer, P. B. Corkum and D. M.
   Villeneuve, "Tomographic Imaging of Molecular Orbitals" Nature 432, 867–871 (2004).
- (2)特許出願 なし

## 研究課題別評価書

1. 研究課題名

多角入射分解分光法の構築:光計測の新たな概念

2. 氏名

長谷川 健

3. 研究のねらい

本研究は、以下に述べる二つの異なる背景を、仮想光計測という特殊な概念で結びつけることで、新しい薄膜構造解析法を構築することを目指したものである.

液晶素子などの超薄膜による分子デバイスは、高度に設計された分子が配列することによって 実現される.このため、分子の配向を官能基単位で理解することは、材料開発にとって基本的な 技術となりうる.官能基単位で分子情報を解析できる手法としては赤外分光法が有力で、種々の 測定方法が提案されてきたが、細かな既知の光学定数を使った高度な光学計算が必要である. また、測定に必要な二種類の異なる基板が構造解析の精度を原理的に劣化させる原因になるな ど、誰でも簡単に分子配向を明らかにするというのは、意外に難しいという背景があった[1].

一方,物理法則は,等式を用いて記述するのが常識である.すなわち,左辺の物理量は,右辺 の理論的記述と完全に結び付けられている.ところが,物理量が'測定値'の場合,状況は変わっ てくる.測定値にはノイズなど,理論的に説明できない部分が付随し,理論的記述とは無相関の 因子が必ず含まれる.こうした系を表現できる式を回帰式といい,無相関因子を収めた残余項が 付随するのが特徴である.しかし,この残余項をノイズに限定する必要はなく,理論的な記述に無 相関な量ならばよいはずだと考えた.つまり,測定値の半分程度しか理論化できなくても,回帰式 を使えば理論式として測定値を表現できることになる[1].これは'計測理論'ならではの面白い特 徴であると考え,これを利用した計測法の創案と構築を目指した.

4. 研究成果

1)赤外 MAIR 分光法の構築と成果の概要

上で述べた二つの背景は、仮想光計測という考え方に より、一つにつながった[1].

ここでいう仮想光とは、図1に示すような光の進行方向 に平行な電場振動(図中の矢印)を持つ、いわば縦波の 光である、縦波の光が仮に実験に使えるとすると、これを



図1 仮想光による基板(桃)上の薄膜(緑)の解析の概念図

垂直透過させるだけで, 膜面に垂直な方向に振動する分子振動が選択的にスペクトル測定できる. 従来, 膜面に垂直な電場を発生させるには, 薄膜支持基板を金属にして, 表面で光を反射させることが常識であった. しかし, 仮想光が使えればこの呪縛がなくなり, 金属基板を使う必要がなくなる.

そこで、仮想光の光学理論を直 接作るのではなく、仮想光の存在 を仮定することで斜入射光の透過 光強度の'一部'を簡単な線形結 合様式(行列の積)で表現し、残り を放置したまま回帰式で表現した. その結果、まるで仮想光が使えた かのような測定結果を回帰計算 から算出することに成功し、世界 初の'非金属基板上での純面外 振動モードの測定'を実現した.こ の方法は、膜面に平行な振動モ ードのスペクトルも同時に得ること ができるため、純面外モードスペ



クトルとバンド強度を比較するだけで, 簡単に分子配向解析を官能基単位で行える. 多角入射分 解(multiple-angle incidence resolution; MAIR)分光法と名づけられたこの方法[2]は, 製品化され て現在, 企業や大学で利用され始めている(図 2).

2)MAIR 分光法の薄膜解析への応用

MAIR 分光法では, 測定結果が二つのスペ クトルとなって現れる. すなわち, 膜面に平行 および垂直な遷移モーメントをとらえた IP およ び OP スペクトルである. 図 3 に, ゲルマニウ ム(非金属)基板上に作製したステアリン酸 5 層 LB 膜を用いて得た, 初めての赤外 MAIRス ペクトル(指紋領域のみ)を示す[1]. この薄膜 は, 以前から構造がよく検討されているため, 標準試料として利用した.

図 3 の IP スペクトルには、従来の透過分光 法で得られるスペクトルと形も強度もよく一致 する結果が得られていることがわかった. 一 方, OP スペクトルでは、バンドの強弱関係が IP スペクトルと相補的な性質を示しており、従





来の反射吸収(RA)スペクトルによく対応する結果であることがわかった. RA スペクトルに相当す る結果を得るには,これまで金属基板上での反射光学系を必要とすると考えられてきたため,こ の OP スペクトルは,初めてその既成概念を覆した.こうして,従来法の透過および RA スペクトル に相当する二つのスペクトルが,それぞれ IP および OP スペクトルとなって同時に取得でき,期待 通りに MAIR 分光法が機能していることがわかった. ー方, 金属基板を必要とする RA 法では, 金属という特異な誘電体が 薄膜の構造や物性に変化を与え, 正しい構造解析ができない問題が あった. たとえば, アミノ酸配列間の 水素結合によるβシート構造は, 金 属と接することで構造が崩れ, 解析 が困難となる. このような系に MAIR 分光法は強力な解析ツールとなり, 系を一切乱さずに簡易に構造解析 を実現した.



図 4 に, 一例として人エペプチド 脂質からなる単層LB膜の赤外 MAIRスペクトルを示す[3]. 非金属



であるゲルマニウムを基板として使えるため, βシートの構造が維持でき, アミド I バンド(1636 cm<sup>-1</sup>が)シャープなピークのまま現れている. また, このバンドはIPスペクトルにのみ現れ, OPスペクトルにはまったく出ていないことから, C=O基が膜面内に平行に配向していることが明確になった. このように, 赤外MAIR分光法は, 生体関連物質からなる薄膜の構造解析を強力な手法となりうることが示された.

また,結晶性が低く,かつ分子配向を示す液晶や高分子薄膜のようなX線回折法で解析の難し い材料の解析に大きな威力を発揮することが,一連の実験から明確になった[4].

3)MAIR 分光法の問題点と解決

MAIR 分光法は, 当初, ゲルマニウムやシリコンなど, 大きな屈折率(n > 3)を示す基板上でのみ 実施可能な測定法であった. これは, 分光器の光学系による実験限界と考えていた. この限界は, 単に基板の種類を限定するだけでなく, 赤外部以外の波長領域に MAIR 分光法を拡張できないこ とを意味する. この原理的な限界を克服するため, MAIR 分光法の根幹を担う回帰式の性質に注 目した検討を行った結果, p 偏光を用いた改訂型の MAIR 分光法(pMAIRS)によって問題を解決で きる見込みを得ることができた[5]. pMAIRS は, 可視・近赤外領域での MAIR 分光法を実施するう えで重要な理論的論拠となるが, オリジナルの MAIR 分光法とは異なり, 基板の屈折率や厚みに 応じた実験最適化が必要であることもわかった[6].

## 【文献】

- 1. T. Hasegawa J. Phys. Chem. B 106, 4112 (2002).
- 2. T. Hayden Anal. Chem. 79, 4745 (2007).
- 3. T. Hasegawa, H. Kakuda and N. Yamada J. Phys. Chem. B 109, 4783 (2005).
- 4. T. Hasegawa Anal. Bioanal. Chem. 388, 7 (2007).
- 5. T. Hasegawa Anal. Chem. 79, 4385 (2007).
- 6. T. Hasegawa, Y. Itoh and Akiyoshi K. Anal. Sci. 24, 105 (2008).

5. 自己評価

仮想光計測と銘打って始めた MAIR 分光法の開発が, FT-IR との相性の良さに支えられて順調 に進み,多くの応用的事例によってその信頼性と有用性が確認できた.また,期間内に製品化が 実現したことは想定以上の成果で,この意味では目標を上回る成果が得られたといえる.

また, アメリカ化学会の Anal. Chem.誌に MAIR 分光法が News 記事としてーページを割いて紹介してもらえたことは,本方法のユニークな位置づけと価値が国際的にも評価されたと考えている. これに関連して,二件の受賞が実現したことも望外の成果であった.

その一方で,本来計画していた可視部での MAIR 分光法の構築が期間内に実現できなかった. これは当初の想定範囲を超えた深刻な原理的問題が途中で明らかになり,克服に時間がかかっ たことや,導入した分光器の駆動ソフトに多数のバグがあり,納入業者を通じた間接的なバグ取り 作業に一年近くを費やしたことなどが主な原因である.しかし,なんとか期間内にこれらの問題克 服にめどがついたため,予定した研究内容は全体として概ね順調に推移したと考えている.

6. 研究総括の見解

薄膜・吸着分子の構造異方性解析を目的とした多角入射分解分光法(赤外 MAIR 分光法)という 独創的な発想による赤外分光計測法の提案である。仮想的な縦波光を考えた全く新しい計測理 論に基づいて実験を行い、これまで不可能だった非金属基板上での純面外振動スペクトルの測 定と、光学定数不要の分子配向解析が本分光法により可能であることを証明した。この方法によ り面内、面外スペクトルともに完全同一試料から測定することが始めて可能となるため、科学技術 に対するインパクトは極めて大きくその実用価値は高く評価される。

研究成果は17篇の原著論文、22件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づ く特許2件を出願している。さらに、本研究の成果は平成19年度にサーモフッシャーサイエンティ フィック社より分子配向解析装置/MAIRS 自動分析システムとして実用化されている。また、これら の成果により、平成19年度に「第7回山崎貞一賞(計測評価部門)」、平成17年度に「第2回堀 場雅夫賞」を受賞している。

界面の計測科学に新しい道を拓く光計測概念を提唱し、新規性の高い技術の開発に成功した 実績は高く評価される。実験と平行して進めた既存の光学理論との対応原理の解明も明らかにな りつつあり、この方法が一般論として確立されることが強く期待される。今後、本分析法はナノ薄 膜分野での解析や新材料創出のますます重要なツールとして発展すると考えられる。さらに本計 測法を可視吸域まで拡張する研究も進展中とのことで、新たな物理化学研究に道を開くと期待さ れる。

7. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文) 発表

論文(国際)

• Takeshi Hasegawa, Yoshiko Sato, Hiroyuki Kakuda, Chanqing Li, Jhony Orbulescu, Roger M.

Leblanc "Study of Molecular Aggregation of Artificial Amyloid in a Langmuir Monolayer by Infrared Spectroscopy" J. Phys. Chem. B 112(5), 1391 – 1396 (2008).

- Takeshi Hasegawa "Advanced Multiple-Angle Incidence Resolution Spectrometry for Thin-Layer Analysis on a Low-Refractive-Index Substrate" Anal. Chem. 79(12), 4385 - 4389 (2007). (Accelerated Article) 翌号にインタビュー記事も掲載
- Takeshi Hasegawa, Yu Iiduka, Hiroyuki Kakuda and Tetsuo Okada "Analysis of Structurally Heterogeneous Langmuir-Blodgett Films of Folded/Unfolded Long-Chain Molecules by Infrared Multiple-Angle Incidence Resolution Spectroscopy" Anal. Chem. 78(17), 6121 – 6125 (2006)
- Takeshi Hasegawa, Yusuke Nakano and Yasuyoshi Ishii "Molecular Orientation Analysis of a Single-Monolayer Langmuir-Blodgett Film on a Thin Glass Plate by Infrared Multiple-Angle Incidence Resolution Spectrometry" Anal. Chem. 78(6), 1739 – 1742 (2006). (Accelerated Article)
- Takeshi Hasegawa, Hiroyuki Kakuda and Norihiro Yamada "Leucine-Fastener Formation Mechanism between Peptide β-Sheets in a Monolayer Studied by Infrared Multiple-Angle Incidence Resolution Spectroscopy" J. Phys. Chem. B 109(10), 4783 – 4787 (2005).

## (2)特許出願

発 明 者:長谷川健 発明の名称:分光解析装置 出 願 人:東京工業大学

- 出 願 日:平成 19 年 2 月 16 日(未公開)
- \*出願番号:特願 2007-037051

発明者:長谷川健

発明の名称:分光解析装置および分光解析方法

- 出 願 人:東京工業大学
- 出 願 日:2007年12月21日(未公開)
- \*出願番号:PCT/JP2007/001453

## (3)受賞

- · 平成 2007 年 11 月 第 7 回山崎貞一賞(計測評価部門)
- · 平成 2005 年 10 月 第 2 回堀場雅夫賞

(4)学会発表

#### 口頭発表(国際)

 Takeshi Hasegawa "Advanced Multiple-Angle Incidence Resolution Spectrometry for Thin-Layer Analysis on a Low-Refractive-Index Substrate" Pittsburgh Conference, New Orleans, LA, delivered on March 3, 2008.

- Takeshi Hasegawa "Analysis of Molecular Folding of Mycolic Acid Extracted from Living Bacteria by Infrared Multiple-Angle Incidence Resolution Spectrometry (MAIRS)" International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, Corfu, Greece delivered on June 14, 2007.
- Takeshi Hasegawa, Hiroyuki Kakuda, Norihiro Yamada "Characterization of Leucine Fastener Formed between Peptide b-Sheets by Infrared Multiple-Angle Incidence Resolution Spectroscopy" Pittsburgh Conference, Orlando, FL, delivered on March 2, 2005.

## 口頭発表(国内)

- ・ 長谷川健 "赤外 p-偏光 MAIR 分光法と実験最適化",日本化学会第 88 回春季年会(東 京)2008 年 3 月 27 日.
- ・ 長谷川健 "低屈折率基板上の薄膜を解析可能にする新しい赤外多角入射分解分光法", 日本分析化学会第56年会(徳島市)2007年9月19日.

### (5)招待講演

## 招待講演(国際)

- Takeshi Hasegawa "Multiple-Angle Incidence Resolution Spectroscopy: A Novel Concept of Optical Measurements for Thin-Film Analysis (Plenary Lecture)" Third International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS -3) (Delavan, WI) on August 14, 2005.
- Takeshi Hasegawa "Simultaneous Measurement Technique of In-Plane and Out-of-Plane Infrared Spectra in Ultrathin Films on a Dielectric Substrate Using a Concept of Virtual Light (Invited Lecture)" 3rd International Workshops on Vibrational Spectroscopy of Monolayer Films (Quebec City, Canada) on July 26, 2005.
- Takeshi Hasegawa "Multiple-angle incidence resolution spectrometry: A fruit of chemometrics (Invited Lecture)" (中国・上海)2004 年 10 月 17 日

## 招待講演(国内)

- ・ 長谷川健, "「多角入射分解分光法の開発と超薄膜の構造解析への応用」", 第7回山崎 貞一賞贈呈式(受賞講演), (日本学士院会館)2007年11月16日.
- ・ 長谷川健, "仮想光計測概念が拓く新しい界面分析", 日本分析化学会 第 55 年会:シン ポジウム企画「分光分析法の新展開」(大阪)2006 年 9 月 20 日.

## (B) その他の主な成果

- (1)論文(原著論文)発表 なし
- (2)特許出願 なし
- (3)著書

- Takeshi Hasegawa, Veeranjaneyulu Konka and Roger M. Leblanc "Vibrational Spectroscopy of Biological and Polymeric Materials" ed. by J. Mark Braiman and Vasilis Gregoriou (Taylor & Francis), pp. 99–162 (2006).
- ・ 長谷川健 "スペクトル定量分析", 講談社サイエンティフィク, 2005.(単著)

### 研究課題別評価書

1. 研究課題名

状態選別XAFS分光

2. 氏名

林 久史

3. 研究のねらい

X線吸収スペクトルにはしばしば、X線を吸収した元素のまわりの原子配置や、それによって定まる局所的な電子構造を反映した特徴的な構造が現れる。この構造をX線吸収微細構造(XAFS) と呼ぶ。XAFS は、元素選択性のある、局所的な電子・原子構造のプローブとして、物質、特に非 晶質の評価・分析に広く用いられている。

しかしXAFSにはいくつか弱点もある。そのひとつは、数eV(電子ボルト:1.602×10<sup>-19</sup>J)から数 10eVに至る、内殻寿命幅を超えた分解能での測定が原理的に不可能なことである。これは、例え ば高機能化を狙って少量の元素をドープした材料(高温超伝導材料や巨大磁気抵抗材料はその 好例)について、そのわずかな状態変化をXAFSで追跡する時に大きな制約となる。また、先端触 媒によく見られることだが、着目している元素が複数の化学状態で混在している場合は、XAFSに はその平均情報しか反映されない。これらの問題を克服できれば、XAFS分光法は材料開発・評 価において、さらに強力なツールとなるであろう。

本研究は、共鳴X線非弾性散乱(RIXS)と呼ばれる、吸収の閾値近傍で観測される微弱な発光 X線を利用することによって、上記の XAFS の弱点を乗り越え、「寿命幅による分解能制限のない、 状態別の XAFS(状態選別 XAFS)」を求め、これを実用材料の分析に応用することを目的とした。

4. 研究成果

状態選別 XAFS の試験的な測定は 1991 年に行われており(K.Hämäläinen et al, Phys. Rev. Lett. 67, 2850 (1991))、その意義は広く認められている(例えば F. de Groot, Chem. Rev. 101, 1779 (2001))。にもかかわらず、応用は進まなかった。その最大の原因は、RIXS の強度が弱いため、詳 細な解析に耐えうるデータの取得が困難だったことにある。そこで本研究ではまず、RIXS スペクト ルを 1eV 以下の高分解能で、かつ世界最高の感度で測定できるような X 線発光検出システムの 開発からはじめた。現在の X 線分光技術をもってすれば、1eV を切る高分解能化は、それほどの 難事ではない。しかし、この分解能を保ちながら、RIXS を十分な統計精度で測定することは実験 室では絶望的であり、SPring-8 のような高輝度放射光施設が供給する強力な励起光を利用して も、検出系に何らかの高感度化を施さない限り、困難である。X 線検出器自体の感度を大幅に向 上させることは、残念ながら当面望めないので、状態選別 XAFS 分光の成否は、高分解能分光器 を放射光に適合させつつ、どれほど高感度化できるかにかかっていた。放射光施設に持ち込み可 能で、高感度で高分解能という条件を満たす市販の分光器は存在しない。そこで研究期間 3 年の うち1年半を費やして、オリジナルの発光分光器を駆動プログラムも含めて設計・製作した。完成 した分光器全体の形状が、羽を広げた孔雀を連想させたので、「孔雀型」分光器と命名した。この 分光器を SPring-8 のビームライン BL-39XU にセットした写真を図1に示す。この分光器は、X 線

を分光・集光する「球面湾曲結晶」と 「X線検出器」のペアを共通の方位角 上に多数(現在は7組)並べたのが特 徴である。またこのペアを結ぶ光路を 真空排気して、空気による散乱・吸収 を抑制している。この分光器を用いる 事によって、図2に示したように、濃度 1%(自動車に使う実用触媒の濃度に相 当)の銅酸化物ナノクラスターについて、 「寿命幅を超えた高分解能 XAFS(LBS-XAFS)」の測定に成功した[1]。

図 2 には、8980eV 付近の「プリエッジ構 造」とよばれる弱い構造の拡大図も示した。 この構造は、本分光法によってはじめて観 測されたもので、銅の 1s 軌道から 3d 軌道 への遷移に帰属されているピーク (1s→3d)が、銅濃度の減少につれて、シフ トしている様子がうかがえる。濃度が数%以 下では、銅酸化物は数 nm 以下のクラスタ 一構造をとるが、図 2 の結果はナノ構造が 電子状態に影響していることを示唆してお り、大変興味深い。また分解能の向上によ り、プリエッジ以外の領域でも、濃度依存性 が顕著に現れている。これなら状態の「指



図1「孔雀型」X線発光分光器





紋」として十分に使える。今後の実用分析へのさらに幅広い応用が期待される。

実際、高温超伝導体(La<sub>2-x</sub>Sr<sub>x</sub>CuO<sub>4</sub>[2])や巨大磁気抵抗材料(LaMnO<sub>3</sub>[3])、混合原子価化合物 (GaCl<sub>2</sub>[4])など、比較的高濃度の試料については、状態選別XAFS法を適用して、それぞれ成果を あげてきている。例えば、Ho<sub>2</sub>O<sub>3</sub>を試料とした実験[5]では、状態選別XAFS分光による高分解能化 の極限に挑み、図 2 のようなプリエッジの、さらにその中にある微細構造の抽出に成功した。Ho (L<sub>3</sub>殻)の内殻寿命幅は約 4.3eVだが、上記の微細構造の観測には最低でも 0.5eVの分解能が必 要であり、通常XAFSの約 10 倍の高分解能化を達成したことになる。これにより、ランタノイドの 4f 軌道と 5d軌道の相互作用をより精度良く研究するための土台が整えられた。

XAFSの高分解能化の威力は、高温超伝導を示すプロトタイプ物質、La<sub>2-x</sub>Sr<sub>x</sub>CuO<sub>4</sub>単結晶(x=0、 0.15、0.29)の測定[2]においても発揮された。ここでは 1s2p (K $\alpha$ )RIXSが、結晶のc軸方向に対して

明確な異方性を示し、この異方的RIXSから導出された高分解能XAFSのプリエッジ領域には、Sr のドープ量(x)に応じて変化する、異方的な 1s-3d四重極遷移バンドが見出された。このバンドの 濃度変化の原因としては、Cu3dとO2p軌道の混成が考えられる。こうした微細な(しかし重要な)効 果は、状態選別XAFSでなければ検知できないものであり、あらためて本法の有効性が立証され た。

RIXS、ひいては状態選別XAFSの異方性は、代表的な巨大磁気抵抗材料、LaMnO<sub>3</sub>の単結晶に ついて、反強磁性体になる 45Kと常磁性体になる 273Kでスピン選別XAFSを測定した実験[3]にお いても重要な役割を果たした。反強磁性相で観測されたスピン選別XAFSの異方性は、遷移に伴 うスピン保存則に、Mn4p軌道とそれに隣接するMnの 3d軌道の混成とを組み合わせて解釈できた。 興味ぶかいことに、異方性を含めて、スピン選別XAFSスペクトルに温度依存性はほとんどなかっ た。この結果は、ニール温度よりもはるかに高温になっても、反強磁性的な秩序が残存しているこ とを意味する。一見、常識と矛盾しているこの結果は、「きわめて速い局所的なプローブ」という XAFSの特質で説明できた。つまりLaMnO<sub>3</sub>については、巨視的には常磁性である相でも、高速で 原子数個レベルの磁気秩序を観測すると、低温相特有の反強磁性的秩序が残っているというわ けである。この結果は、磁性研究に新たな示唆を与えるものであり、当該分野に大きなインパクト を与えた。この成果を基に、類似の系(La<sub>12</sub>Sr<sub>165</sub>Ca<sub>015</sub>Mn<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)への応用もはじめている[6]。

また 1 価Gaと 3 価Gaの混合原子価化合物であるGaCl<sub>2</sub>を試料とした実験[4,7]では、GaK β<sub>2</sub>線の RIXSを測定することで、Ga3 価を選別したXAFSの導出にはじめて成功した。この成果[4]は、掲載 雑誌(X線分析の進歩)に関する書評中で言及され(今城尚志,分光研究,55,273,(2006))、「内 殻寿命幅を超えた高い分解能で、価数ごとのX線吸収を得るという、最近までほとんど夢物語だっ たことが現実化したことを教えてくれる」と評された。

状態選別 XAFS 分光に対する関心は、最近ますます高まっているようである。そのことは、本研 究の総まとめとして作成したレビュー論文[8]が掲載号の「注目論文」に選ばれたことや、ごく最近 Oxford Science Publications から出版された本(W. Schülke, "Electron Dynamics by Inelastic X-Ray Scattering", 2007)の中で、本研究者が考案した「RIXS による高分解能化の原理図」など、 本研究の一部がおよそ 3 ページにわたって紹介されたこと、さらには、研究期間中に本研究者が 内外含めて 7 件もの招待講演を行ったことにも現れていよう。

現在、さらなる応用の拡大を目指して、状態選別 XAFS の理論的解析を深化させつつ、「孔雀型」分光器の高度化を検討している。また状態選別の新しい可能性を拓くため、新しい蛍光 X 線の化学効果の探索もはじめている。

【引用文献】

- Hisashi Hayashi, "Selective XAFS Studies of Functional Materials by Resonant Inelastic X-ray Scattering", AIP Conference Proceedings 882, 833 (2007).
- (2) Hisashi Hayashi, Tomofumi Adumi, Atsushi Sato, Rumi Takeda, Masaki Kawata, Yasuo Udagawa, Naomi Kawamura, Kazuyoshi Yamada, and Kazuhiko Ikeuchi, "Polarized lifetime-broadening-suppressed XANES study of La<sub>2-x</sub>Sr<sub>x</sub>CuO<sub>4</sub>", Rad. Phys. Chem. **75**, 1586 (2006).

- (3) Hisashi Hayashi, Atsushi Sato, Tomofumi Azumi, Yasuo Udagawa, Toshiya Inami, Kenji Ishii, and K.B. Garg, "Local spin-ordering in antiferromagnetic as well as paramagnetic LaMnO<sub>3</sub> phase revealed by polarized spin-selected 1s→3d absorption spectra", Phys. Rev. B **73**, 134405 (2006).
- (4) Hisashi Hayashi, Atsushi Sato, and Yasuo Udagawa, "Ga 化合物の寿命幅フリー・価数選別 XAFS", X線分析の進歩(Advances in x-ray chemical analysis) 37, 311 (2006).
- (5) Hisashi Hayashi, Masaki Kawata, Atsushi Sato, Yasuo Udagawa, Toshiya Inami, Kenji Ishii, Haruhiko Ogasawara, and Susumu Nanao, "Fine structure in quadrupolar transition of Ho L<sub>3</sub> pre-edge by lifetime-broadening-suppressed XANES spectroscopy", Phys. Rev. B, 72, 045114 (2005).
- (6) K. B. Garg, Hisashi Hayashi, A. Sato, T. Azumi, Y. Udagawa, Kenji Ishii, Toshiya Inami, and T. Chatterji, "Polarized SSXANES study of spin ordering in ferromagnetic and paramagnetic phases of La<sub>1,2</sub>Sr<sub>1.65</sub>Ca<sub>0.15</sub>Mn<sub>2</sub>O<sub>7</sub>", J. Mag. Magn. Mat. **320**, 1528 (2008).
- (7) Hisashi Hayashi, Masaki Kawata, Rumi Takeda, Atsushi Sato, Yasuo Udagawa, Naomi Kawamura, and Susumu Nanao, "Selective XANES spectroscopy from RIXS contour maps", J. Phys. Chem. Solids 66, 2168 (2005).
- (8) Hisashi Hayashi, "Lifetime-Broadening-Suppressed Selective XAFS Spectroscopy", Anal. Sci. 24, 15 (2008).

5. 自己評価

「X線吸収分光法-XAFS とその応用-(太田俊明編、アイピーシー、2002)」という X 線分光の教 科書の中に、状態選別 XAFS 法に関する次のような記述がある。「…(状態選別 XAFS 法)は、実 用分析にも電子状態の基礎理論にも多くの寄与が期待できる夢の分光学的実験法である。」本 研究は、高感度で高分解能な分光器を新規開発することによって、この「夢」の実現に挑んだもの である。その結果、成果①で紹介した書評がいみじくも「夢物語だったことが現実化したことを教え てくれる」と述べてくれたように、夢は実現できたと考えている。正直に言えば、これは、今回開発 した分光器の功績だけによるものではない。光源として選んだ SPring-8 が運よく研究期間中に高 機能化され、入射光強度が当初の見積もりより 10 倍近く増幅されたことも大きかった。おかげで、 分光器開発の途中段階でも、最終目標だった試料を次々と測定できた。一方、研究期間の半ば で所属が変わったことで、およそ半年近くブランクができてしまった事、さらに教育や委員会活動 のため、その後の実験にブレーキがかかってしまったのは遺憾であった。これがなければ、応用 の幅を期間内にもっと広げられたかもしれない。ただし振り返ってみると、この異動は必ずしもマイ ナス点ばかりではなく、分光法の理論的側面を見つめるよい機会も与えてくれた。それは、研究最 終年度における予想外の展開の萌芽ともなった。以上を総合すると、自己評価は80点というところである。

### 6. 研究総括の見解

Spring-8 の強力 X 線源と今回開発した「孔雀型」分光器と名づけた高感度・高分解能分光器を 組み合わせて状態識別 XAFS の実用化に挑んだ。主たる成果は次の2点である。

①自動車用銅酸化物触媒をサンプルとして局所的なクラスター構造を明らかとした。寿命幅を超 えた高分解能 XAFS 分光が可能なことを明らかとした。

②高温超伝導体や巨大磁気抵抗材料の単結晶をサンプルとして、スピンを選別した XAFS が可能なことを実証した。

これらにより寿命幅に制限されない状態選別 XAFS を実現し、本研究により初めて明らかになった結果を多く示した点は高く評価できる。

研究成果は 12 篇の原著論文、7 件の学会招待講演にまとめられている。またこれら成果により、 「平成 16 年度トーキン科学振興財団研究奨励賞」、平成 18 年度に「第 3 回堀場雅夫賞」を受賞し ている。

本研究により、状態選別 XAFS 分光は実用的な計測法として一歩を踏み出したといえる。今後、 この方法の有用性を示す応用研究が幅広い分野に拡がることを期待する。「孔雀型」X線分光器 はまだまだ発展途上であるが、今後さらなる高性能化が期待できるため、状態選別スペクトルもさ らに高分解になると予測され、材料分析分野の基盤技術としての有用性はますます高くなると考 える。

7. 主な論文等

#### (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

### 論文(国際)

 <u>Hisashi Hayashi</u>, Masaki Kawata, Atsushi Sato, Yasuo Udagawa, Toshiya Inami, Kenji Ishii, Haruhiko Ogasawara, and Susumu Nanao, "Fine structure in quadrupolar transition of Ho L<sub>3</sub> pre-edge by lifetime-broadening-suppressed XANES spectroscopy", *Phys. Rev. B* 72, 045114 (2005).

 <u>Hisashi Hayashi</u>, Masaki Kawata, Rumi Takeda, Atsushi Sato, Yasuo Udagawa, Naomi Kawamura, and Susumu Nanao, "Selective XANES spectroscopy from RIXS contour maps", *J. Phys. Chem. Solids* 66, 2168 (2005).

<u>Hisashi Hayashi</u>, Atsushi Sato, Tomofumi Azumi, Yasuo Udagawa, Toshiya Inami, Kenji Ishii, and K.B. Garg, "Local spin-ordering in antiferromagnetic as well as paramagnetic LaMnO<sub>3</sub> phase revealed by polarized spin-selected 1s→3d absorption spectra", *Phys. Rev. B* 73, 134405 (2006).

• <u>Hisashi Hayashi</u>, Tomofumi Adumi, Atsushi Sato, Rumi Takeda, Masaki Kawata, Yasuo Udagawa, Naomi Kawamura, Kazuyoshi Yamada, and Kazuhiko Ikeuchi, "Polarized lifetime-broadening-suppressed XANES study of La<sub>2-x</sub>Sr<sub>x</sub>CuO<sub>4</sub>", *Rad. Phys. Chem.* **75**, 1586 (2006).

· <u>Hisashi Hayashi</u>, "Lifetime-Broadening-Suppressed Selective XAFS Spectroscopy", Anal.

Sci. 24, 15 (2008).

(2)特許出願 なし

- (3)受賞
  - ・平成17年3月 平成16年度トーキン科学振興財団研究奨励賞

·平成18年8月 第3回堀場雅夫賞

(4) 著書 (国内)

 ・<u>林 久史</u>, 宇田川 康夫, "非弾性X線散乱分光", 太田俊明 ・ 横山利彦 編著, "内殻 分光-元素選択性をもつX線内殻分光の歴史・理論・実験法・応用-", (2007) 277, アイピーシー

### (5)学会発表

### 口頭発表(国際)

<u>Hisashi Hayashi</u>, Tomofumi Adumi, Atsushi Sato, Rumi Takeda, Masaki Kawata, Yasuo Udagawa, Naomi Kawamura, Kazuyoshi Yamada, and Kazuhiko Ikeuchi, "Polarized temperature dependent lifetime-broadening-suppressed XANES study of La<sub>2-x</sub>Sr<sub>x</sub>CuO<sub>4</sub>", X05: X-ray and Inner-Shell Processes, 2005

### 口頭発表(国内)

・<u>林 久史</u>, "高感度・高分解能「X線発光」測定が切り開く、新しい「X線吸収」分光", 第41回 X線分析討論会, 2005

・<u>林 久史</u>,河村直己,大沢仁志,"「忘れられた蛍光X線」EuLγ₄の化学効果",第 21 回日
 本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム,2008

## ポスター発表(国際)

 <u>Hisashi Hayashi</u>, "Lifetime-broadening-suppressed XANES spectra of metal complexes", IXS2007 (The 6th International Conference on Inelastic X-ray Scattering), 2007

· <u>H. Hayashi</u> and K. Okada, "Chemical Effects on Valence→L Emission of Lanthanide Compounds", The 19th International Congress on X-ray Optics and Microanalysis and the 43rd Annual Conference on X-ray Chemical Analysis, 2007

## (6)招待講演

### 招待講演(国際)

<u>Hisashi Hayashi</u>, "Selective XAFS spectroscopy by resonant inelastic x-ray scattering",
 2005 環太平洋国際化学会議(Pacifichem2005), 2005

 <u>H. Hayashi</u>, "Selective XAFS Studies of Functional Materials by Resonant Inelastic X-ray Scattering", 13th International Conference on X-ray Absorption Fine Structure (XAFS13), 2006 <u>H. Hayashi</u>, "Resonant Inelastic X-ray Scattering spectroscopy for advanced XAFS studies", 66th Okazaki Conference: International Workshop on Soft X-ray Raman Spectroscopy and Related Phenomena (IWSXR), 2006

 <u>H. Hayashi</u>, "Lifetime-Broadening-Suppressed, Selective Absorption Spectroscopy by Resonant Inelastic X-ray Scattering", The 20th International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS), 2006

# 招待講演(国内)

·<u>林 久史</u>, "選択的XAFS分光", 第 19 回日本放射光学会年会, 2006

## (B) その他の主な成果

なし
### 研究課題別評価書

1. 研究課題名

超分子化学に基づく修飾タンパク質の蛍光分析法の開発

2. 氏名

林田 修

3. 研究のねらい

細胞核内のヒストンは DNA を巻き付ける役目を担う塩基性の球状タンパク質であるが、その表 面のリジン残基はメチル化やアセチル化などの翻訳後修飾を受け易いことが知られている。これ らの翻訳後修飾は癌関連遺伝子の発現を調節するなどの重要な役割を果たすことから、これらを 特異的に認識して検出できる新規な蛍光分析法の開発が切望されている。そこで、本研究では有 機合成化学および超分子化学の手法に基づいて、ヒストンならびにその翻訳後修飾を特異的に 認識・検出できる蛍光性人工ホストを開発することを目標に掲げた。すなわち、ヒストンが表面に塩 基性アミノ酸残基を高密かつ大量に有する特徴的なタンパク質であることに鑑み、静電相互作用 が期待できるアニオン性のレゾルシナレン誘導体(R1)を結合ユニットとして採用し、これを組み込 んだ種々の人工ホストを開発することでヒストンならびに修飾ヒストンに対する特異的な認識を目 指した。さらに、蛍光基を導入した人工ホストも独自に分子設計し開発することによりこれらヒスト ンに対する蛍光検出を目指した。

4. 研究成果

### 4-1. クラスター効果を利用した人工ホストによるヒストン認識

生体系ではレセプターとリガンド間の個々の相互作用力は弱いけれども、多価にクラスタリング することによって極めて強い結合親和性と分子認識を発現するいわゆるクラスター効果が知られ ている(後述)。そこで、このクラスター効果を人工ホストに利用することとして、多数の結合ユニッ トを有するレゾルシナレンテトラマー(R4)およびレゾルシナレンドデカマー(R12)を分子設計し、合 成した(図1)。本研究で合成した全ての新規化合物は元素分析により純度を確認した。ヒストンへ の結合挙動は SPR 法(Biacore)を用いて検討した。レゾルシナレン単量体 R1 はヒストンへの結 合力が弱いのに対して、テトラマーやドデカマーではクラスター効果を発揮して結合定数(*K*)に著 しい増大が認められた(図2)。一方、参照実験として同程度の負電荷を有するポリアクリル酸で はほとんど結合しないことから、ヒストン結合にはレゾルシナレンの剛直な環状構造が重要である ことも示された。さらに、ヒストンへの結合特異性に関して、リゾチームやオボアルブミンなどその 他のタンパク質に対しては有意な結合力を示さないことから、ヒストンに特有の塩基性表面を認識 することにも成功した。また、人工ホスト R4 および R12 が蛍光性ゲストを取り込むことが可能なシ クロファン部位を有していることを利用して、ヒストンへのゲストデリバリーよる蛍光検出も行った。 加し蛍光スペクトルの変化を追跡したところ、蛍光強度にして約 20 %の応答が観測され、ヒスト ンを蛍光検出できることが示された。



図1. レゾルシナレン(R1)とレゾルシナレンテトラマー(R4)およびドデカマー(R12)



The K values of hosts with immobilized histone

図2. ヒストンとの結合挙動における SPR センサーグラム(左)と結合定数(右)

## 4-2. 蛍光基を有する人工ホストによるヒストン検出

蛍光分光法によるヒストン検出のために、蛍光基としてダンシル部位を導入したレゾルシナレン オリゴマー R3Dを合成した(図3)。人工ホストR3Dの水溶液にヒストンを添加したところ、R3Dの蛍 光スペクトルは蛍光極大波長の短波長シフトを伴って蛍光強度が増大した(図4)。ヒストンの滴定 における蛍光強度の応答は典型的な複合体形成を示す飽和挙動を与えたことから、結合定数が 2.1 × 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> と算出され、十分に実用レベルであることがわかった。一方、参照実験としてレゾル シナレンの結合ユニットを欠いた蛍光性ホストの場合には、このような特有の蛍光スペクトル変化 は観測されなかった。また、塩基性タンパク質であるリゾチームや、アルブミン、コンカナバリンAな どに対する蛍光滴定実験を同様に行ったところ、ヒストンでみられたような顕著な蛍光応答を示す ことはなかった(図4)。また、化学的手法によりアセチル化したヒストンに対してホストR3Dは蛍光 応答を全く示さず、ヒストンのアセチル化を識別できることも見出した。化学的修飾であるが、ヒス トンとアセチル化ヒストンの違いを厳密に識別し、蛍光応答した初めての例と言える。これらの結 果から、ホストR3Dはヒストンの表面に密に配置した塩基性アミノ酸残基を認識し、結合にともなう 微視的環境の変化を蛍光スペクトルの変化として検出できることがわかった。



図3. 蛍光基を有する自己ホスト(R3D)



図4. ヒストン滴定における R3D (0.5 µM)の蛍光スペクトル変化(左)およびヒストン特異性(右)

### 4-3. 人工ホストを用いたクラスター効果の定量的解析

本研究においてクラスター効果は、ヒストンならびに修飾ヒストンに対する優れた人工ホストを開 発する上で最も重要な分子設計の理念である。しかしながら、細胞表層レセプターとリガンドとの あいだで認められるクララスター効果は、生体系の複雑さや不安定さのために定量的な解析はこ れまで一切なされていなかった。本研究では、結合ユニットをいくつ連結すれば十分な結合力が 得られるのかを予め把握する必要があったので、その機能モデルとしてシクロファン(C1)を基体と したシクロファンオリゴマーを系統的に合成し、ゲスト分子への結合能におけるクラスター効果を 定量的に評価した。具体的には、シクロファンを2つ、3つ、5つ連結したシクロファンオリゴマー (C2, C3, C5)を合成した(図5)。さらに17個のシクロファンを連結したシクロファンヘプタデカマー (C17)も合成した。これらシクロファンオリゴマーの蛍光性ゲスト(TNS)に対する結合能を蛍光滴 定法および SPR 法を用いて定量的な評価を行った。その結果として TNS に対する結合定数を 比較したところ、C2, C3, C5 はそれぞれ C1 の13倍、24倍、1200倍に増大することがわかった (図6)。ホスト C17 では、更にゲスト結合力が1600倍に向上することも見出した。速度論的な解 析から、結合と解離に伴う速度定数がシクロファンの連結数が増えるに従って大きく変化すること も明らかにした。これらの結果はヒストンなどへの結合能を向上させるための人工ホストの分子設 計指針にフィードバックし、重要な成果を得ることができた。



図5. シクロファン(C1)とシクロファンオリゴマー(C2, C3, C5)



図6. シクロファンオリゴマーのゲスト捕捉におけるクラスター効果: ホスト C3 添加における TNS (1µM)の蛍光スペクトル変化(左)および結合定数(右)

### 5. 自己評価

遺伝子の発現調節に係わるヒストンに対して特異的に結合できる人工ホストの合成に成功した。 人工ホストによるヒストンの認識においては、結合ユニットのクラスター化と剛直な環状構造が重 要であることを実証できた。人工ホストと蛍光性ゲストからなる超分子を用いてヒストンを蛍光検 出できることも示した。また、蛍光基を導入した人工ホストも合成し、ヒストンの特異的な蛍光検出 のみならず、ヒストンのアセチル化を識別することにも成功した。一方、ヒストンのメチル化に対す る蛍光検出に関しては、当初計画とおりに進行せず研究期間内で公開できる成果までには至らな かったのが残念である。本研究で得られた成果は、修飾ヒストンなどの標的タンパク質の表面を 認識し検出するための新規人工ホストの分子設計と開発に関して重要な指針を与えるものと考え る。

6. 研究総括の見解

塩基性球状タンパク質であるヒストンはメチル化やアセチル化などの翻訳後修飾を受けやすい。 ヒストンおよびその翻訳後修飾を特異的に認識する人エホストを開発することを目的とした提案で、 多種の人エホスト化合物を合成し、ゲストであるヒストンに対する特性を調べている。主たる成果 は次の3点である。

- レゾルシナレンオリゴマーのクラスター効果を利用してヒストンの認識を可能とした。また、人 エホストを用いてゲストをヒストン表面までデリバリーできることも示した。
- ② 蛍光ラベルしたホストを合成し、ヒストンの特異的蛍光検出も可能とした。同じ蛍光性ホストを 用いてヒストンの酵素によるアセチル化反応の追跡にも成功した。
- ③ 最新の成果として、ロタキサン型の蛍光ホストを合成し、ヒストン認識と蛍光検出に成功して いる。

研究成果は11篇の原著論文、5件の学会招待講演にまとめられている。

研究者はヒストンに結合するホスト分子合成に多大の努力を費やしており、興味ある多くの成 果をあげている。当初の課題であったメチル化ヒストンの検出も今後可能になると期待できる。大 腸癌などの疾患に関わっているとされるヒストンの異常メチル化などに対する分析法として期待さ れるとともに、超分子化学を駆使した基礎研究として学術的にも高く評価できる。

7. 主な論文等

#### (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

- O. Hayashida, A. Kitaura, "Synthesis of Water-soluble Tris(cyclophane) Hosts and Surface Plasmon Resonance Study on Guest-binding Interaction with Immobilized Guest", Chem. Lett., 35, 808-809 (2006).
- · O. Hayashida, M. Uchiyama, "Cyclophane-based Tetra(resorcinarene) as A Host for Both

Histone and Hydrophobic Molecular Guest", Tetrahedron Lett., 47, 4091-4094 (2006).

- O. Hayashida, N. Ogawa, M. Uchiyama, "Surface Recognition and Fluorescence Sensing of Histone by Dansyl-Appended Cyclophane-based Resorcinarene Trimer", J. Am. Chem. Soc., 129, 13698–13705 (2007).
- O. Hayashida, M. Uchiyama, "Multivalent Macrocyclic Hosts: Histone-surface Recognition, Guest Binding, and Delivery by Cyclophane-based Resorcinarene Oligomers", J. Org. Chem., 72, 610-616 (2007).
- O. Hayashida, D. Sato, "Preparation and Multivalently Enhanced Guest-binding Affinity of Water-soluble Cyclophane Heptadecamers", J. Org. Chem. Soc., in press.

#### (2)特許出願 なし

- (3)著書
- O. Hayashida, "Syntheses and Functionalization of Nano-sized Water-soluble Azacyclophanes, "Bottom-up Nanofabrication: Supramolecules, Self-assemblies, and Organized Films," ", ed by K. Ariga, American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, in press.

## (4)学会発表

#### ポスター発表(国際)

- Osamu Hayashida, Masaki Uchiyama "Cyclophane-based Multi(resorcinarene) as a Guest-carrier for Histone", Post-IUPAC Symposium of ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International Conference (The Fukuoka Symposium), 2006
- O. Hayashida, M. Uchiyama and N. Ogawa, "Histone-surface Recognition by Multivalent Macrocyclic Hosts", 12th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, 2007
- O. Hayashida, A. Kitaura and D. Sato, "Surface Plasmon Resonance Study on Guest-binding Interaction with Immobilized Guests", 12th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, 2007
- O. Hayashida, A. Kitaura, and D. Sato "Synthesis of Water-soluble Polytopic Cyclophanes and Multivalency Effects in Macrocycles". The 2nd International Conference on Joint Project of Chemical Synthesis Core Research Institutions, 2007
- O. Hayashida, D. Sato, N. Ogawa, M. Uchiyama, "Design and Properties of Functionalized Cyclophanes as a Multivalent Host", Singapore International Chemistry Conference 5 (SICC-5), 2007.

(5)招待講演 招待講演(国際)

- O. Hayashida, "Synthesis and Properties of Functionalized Cyclophanes as a Multivalent Host and Carrier", International Symposium on Biotechnology, Metal Complexes and Catalysis, 2006
- O. Hayashida, "Guest-binding, Delivery, and Protein Surface Recognition by Functionalized Cyclophanes", The 2nd International Symposium on Functional Innovation of Molecular Informatics, 2006
- O. Hayashida, "Guest-capturing, Delivering, and Protein Surface Recognition by Functionalized Cyclophanes", 3rd International Forum: New Waves in Supramolecular Chemistry and Superstructured Materials, 2006
- O. Hayashida, M. Uchiyama, N. Ogawa, "Synthesis and Characterization of Functionalized Cyclophanes as a Multivalent Host and Carrier", Post ISNA-12 Symposium on Physical Organic Chemistry in Fukuoka, 2007

### (B) その他の主な成果

なし

### 研究課題別評価書

1. 研究課題名

マイクロ流体界面計測法の開発

2. 氏名

火原 彰秀

3. 研究のねらい

化学装置を数 cm 角のマイクロチップ上の微小流路(マイクロチャネル)に集積化する研究が、 近年急速な勢いで進展している。この技術は、分析化学に有用なだけでなく、一般的な化学操作 の自動化・効率化に発展する可能性がある。化学操作の微小化に伴い、分離場・反応場としてマ イクロスケール油水二相系およびその界面が重要であると考え、詳細に研究を進めてきた。

本研究開始以前に、マイクロ多相流体制御と液液界面現象解析に取り組み、予測とは異なる 流線などの特異現象を数例見いだしたが原因は未解明であった。これらの特異現象を解明する ことは、基礎化学的に重要な知見を与えるだけでなく、抽出効率向上などマイクロ化学プロセスの 高度化に繋がると期待できる。

本研究は、マイクロ油水平行ニ相流の特異現象解明のために、ニ相流形成の流体力学モデル を詳細に解析すると同時に、界面近傍ナノメートルオーダーの特性を計測する顕微輻射圧界面変 位法を開発することをねらった。計測法部分では、流れと相互作用する液液界面特性の詳細解析 には、能動的に界面に摂動を加える計測手法が有効と期待した。

4. 研究成果

【研究の経緯と本研究の目的】 ガラス製マイクロチ ップの例を図1に示す。このチップは、幅 300 µm、深 さ 200 µm のマイクロチャネルを持つ。マイクロチャ ネル中で安定して油水が流れるように、マイクロチャ ネル壁面を親水/疎水の表面修飾パターニングし ている。このマイクロチャネルを用いて、水と油が層 流条件で対向して流れる「マイクロ油水向流」を実現 した。また、油水間での物質の分配を利用した向流 抽出も実現した。向流抽出は、分析化学の前処理 技術としての発展が期待できる手法である。

さらに、マイクロ向流における流線を粒子画像流 速測定(PIV)法により解析したところ、レイノルズ数 1程度の層流条件であるにもかかわらず、渦流やら せん流が観測された(図2)。なぜこのような「渦流」



図1 ガラス製マイクロチップの例。マ イクロチャネルは、油水二相流安 定化のため、親水/疎水の表面修 飾パターニングした。

や「らせん流」が発生するのか、ま たこれらを化学プロセス向上に利 用できると着想した。本研究では、 これらの疑問を解決するため、マイ クロ多相流体における特異現象を 解明する手法・ツールを開発し、マ イクロ化学プロセスの新しい設計 指針を得ることを目的とした。具体 的には、①マイクロ多相流体の物 理モデルの構築と実証、②マイクロ 流体中液液界面を計測する新規レ ーザー分光法開発に取り組んだ。

【多相流の物理モデル】まずマイ クロ向流が形成される油水二相間 の圧カバランスモデルを構築し、特 異流れが観測される条件の解析に 取り組んだ。

圧力の高低により流れが発生する基本的メカ ニズムから、油水向流中の水相・有機相の圧力 を予測すると図3のようになる。水相・有機相とも に下流に行くほど、粘性による圧力の損失(圧力 損失)により低圧となる。したがって、油水が接し ている部分では、油水間の圧力差(動圧差)が場 所に依存して変化する。ここで、この動圧差を界 面の変形による圧力(ラプラス圧)が補償し、バラ ンスを保つというモデルを立てた。液液界面は円 弧形状をしており、液液固三相接触の接触角は 前進接触角から後退接触角の間で可変であると 考えた。このモデルに従うと油水向流中で、ラプ ラス圧は、前進(あるいは後退)接触角に対応す る曲率で極大値をとり、これ以上の動圧差が生じ ると三相接触線が動くため、油水向流が形成でき ないはずである。水/トルエンニ相流において向 流形成条件を実験的に確認したところ、図4に示 す通り理論と実験はよく一致し、モデルの妥当性 が検証された。



図2 マイクロ向流中層流条件におけるカオス的渦 流発生のイラスト(左)と写真(右)。





界面の断面形状は、単一の円弧と考 えられたが、水 1 μl/min・トルエン 1 μl/min の条件では図5のように三つの 円弧で表される形状となることが観測さ れた。この形状からは、断面内での圧 カ勾配が示唆され、単純な層流だけで なく「らせん流」や「渦流」が存在するこ とも示唆された。しかし、何故このような 圧力バランスが存在するのか解析する ためには、ミクロレベルでの解析が必要 である。

【新規顕微レーザー分光法による解析】

ここでは、マイクロ流体中の厚み1ナノ メートル程度の油水界面における液液 界面強制振動を解析する新しい顕微分光 法を開発し、ミクロな観点から液液界面の 特性を解析した。この方法を、顕微輻射圧 界面変位(μRaPID)法と名付けた。本法の 原理を図6に示す。励起光の液液界面にお ける輻射圧により界面を変位させ、その変 位による運動をプローブ光の増減から観測 する。

励起光とプローブ光を同じ点に集光する と、強制振動を波源で観測することになり、 界面張力と粘性が解析できる。実際に、界 面活性剤を加えた油水界面における臨界ミ セル濃度での界面張力決定にµRaPID法を 用いることができることを示した。

励起光とプローブ光の相対位置を流れ 方向に調整することにより、流れと強制振



顕微輻射圧界面変位法の原理。(a)励起光によ る界面変位。励起光の強度変調により、界面強 制振動を印加。(b)プローブ光による変位の検 出。ピンホール設置により光の偏向変化を光量 変化として検出。



図7 プローブ光を励起光の20 μm 下流に設定 した μRaPID 測定結果。横軸は剪断応力 であり、油水流量比により制御。縦軸の信 号強度は 20 μm 伝搬した強制界面張力 波の振幅に対応。

動波伝搬の関係を解析した。このとき親水/疎水塗り分けを持つマイクロチャネルは、流量比を 広い範囲で制御可能である点を利用すると、液液界面に印加する流速勾配(剪断応力)を制御可 能である。マイクロチャネル中の水/トルエン界面を解析した結果、界面における剪断応力が大 きくなるほど、強制振動波が伝搬されやすい現象が観察された(図7)。この結果は、界面近傍ナ ノメートルスケールの空間において、流れの影響で粘度が小さくなっている(ずり流動)と解釈でき る。ずり流動は一般に高分子液体で観測される現象であり、水やトルエンのような低分子の溶媒 では観測されない。ナノメートルスケール界面においてこのような現象が観測されたことは、基礎 科学的に重要であるだけでなく、溶媒抽出効率向上に向けたマイクロ化学プロセス設計に重要な 意味を持つ。また、圧カバランスモデル解析で得られた特異な界面形状(3つの円弧断面形状) の流量条件で uRaPID 測定したところ、ずり流動の効果が顕著に現れることを見いだした(図7中 矢印)。このことは、液液界面におけるずり流動現象が剪断応力だけでなく、流速などのパラメー タにも依存していること示唆しており、今後分子論的解析を進める上で重要な知見と言える。 【まとめ】本研究では、マイクロ多相流体における特異現象を解明する手法・ツールを開発し、マ イクロ化学プロセスの新しい指針を得ることを目的とし、①マイクロ多相流体の物理モデルの構築 と実証、②マイクロ流体中液液界面を計測する顕微輻射圧界面変位法の開発に取り組んだ。研 究の流れをまとめると図8のようになる。以上の2つのアプローチを総合すると、マイクロ流体の特 異流れが、液液界面におけるずり流動(分子相互作用低下)により起こることがはじめて示唆され た。低分子溶媒について、剪断速度と分子相互作用の関係を報告した例はなく、マイクロ流体に 特徴的な現象と考えている。また、計測法の観点からは、微小空間の界面を計測する新規手法 の開発に成功し、界面張力測定などマイクロ流体科学では従来困難だった計測を可能とした。さ らに、物理モデル構築の結果、従来経験に頼っていたマイクロ多相流プロセスの設計に必要なパ ラメータを明らかにし、設計する手順を明らかにした。今後、これまでよりもさらに高度な集積化学 デバイスの実現が期待できる。



## 5. 自己評価

本研究は、当初(1)顕微輻射圧界面変位法の開発、(2)マイクロニ相流体の特異現象の解明、 (3)他の顕微分光法との組み合わせおよびバイオ分析への応用、の3点を目標として掲げた。 (1)の顕微輻射圧界面変位法の開発では、当初想定していた結果が得られ、マイクロニ相流体 を十分に解析することができた。マイクロ空間中の液液界面を計測する手法としては、自身がさき がけ研究前に開発した顕微準弾性レーザー散乱法に続き2例目であり、特徴のある計測システ ムの開発に成功した。(1)および(2)の項目に関連して、当初は想定していなかった「流体物理モ デル」の構築に成功した。これは、流れているマイクロニ相流の界面における圧力のバランスを考 えなければ、現象を理解できないとの動機から派生したものである。結果的には、基礎・応用両面 にとって重要な、大きな想定外の成果を上げることができた。これを踏まえ、(2)の特異現象解明 では、界面の特異的な液液界面形状と界面張力波伝搬が観測され、本研究で解明を目指した「う ず流」「らせん流」と繋がっていることを強く示唆することができた。さらに理解を進めるためには、 剪断応力のかかった液液界面における分子論的な理解が必要であることを明らかにした。これら より、当初想定していたレベルまで、現象を解明できたと考えている。(3)については、本研究期 間中には達成に至らなかったが、(1)で開発した手法の有効な応用先としてリン脂質膜などが考 えられ、これまで計測出来なかった局所の強制振動から新しい生命現象の解明が可能になると 期待している。以上を総合すると、さきがけ研究3年間により、想定外の成果も得られ、今後の研 究につながる独創的な研究成果が得られたと考えている。

6. 研究総括の見解

マイクロチップ上に作製したマイクロ流路内での油水2相流界面における振動・波動現象を計 測する顕微分光法を開発し、マイクロ流体特性の解明に取り組んだ。主たる成果は次の2点であ る。

①顕微輻射圧界面変位(µRaPID)法と名づけた顕微レーザー分光法を開発し、マイクロ流路内での油水2相流界面における剪断応力を変化させて界面の特性を測定し、強制振動波の伝搬現象を観測した。

②マイクロ多層流体の物理モデルを構築し、ナノ流体液液界面でのずり流動によりマイクロ流体 の特異流れが説明できることを明らかにした。

論理的で独創的な研究手法により、液-液界面の実験方法と解析結果に興味深い成果を得て いる。未知の研究領域であるマイクロ多相流に関して、ダイナミックな基礎物性を着実に把握しつ つあることは高く評価できる。

研究成果は5篇の原著論文、3件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づく 特許1件を出願している。

今後、µRaPID 法の測定原理と流体の分子論の間の整合性を明確化し、界面現象解明の方法 論としてその普遍性をより強く主張することが望まれる。また、その有用性を示す適用例を増やし て行くことも重要である。本研究がもたらす界面現象に関する新しい知見は、化学マイクロチップ の設計指針として性能改善に貢献することは明白であり、かつ重要である。

7. 主な論文等

### (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

## 論文(国際)

 "Surface Modification Method of Microchannels for Gas-Liquid Two-Phase Flow in Microchips", Akihide Hibara, Shinobu Iwayama, Shinya Matsuoka, Masaharu Ueno, Yoshikuni Kikutani, Manabu Tokeshi, and Takehiko Kitamori, *Analytical Chemistry*, **77(3)**, 943-947 (2005).

- "Supercooled micro flows and application for asymmetric synthesis", Shinya Matsuoka,
   Akihide Hibara, Masaharu Ueno, Takehiko Kitamori, *Lab on a Chip*, 6(9), 1236–1238 (2006).
- "Countercurrent Laminar Microflow for Highly Efficient Solvent Extraction", Arata Aota, Masaki Nonaka, Akihide Hibara, Takehiko Kitamori, *Angewandte Chemie International Edition*, 46(6), 878–880 (2007).
- "Pressure balance at the liquid-liquid interface in micro counter-current flows in microchips", A. Aota, A. Hibara, and T. Kitamori, *Analytical Chemistry*, **79**(10), 3919–3924 (2007).
- "Flow Velocity Profile of Micro Counter-Current Flows", Arata Aota, Akihide Hibara, Kyosuke Shinohara, Yasuhiko Sugii, Koji Okamoto, Takehiko Kitamori, *Analytical Sciences*, 23(2), 131–133 (2007).

#### (2)特許出願

国内特許 1件(未公開)

- (3)著書
- ・上野雅晴, 火原彰秀, 北森武彦, "マイクロ化学", 表面科学(日本表面化学会), 26(2), 74-81, 2005

(4)学会発表

## 口頭発表(国際)

- Akihide Hibara, Takeshi Ikemoto, Takehiko Tsukahara, Kazuma Mawatari, Takehiko Kitamori,
   "Characterization of liquid-liquid interface properties in microchannels by microscopic radiation pressure interface deformation method", Pacifichem2005, 2005.
- Akihide Hibara, Mari Nonogi, Takehiko Kitamor, "Microchip titration by utilizing Laplace valve", The 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science (MicroTAS2007), 2005

## ポスター発表(国際)

- Akihide Hibara, Takeshi Ikemoto, Kazuma Mawatari, Takehiko Kitamori, "Microscopic radiation-pressure interface deformation method for characterization of micro liquid interfaces", The 9th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science (MicroTAS2005), 2005.
- Akihide Hibara, Arata Aota, Masahumi Asakawa, Takehiko Kitamori, "Characterization method of liquid interfaces in micro multiphase flow in microchannel", International Congress on Analytical Sciences (ICAS2006), 2006
- · Arata Aota, Akihide Hibara, Yasuhiko Sugii, Takehiko Kitamori, "Pressure balance at liquid-liquid interface of micro counter-current flow for phase separation", The 10th

International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science , 2006

(5)招待講演

# 招待講演(国内)

- ・火原彰秀、"マイクロチップ化学とマイクロ多相流"、第 24 回キャピラリー電気泳動シンポジ ウム、2004
- ・火原彰秀、"マイクロチップ化学を計測する顕微レーザー分光法"、第三回レーザーアラ イアンスシンポジウム、2005
- ・火原彰秀、"マイクロ・ナノ流体の制御と解析"、日本化学会東海支部若手研究者フォーラム、2007
- (B) その他の主な成果

なし

### 研究課題別評価書

1. 研究課題名

核酸ポリメラーゼ解析とDNA1分子シーケンスへの応用

2. 氏名

平野 研

3. 研究のねらい

来るべきゲノム医療などを実現するために、個々人や多種生物のゲノム情報を瞬時にして取り 出す超大規模シーケンスの実現が求められている。しかし、現在のDNAシーケンス解析技術で は、一人分のヒトゲノムを解析するのに、数百台のキャピラリーアレイDNAシーケンサーを用いて も3ヶ月程度を要するのが現状である。そこで、現在のゲノム解析のように、キャピラリー電気泳 動を高度に並列処理する事で解析量を向上させるのではなく、解析手法そのものを高速化すると いった、これまでにない革新的なシーケンス手法が求められている。

そこで、本研究課題では、この問題を解決するために、DNAポリメラーゼによる合成反応を直接 リアルタイムで検出することでDNA1分子から塩基配列を読み取り、高速なシーケンスを行うこと を試みた。

4. 研究成果

①原理: DNAポリメラーゼの合成反応を直接観察する1分子シーケンスの手法は、各塩基に対応した蛍光色素を標識した4種類(アデニン、グアニン、チミン、シトシン)のデオキシリボヌクレオシド三リン酸(dNTP)がDNA合成中に取り込まれる様子を全反射顕微鏡により検出をすることで行う(図1)。合成により1塩基ずつ取り込まれた塩基は、エバネッセント照明の領域に入るため、塩基に標識した蛍光色素1分子が蛍光を発し、次いで退色する。この蛍光の発光と退色の繰り返しを、取り込まれた各塩基に標識した色素の蛍光波長を識別しながらリアルタイムに検出を行うことで、DNA1分子からのシーケンスを行う。当該手法を達成するためには、(1)蛍光標識 dNTP を取り込むDNAポリメラーゼを探索し、取り込み活性の機能解析を行い、(2)蛍光色素1分子を4つ



図1

の 蛍光波長でリアルタイムに観察を行う 全反射顕微鏡を開発する必要がある。その結果を以下に 示す。

②蛍光標識dNTPを連続して取り込み可能なポリメラーゼの機能解析と最適基質の検討:

DNAポリメラーゼは基質に対して厳密であるため、DNAポリメラーゼによる1分子シーケンス法 では、蛍光標識されたアナログであるヌクレオチドを効率的に取り込む酵素を用いる必要がある。 且つシーケンスを行うためには、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性のないDNAポリメラーゼを用いな くてはならない。そこで、様々な3'→5'エキソヌクレアーゼ活性のないDNAポリメラーゼについて蛍 光標識 dNTP の取り込み活性を評価した結果、ラット由来の修復酵素が効率よく連続的に蛍光標 識した dNTP を取り込むことが判明した。続いて当該酵素を用いて、効率よく取込み可能な蛍光色 素の種類についてスクリーニングを行い、酵素的に至適な標識蛍光色素の決定を行った。さらに 1分子蛍光観察では、蛍光強度が大きく、退色の特性が良いなど条件が必要となるため、酵素的 に至適であった蛍光色素を更に顕微鏡的に至適なものに絞り込みを行い蛍光標識 dNTP の種類 を決定した。

③マルチカラー全反射顕微鏡の開発:

蛍光色素1分子の蛍光は、極めて微弱であるため全反射顕微鏡を用いても4種類の蛍光色素 をリアルタイムに識別するためには、新たに光学系を構築する必要があった。S/N 比を向上させ るために光学フィルターの種類やメーカーを吟味して検討を行い、励起光の迷光によるノイズ(バ ックグラウンド)等の低減を図った。また、検出する蛍光の損失に影響を与えているレーザー励起 光を対物レンズに導入するためのダイクロイックミラーを、通常用いられる誘電体多層膜から独自 のダイクロイックミラーを用いることで検出感度を向上させ、改良の余地はあるものの4種類の蛍 光色素1分子をリアルタイムで検出する光学系を構築した。

④リアルタイム1分子シーケンス:

上記検討項目を踏まえて、2種類の蛍光色素で標識した基質(dUTP および dCTP)を用いて、AG の繰り返し配列を持つテンプレートで、リアルタイムに DNA ポリメラーゼ合成を検出することに成 功した結果を図2に示す。現在はさらに3種類の蛍光色素を標識した基質(dUTP, dGTP および dCTP)を用いて、検出することに成功している。しかし、合成可能鎖長などを吟味する必要があり、 特に合成持続長に影響を与える問題の一つとして、鋳型オリゴ DNA が Mg イオンなどの影響によ ってガラス基板表面に吸着されてしまう問題が、長鎖状 DNA1分子の観察から判明した。現在、 表面処理を検討し合成持続長を延長しつつ、4種類の塩基でのDNA合成のリアルタイム検出を 目指している。

現時点では、3種類の蛍光色素を標識下塩基での検出であるが、今後4種類の塩基を検出する ことで、1分子DNAシーケンスを達成していきたいと考えている。将来的には、これらの1分子シ ーケンスの測定を、マイクロやナノの微小流路内で検出する事が可能であるため、従来のような 数百台のキャピラリーアレイ自動シーケンサーを列べた「解析工場」とは異なり、マイクロ・ナノデ バイス技術による解析技術の集積化を行い、従来の自動シーケンサーよりも小型で高速なナノシ ーケンサーの構築を目指していきたい。



义	2

#### 5. 自己評価

各々異なった蛍光色素1分子を標識した 4 種類の dNTP(アデニン、グアニン、チミン、シトシン) がDNA伸長合成中に鋳型 DNA へ取り込まれる様子を全反射顕微鏡によりリアルタイムに検出を することで DNA1 分子シーケンスを目標とした。そのために、蛍光標識 dNTP を連続して取り込む DNA ポリメラーゼの探索と機能解析を行い本研究に最適な酵素を見いだし、4種類の蛍光色素1 分子を同時にリアルタイムに観察できる全反射顕微鏡の開発を行った。その結果、3種類の塩基 において、当該手法において、DNA1 分子シーケンスを実現できた。さきがけ研究期間での成果に より、4 種類の塩基検出によるリアルタイム DNA1 分子シーケンスの実現まであともう少しの段階 まで近づいてきたと考えている。今後は、現在の感度不足を新規カメラの導入等により4種類の 塩基を検出することで、1分子DNAシーケンスを達成していきたいと考えている。

6. 研究総括の見解

DNA1分子を試料として、4種の蛍光標識ヌクレオチドを用いてポリメラーゼ反応を起こさせ、全 反射顕微鏡でこれをリアルタイム検出するという極めて意欲的な挑戦である。これによりDNAシ ーケンスの高速化・低コスト化を狙う。主たる成果は次の2点である。

① 蛍光標識 dNTP の取込み活性評価から、最も効率的で各種蛍光標識への対応性の最も高いラット由来の DNA ポリメラーゼを選定した。

②光学系の改良により 4 種の蛍光色素のリアルタイム検出が可能な全反射顕微鏡を完成し、上 記の DNA ポリメラーゼを用いた 3 種の蛍光標識 dNTP の合成反応において、このリアルタイム検 出に成功した。

これらの成果は酵素、標識アナログ、光学系に対する整合性のある総合的な取り組みにより得 られたものであり、3種類の塩基合成の瞬間を連続的に検出することに成功したことは高く評価で きる。

研究成果は4篇の原著論文、1件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づく 特許2件を出願している。また平成19年に「第15回源内奨励賞」を受賞している。

4種類の塩基を連続的に1分子検出するための光学系の改良、反応温度の制御、鋳型 DNA の 表面吸着防止、より優れた DNA ポリメラーゼの探索など実用化への課題は数多く、DNA1分子シ ーケンス完成に至るにはさらなる検討が必要である。しかし、ようやくこの方式の将来性を十分予 感できる結果が出てきたと感じる。実現した場合の生命科学と医療検査へのインパクトは非常に 大きく今後の発展が強く期待される。

7. 主な論文等

### (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表 なし

(2)特許出願

国内特許 1件(未公開)

PCT 出願 1件(未公開)

(3)受賞

・平成20年3月25日2007年度第15回源内奨励賞「レーザー光圧力を用いる高速遺伝子 解析装置の開発研究」、財団法人エレキテル尾崎財団(香川県さぬき市教育委員会内)

(4)著書

・長田英也、田渕眞理、平野 研、II編基盤・要素技術第3章バイオ計測の要素技術「マイク ロ光熱変換計測」、ナノテク・バイオMEMS時代のバイオ分離・計測技術(シーエムシー出版)、2006

(5)学会発表

#### 口頭発表(国際)

· 平野 研、石堂智美、長田英也、田中芳夫、石川 満、"Single molecule analysis of condensed DNA: Direct measurement of condensed speed and single molecule sizing by laser trapping"、13th Microoptics Conference(MOC'07)、2007

### ポスター発表(国際)

・石堂智美、長田英也、石堂智美、田中芳夫、石川 満、平野 研、"Single molecule analysis of condensed DNA: Measurement of condensation speed and single molecule size using laser trapping"、 *μ* TAS2007 (Eleventh International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences)、2007

## ポスター発表(国内)

・吉田雄一郎、石川 満、馬場嘉信、水品善之、平野 研、"DNA polymerase β における fluorescein 標識ヌクレオチドを利用したDNA伸張反応の評価"、 第28回日本分子生物学 会年会、2005

・吉田雄一郎、長田英也、石堂智美、石川 満、水品善之、平野 研、"ヌクレオチドの蛍光 標識が DNA polymerase の fidelity に及ぼす影響の評価"、日本分子生物学会2006フォーラ ム 〜 分子生物学の未来、2006

(6)招待講演

招待講演(国内)

・平野 研、"レーザートラップを用いた単一細胞とDNA1分子の操作・加工"、第66回レーザ 一加工学会講演会、2006

- (B) その他の主な成果
  - (1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

 前田瑛輝、平野研、馬場嘉信、長田英也、田渕真理、"Conformational separation of monosaccharides of glycoproteins labeled with 2-aminoacrydone using microchip electrophoresis"、Electrophoresis、2006(B)

・都英次郎、長田英也、平野 研、槇田洋二、仲山賢一、廣津孝弘、"Near-infrared laser-triggered carbon nanohorns for selective elimination of microbes"、Nanotechnology、 2007(B)

·都英次郎、長田英也、平野研、槇田洋二、仲山賢一、廣津孝弘、"Photoinduced antiviral carbon nanohorns"、Nanotechnology、2008(B)

・田中芳夫、平野 研、長田英也、石川 満、"Real-time three-dimensional orientation control of non-spherical micro-objects using laser trapping "、Electronics Letters、2007(B)

(2)特許出願 なし

#### 研究課題別評価書

1. 研究課題名

光解離性修飾基を用いたタンパク質の構造と機能の新規研究法

#### 2. 氏名

廣田 俊

#### 3. 研究のねらい

タンパク質が生体内で機能するためには、特定の高次構造を持つ折れ畳んだ状態を形成する ことが必須であり、実験と理論の両面からタンパク質の構造形成に関する研究が盛んになされて いる。ストップドフロー法により比較的遅い時間領域でのタンパク質形成反応の理解が深まったが、 ストップドフロー法の不感時間内(約 1 ms)での反応に関しては、いまだ不明な点も多い。このた め、1 ms よりも早い初期段階での構造形成反応を追跡する良い手法の開発が必要であった。そ こで本研究では、種々のタンパク質に広く応用できる方法として、化学修飾により光解離性修飾基 をタンパク質の特定のアミノ酸残基に導入する手法の開発を行った。この手法では、不安定化し た修飾タンパク質にパルス光を照射して、タンパク質から修飾基を瞬時に外すことにより、タンパ ク質のフォールディング反応を開始させ、その反応を追跡した。またこの手法の応用として、新規 光応答性ペプチドを開発し、タンパク質ーペプチド相互作用の光制御を試みた。

4. 研究成果

本研究では、緑色植物などの葉緑体中に存在する可溶性の電子伝達銅タンパク質であるプラ ストシアニン(PC)から銅原子を取り除いたアポプラストシアニン(apoPC)を取りあげた。PC は シートタンパク質に分類され、8本からなる2つの $\beta$ シートと1回転の $\alpha$ へリックスを有し、タンパク 質内の唯一のシステイン残基(Cys84)は銅原子に配位している。Cys84の硫黄原子は銅に配位し ているので、PC から銅を外して得た apoPC の Cys の硫黄原子をオルトニトロベンジル基のジメト キシ誘導体(DMNB)で修飾した。

apoPC の修飾部位を特定するために、リシルエンドペプチダーゼにより未修飾および修飾タン パク質の酵素消化を行い、各タンパク質から得られたペプチド断片を HPLC で精製した(図1)。得 られた各ペプチド断片の MALDI-TOF マススペクトルを測定し、分子量を決定した。未修飾 apoPC から得られたペプチド断片の溶出曲線で観測された分子量 1409.2 のペプチドに由来するピークは 修飾 apoPC から得られたペプチド断片では観測されず、代わりに分子量 1604.4 のペプチドに由来 する新しいピークが観測された。修飾により消失したペプチドおよび新しく生じたペプチドの分子量 差は 294.8 で、修飾基の分子量に対応していた。また、新しく観測された分子量 1604.4 のペプチド は 355 nm に吸収帯を有していた。修飾タンパク質に特異的に観測されたこのペプチド断片のアミ ノ酸配列解析を行うとともに、エルマン試薬との反応性を未修飾と修飾タンパク質で比較したとこ ろ、apoPC の DMNB 修飾部位が Cys 84 であることが特定された。



図 1. リジルエンドペプチダーゼを用いた未修飾および DMNB 修飾 apoPC の酵素消化により 得られたペプチド断片の HPLC 溶出曲線。MALDI-TOF マススペクトルより得られた各ペプチ ドの分子量を記載した。

修飾apoPCに 355 nmのパルス光を照射すると、 修飾基に由来する 355 nmの吸収帯が減少したこと より、光照射により修飾基がapoPCから遊離したこ とが判明した(図 2A)。一方、未修飾と修飾apoPC の酸変性状態のCDスペクトルを比較したところ、修 飾apoPCは変性状態であることが解った。また、修 飾apoPCへの 355 nmの光照射により、変性状態を 示していたCDスペクトルはネイティブ状態のCDス ペクトルに戻った(図 2B)。さらに、光照射前後の修 飾apoPCの<sup>15</sup>N-HSQC NMRスペクトルを測定したと ころ、光照射前の修飾apoPCのスペクトルは酸変性 のスペクトルと類似したスペクトルになり、光照射に よりスペクトルはネイティブ状態のスペクトルに変化 した。これらの結果より、光照射によりタンパク質が 変性状態からネイティブのβシート構造の状態に 戻ることが確かめられた。

次に、過渡回折格子法を用いて修飾タンパク質 に光を照射したときの反応を追跡した。修飾タンパ ク質への光照射により得られた回折シグナルは、ま ず、強度が急激に増大し、その後、ゆっくり増大す



図 2. パルス光 (355 nm) 照射による DMNB 修飾 apoPC の (A) 吸収と (B) CD スペクトル変化。挿入図: apoPC の CD スペクトル、(a) pH 7 と(b) pH 2。

るようになり、マイクロ秒の時間領域で 減少した。この減衰成分は、熱グレー ティング成分であった。ゆっくり増大し た成分のタイムスケールは 400 ns であ り、この信号の形がグレーティングの 波数を変えても変わらなかった。このこ とより、この成分は修飾基がタンパク質 から解離するのに対応し、400 ns で修 飾基がタンパク質から解離することが 判明した(図 3)。光照射後、約 270 µs でタンパク質の体積減少が観測され、 この体積変化は変性状態から初期段 階での疎水基凝集への変化に帰属で きた。さらに、23 ms のタイムスケール



図 3. 修飾タンパク質への光照射(355 nm)による apoPC の折れ畳み反応の模式図。

で拡散定数が増大することが解り、この変化はタンパク質と水分子の分子間水素結合がタンパク 質内の分子内水素結合へと変化したことに対応すると解釈した。

上記の手法の応用として、光応答性環状ペプチドを作製し、βシート構造を有するホスファチジ ルイノシトールキナーゼの SH3 domain とその認識ペプチドとの相互作用の光制御を試みた。光解 離性架橋修飾基でペプチドの2箇所を分子内で架橋させ、ペプチドを環状構造にした。得られた 環状の修飾ペプチドに光を照射すると、ペプチドの環状結合が切れ、もとの天然構造のように揺ら ぎを有する構造を取ることが期待される。実際、タンパク質と修飾された認識ペプチドを共存させ た場合、お互いに認識しなかったが、この混合溶液に光を照射すると、ペプチドと修飾基の結合 が切れ、タンパク質とペプチドが相互作用を開始することが CD スペクトルより確かめられた。

本手法は多くのタンパク質へ応用可能であり、タンパク質の構造と機能の有効な研究手段にな ると期待される。特に、これらの手法がタンパク質のフォールディング反応の解明や分子認識の 制御に寄与することが考えられる。

5. 自己評価

当初の目標は、タンパク質やペプチドに光解離性修飾基を導入し、修飾タンパク質やペプチド を光照射することにより、タンパク質の構造形成反応を追跡したり、機能を制御したりすることであ った。本研究では、光解離性修飾基を導入したアポプラストシアニンの精製法を確立し、修飾部位 を特定した。また、修飾によりタンパク質の立体構造が崩れ、修飾タンパク質への光照射によりタ ンパク質の立体構造が変性構造からネイティブ構造に戻ることを<sup>15</sup>N-HSQC NMR及びCDスペク トルにより確認した。以上のように、タンパク質の立体構造を一箇所のアミノ酸残基への化学修飾 により変性させ、立体構造が崩れた修飾タンパク質への光照射によりネイティブ構造に戻る系を 構築した。この系を用いてアポプラストシアニンの構造形成反応を時間分解測定し、フォールディ ング中間体を検出した。特に、これまで観測できなかった 270 µsで起こる反応が観測され、各フォ ールディング中間体の拡散定数が初めて求められたことは意義が大きい。また、本手法の応用と して、SH3 ドメインタンパク質とそのペプチドリガンドとの複合体形成反応を光制御した。以上のよ うに本研究では一定の成果は得られたが、問題点も残されている。例えば、本手法により構造形 成反応を追跡できるタンパク質の種類は限定されている。また、タンパク質—ペプチド複合体形成 制御による機能制御はこれからの課題である。今後、本研究で開発した手法が計測分析に広く利 用されるためには、研究のさらなる展開が必要である。

6. 研究総括の見解

光解離性修飾基をタンパク質に導入し、光パルスでタンパク質の構造形成を開始させる全く新 しい研究手法に挑戦した。この手法を用いて、タンパク質の構造形成反応を追跡し、構造形成の メカニズムの解明や光による反応制御を狙う。主たる成果は次の2点である。

①光感応性修飾基を結合することにより変性させたタンパク質やペプチドに、光照射によって修飾 基を解離させ構造変化を誘起し、リフォールディング過程を極初期から詳細に追跡することに成 功した。

②修飾基脱離後にアポプラストシアニンが自然状態に戻る現象を、分子体積と拡散定数の変化 などから解析して、フォールディング過程にタイムスケールの違う3段階があることを証明した。

特定タンパク質の構造形成反応を追跡することに成功しており、さらに、タンパク質ーペプチド 複合体の形成の制御にも成功していることは高く評価できる。

研究成果は18篇の原著論文、7件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づ く特許2件を出願している。また「平成17年度日本薬学会薬学研究ビジョン部会賞」を受賞してい る。

タンパク質の構造形成反応に関して、初期段階での知見は少ない現状において、これを解明す る手がかりを得たことは注目に値する。タンパク質の構造形成を研究するための新しい手法の提 案であり、新しい視点であると考えられるが、本方法の適用範囲は限定されているので、タンパク 質の立体構造を光制御する方法の開発へと発展することを期待したい。

7. 主な論文等

#### (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

### 論文(国際)

 Shun Hirota, Takumi Kawahara, Emanuela Lonardi, Ellen de Waal, Noriaki Funasaki and Gerard W. Canters, "Oxygen Binding to Tyrosinase from Streptomyces antibioticus Studied by Laser Flash Photolysis", J. Am. Chem. Soc., 127, 17966–17967 (2005)

 Shun Hirota, Yukari Fujimoto, Jungkwon Choi, Naoki Baden, Noriko Katagiri, Masako Akiyama, Rinske Hulsker, Marcellus Ubbink, Toshihide Okajima, Teruhiro Takabe, Noriaki Funasaki, Yoshihito Watanabe and Masahide Terazima, "Conformational Changes during Apoplastocyanin Folding Observed by Photocleavable Modification and Transient Grating", J. Am. Chem. Soc., 128, 7551-7558 (2006)

(2)特許出願

発 明 者:廣田 俊、濱崎 勇二

発明の名称:光制御ペプチド及び光制御ペプチドを用いたペプチドー金属複合体形成の制御 方法

出 願 人:株式会社島津製作所

出 願 日:2006.8.14

出願番号:PCT/JP2006/316278

発明者:廣田俊、ハラン・プラカシュ
発明の名称:アゾペプチド複合体
出願人:奈良先端科学技術大学院大学
出願日:2007.7.9

出 願 番 号: 特願 2007-179592

(3)受賞

・平成18年2月 平成17年度日本薬学会薬学研究ビジョン部会賞

(4)著書

・廣田 俊、"光解離性修飾基を用いたタンパク質のフォールディング反応の追跡"、生物物 理, 45, 207-210 (2005)

(5)学会発表

### 口頭発表(国内)

・黒岩繁樹、矢島辰雄、置塩信行、舟崎紀昭、廣田俊、"光感受性修飾ペプチドを用いた SH3ドメインの分子認識の制御"、日本化学会第86春季年会、2006年3月

・黒岩繁樹、矢島辰雄、置塩信行、舟崎紀昭、廣田 俊、"新規光応答性環状ペプチドを用いた SH3ドメインの分子認識の制御"、第 21 回生体機能関連化学部会・第 9 回バイオテクノロジー部会・第 9 回生命化学研究会 合同シンポジウム、2006 年 9 月

### ポスター発表(国際)

Shun Hirota, Yukari Fujimoto, Jungkwon Choi, Naoki Baden, Noriko Katagiri, Masako Akiyama, Rinske Hulsker, Marcellus Ubbink, Toshihide Okajima, Teruhiro Takabe, Noriaki Funasaki, Yoshihito Watanabe, and Masahide Terazima、"Conformational Changes during Apoplastocyanin Folding Observed by Photocleavable Modification and Transient Grating"、The Second International Symposium on Biomolecular Chemistry (ISBC2006)、2006 年 8 月
 Shun Hirota, Yukari Fujimoto, Jungkwon Choi, Naoki Baden, Noriko Katagiri, Masako

Akiyama, Rinske Hulsker, Marcellus Ubbink, Toshihide Okajima, Teruhiro Takabe, Noriaki Funasaki, Yoshihito Watanabe, and Masahide Terazima "Conformational changes during apoplastocyanin folding observed by photocleavable modification and transient grating"、Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS&BSJ 2006)、2006 年 11 月

・H. Prakash, A. Shodai, H. Yasui, H. Sakurai, S. Hirota、"Photoconversion of Copper Ion Coordination in a Chemically Modified Peptide"、13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry、2007 年 7 月

#### (6)招待講演

### 招待講演(国際)

· Shun Hirota、"Photo-triggering ligand binding, folding, and molecular interaction of proteins"、International Workshop on Protein Dynamics and Biological Applications of Time-Resolved Spectroscopy、2006 年 8 月

Shun Hirota, Takumi Kawahara, Mariano Beltramini, Paolo Di Muro, Noriaki Funasaki, Luigi Bubacco、"Oxygen Binding Properties of Carcinus aestuarii Hemocyanin Revealed by Laser Flash Photolysis"、13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry、2007 年7月

· Shun Hirota、"Control of Folding and Molecular Interaction of Proteins and Peptides by Photocleavable Modification"、2nd European Conference on Chemistry for Life Sciences、 2007 年 9 月

#### 招待講演(国内)

・廣田俊、"タンパク質構造変化の新規測定法と制御法の開発"、第 7 回創薬ビジョンシンポジウム、2006 年 2 月

・廣田 俊、"光トリガーを利用したタンパク質の構造形成制御"、日本薬学会第 127 年会、 2006 年 3 月

### (B) その他の主な成果

(1)論文(原著論文)発表

### 論文(国際)

• Atsuhiko Taniguchi, Youhei Sohma, Maiko Kimura, Takuma Okada, Keisuke Ikeda, Yoshio Hayashi, Tooru Kimura, Shun Hirota, Katsumi Matsuzaki, and Yoshiaki Kiso, ""Click Peptide" Based on the "*O*-Acyl Isopeptide Method": Control of A  $\beta$  1-42 Production from a Photo-Triggered A  $\beta$  1-42 Analogue", J. Am. Chem. Soc., 128, 696-697 (2006)"

 Mariusz Skwarczynski, Mayo Noguchi, Shun Hirota, Youhei Sohma, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, and Yoshiaki Kiso, "Development of first photoresponsive prodrug of paclitaxel", Bioorg. Med. Chem. Lett., 16, 4492-4496 (2006)  N. Baden, S. Hirota, T. Takabe, N. Funasaki and M. Terazima, "Thermodynamical Properties of Reaction Intermediates during Apoplastocyanin Folding in Time-Domain", J. Chem. Phys., 127, 175103 (2007)

(2)特許出願 なし

### 研究課題別評価書

1. 研究課題名

先端的ナノトライボロジー計測による情報記憶装置の革新

2. 氏名

福澤 健二

3. 研究のねらい

情報記憶装置の中核である磁気ディスク装置(ハードディスクドライブ)のヘッド・ディスク潤滑技 術には、大きな技術的転換が求められている.次世代の装置においては、高記録密度化のため に、ヘッド・ディスク間のすきまとして 10nm 以下が要求されており、これを実現するには、ヘッドを 空気膜で浮上させていた従来の潤滑方式から、ディスク表面にヘッドを接触させながら走行する 潤滑方式の確立が必須となる.しかし、すきま 1 nm オーダーのヘッド・ディスク間の潤滑現象を従 来の計測法ではとらえることが困難で、次世代潤滑方式確立の大きな障害となっていた.耐久性 の確保のために、ディスク表面には、厚さ 1nm オーダーの超薄膜状の液体潤滑膜(ナノ潤滑膜) が塗布されている.そのため、潤滑現象の計測には、ナノ潤滑膜の摺動時の力学応答計測が重 要となる.そして、微小すきまの現象を対象とし、かつ、ナノ潤滑膜の発生する力も微弱であるた め、高精度なすきま制御と高感度な力検出の両立が求められる.これを満たす計測法は従来なく、 新規な計測法を確立することを試みた.

4. 研究成果

ナノ潤滑膜が発生するカとしては、粘弾性力などの水平方向の力、摺動による動圧力などの鉛 直方向の力が重要で、ナノすきまの潤滑現象を把握するには、これらの水平・鉛直方向の力を精 密に定量化する必要がある.さらに、ナノ潤滑膜は、厚さが極めて薄いと言っても液体膜であるの で分布が容易に変化し、それが力学応答に影響を与える可能性がある.そのため、液体膜の分

布の把握も重要である. そこで,本研究に おいては,水平方向の力,鉛直方向の力, 腹分布の観測のそれぞれの計測法を確立 し,さらにそれらを統合し,同時計測するこ とを試みた(図 1).各計測法について得ら れた成果を下に述べる.

a. 水平力測定

先端を球状に加工した光ファイバをプロ ーブとした新規な計測法を考案し,ナノ潤 滑膜の粘弾性力計測を試みた.ディスクと プローブの間に潤滑膜を挟み,プローブを



図 1. ナノ厚さ潤滑膜の力学特性計測法の概念図.

加振しディスクに対して平行に相対運 動させる. その際の水平せん断力によ る振幅・位相変化から潤滑膜の粘弾性 特性を得た. 本プローブは, 面内方向 には柔で, かつ鉛直方向に剛であるこ とを利用し, 高感度な水平力測定と分 解能 0.1nm オーダーの高精度なすきま 制御の両立を可能とした. また, 先端 の微小ガラス球をマイクロレンズとして 利用した新規なプローブ変位検出法を 開発し, 変位の最小検出限界 10 pm オ ーダー(力検出限界 0.01nN オーダー) という超高感度検出を達成した. 本法 を用いて, 商用の磁気ディスク装置に

<u>無極性潤滑剤(Z03)</u>



図 2. 開発した水平力測定法により得たナノ潤滑膜の粘弾 性特性. 分子末端の極性基の有無のみが異なる2種の潤滑 分子を比較した結果.

用いられている無極性のフッ素系潤滑剤(perfluoropolyether)の微小すきまにおける粘弾性特性 を測定した.図2に測定結果を示す.摺動すきまが数十 nm 以下になると粘性の増加が見られた. また,液体であるにも関わらず弾性の出現が見られ,ナノすきまに閉込められた潤滑膜はバルク 状態とは異なった粘弾性特性を示すことを明らかにした.そして,上で用いた分子と主鎖の構造・ 長さは等しいが,分子末端の極性基(水酸基)の有無のみが異なる潤滑剤分子について測定し, 極性の効果を調べた(図2).極性分子は,末端基とディスク表面の相互作用が強く吸着層を形成 しやすい.一方,無極性分子は,相互作用が弱いため吸着層を形成しにくい.図2の結果から,極 性分子に対しては,摺動すきまが吸着層の厚さと同程度のオーダー(1nm のオーダー)になると, 粘弾性の上昇が飽和する現象が見出されたのに対し,無極性分子については飽和が見られず, すきまに対して単調に粘性・弾性係数が減少した.以上のように,1nm オーダーのすきまにおいて は,潤滑剤分子と固体基板表面との相互作用を反映した粘弾性特性を有することを見出した.

# b. 鉛直力測定

鉛直力測定においても、高精度なすきま制御と高感度力検出の両立が必須である. 一般に力 検出で用いられている, センサ部の変形を利用した力測定を用いた場合, 鉛直力による変形によ り, すきまが変動してしまう. 高感度な力検出には, 変形は大きいほど良くセンサ部には低い剛性 が求められるが, すきま変動の抑制には高い剛性が求められる. このような要求を満たす力検出 法は, 従来なかった. そこで, 双音叉型(double ended tuning fork:DETF)共振器を力センサとする 新たな計測法を提案した. 音叉の振動方向は測定すべき鉛直力に直交するように配置し, 鉛直 力は音叉に軸力として働き共振周波数を変化させる構造とした. 鉛直方向の高い剛性によりすき ま変動を抑制し, かつ共振を利用することにより高感度力検出を可能とした(図 1). センサを試作 し, 測定時のすきま変動が 1nm 以下で, かつ最小検出限界 1 μ N オーダーの高感度鉛直力測定 を実現した. さらに, 開発した水平力測定法と統合し, 水平力・鉛直力の同時測定に成功した. 図 3には, 無極性潤滑分子に対する水平力測定と同時測定した鉛直力の結果を示した. 図に示した 測定例のように、ナノ潤滑膜の粘度の増加 に対応した動圧力の増加の定量化に成功 した.また、本測定において、十分広いすき まにおいては水平力測定はバルクとほぼ 等しい粘度を示した.これから、鉛直力測 定の水平力測定に対する影響は十分小さ いと考えられる.そして、潤滑設計に広く用 いられている連続体理論に基づいた潤滑 方程式に、水平力測定で得た粘性係数を 代入して得た鉛直力の値と測定結果は、お おむね一致した.この結果は、本測定で用 いた無極性の潤滑分子については、1 nm オーダーのすきまにおいても連続体的取り 扱いが可能なことを示している.これは、上



図 3. 開発した測定法によるナノ潤滑膜の水平・鉛直 カの同時測定結果. 粘度増加に対応した鉛直力(摺動 による動圧力)の増加を検出.

の「a.水平力測定」の項で述べたように、無極性分子は、基板表面との相互作用が小さく、吸着層 が形成されにくいことと対応している. 摺動すきまにおいて潤滑分子の発生する圧力が、鉛直荷 重を支え機械要素間の接触を防ぐことが、流体(潤滑油など)を使ったすべての潤滑技術の基本 原理となっている. そして、従来の潤滑理論においては、流体を連続体として取り扱い、摺動すき まを一定としたときに発生する圧力を求め、これから支えられる鉛直荷重を求める潤滑方程式が 基本式となっている. 分子の大きさと同程度のナノオーダーの摺動すきまにおいて、従来の潤滑 理論の適用の可否を見極めるためには、高精度に摺動すきまを制御し、発生する圧力を定量化す る必要がある. 上の「a.水平力測定」の項で明らかにしたように、極性分子では、固体表面との相 互作用の影響が強く、吸着層の形成などにより連続体理論の適用が困難になることが予想される. 図3に示したように、本法により、高精度すきま制御下での水平および鉛直力の同時計測が可能 となった. これにより、潤滑理論の微小すきまにおける適用限界を明らかにすることができる. こ れは、次世代磁気ディスク用の潤滑技術確立に有用な知見となる.

c. ナノ潤滑薄膜の分布観測

エリプソメトリー(偏光解析)に基づく光学 的な方法により,ナノ潤滑膜の直接可視化 法の確立を試みた.エリプソメトリーは, 0.1nm オーダーの分解能を有する膜厚測 定法として広く用いられている.しかし,従 来のエリプソメトリーは,光スポットを試料 に照射し,反射光の偏光解析を行う方法で あった.そのため,膜の二次元分布を得る ためには,光スポットを試料面上で走査す る必要があり,動的観測は困難であった.



図4. 開発した膜分布観測法による厚さ5.8 nmの潤 滑膜の経時変化の直接可視化像. 撥水現象による膜 分布の変化の可視化に成功.

そこで、本研究では、光検出器として高感度撮像素子を用いることにより、膜厚分布を輝度分布 に変換し, 二次元的な膜分布を像として得ることとした(図 1). 光学系の工夫および画像処理によ り画像の SN 比を向上させ、膜厚分解能 0.1nm オーダーでの膜分布の直接可視化を達成した、潤 滑剤分子間の相互作用が, 潤滑剤分子・基板間との相互作用より大きい場合, 潤滑剤分子は膜 状に塗布されても,自発的に凝集する.これは,特に極性潤滑分子において発生しやすい.凝集 した分子は、次世代磁気ディスクに必要な 10nm 以下のヘッド・ディスク間の摺動すきまの達成に は大きな課題となり、その現象・特性の解明が強く求められている. 図4には、厚さ5.8 nm の極性 潤滑膜の凝集現象を可視化した結果を示した. 記録特性向上のため基板表面に設けられた凹凸 構造(高さ0.1nm オーダー)に比べ,膜厚は1桁程度大きいにも関わらず,表面凹凸構造に沿って 凝集が起こることを見出した. また, 原子間力顕微鏡観察により, 極性潤滑分子の吸着層は表面 凹凸構造に沿って局在することも明らかにしており、吸着層の分布を反映して凝集過程も進行す ることを示している. 上の「a.水平力測定」, 「b.鉛直力測定」で述べた粘弾性特性同様, ナノ潤滑 膜においては、凝集現象においても吸着層の効果が重要であることを明らかにした.本観測法は、 上で述べた水平・鉛直力同時測定系との統合も可能な構成であり(図1), 摺動時の膜分布を観 測し、水平・鉛直力測定とあわせて、多角的にナノ潤滑現象を定量化する手段として展開可能で ある.

### 5. 自己評価

本研究においては、ナノ潤滑膜の力学応答計測法の確立を目的として、水平方向の力、鉛直 方向の力、膜分布の観測のそれぞれの計測法を確立し、さらにそれらを統合し、同時計測するこ とを目標とした(図 1).本計測には、高精度すきま制御と高感度力検出という従来の計測法にな い条件が求められるので、水平力測定、鉛直力測定、膜分布観測のすべてに研究者の着想に基 づく新規な方法の実現を試みた.本研究期間内に、それぞれの計測法について原理確認を終了 し、要素技術としておおむね当初の目標どおりの性能を確立できた.さらに、水平力と鉛直力測定 に関して、その同時計測に成功した.そして、それらを用いて、微小すきまの潤滑膜特有の粘弾 性特性の定量化、潤滑方程式のナノすきまにおける適用限界の解明の可能性、ナノ厚さ潤滑膜 の動的現象の可視化など、本計測法の有効性およびナノ潤滑膜の力学特性を明らかにすること ができた.現段階では、膜観測と力計測の統合には至らなかったが、装置構成的には問題がなく、 今後の研究の展開により実現可能であることを示した.以上のように、当初の目標をおおむね達 成できたものと考えている.また、目標外の成果として、微小空間の水の粘弾性計測、ナノ摩擦特 性計測用マイクロプローブの開発にも成功し、より多角的な視点からの研究を進めることができ た.

### 6. 研究総括の見解

ハードディスクとヘッド間の厚さ 1nm オーダーの極薄潤滑膜の力学特性計測法の確立を狙うナ ノトライボロジーの計測技術の開発である。主たる成果として次の 3 点が上げられる。 ①0.1nm のすきま制御と 0.01nN オーダーの水平力測定が可能なプローブを開発し、潤滑剤の無 極性と極性による粘弾性の違いの測定に成功し、数十 nm 以下のすきまで弾性が出現するなど新 現象を発見した。1nm オーダーのすきまにおいては潤滑剤分子と固体表面との相互作用を反映し た粘弾性特性があることを明らかにした。

②双音叉型共振器を利用して1μNオーダーの鉛直力を測定する手法に成功し、さらに水平力測 定法と統合し、水平力・鉛直力の同時測定に成功した。無極性潤滑剤では連続流体の取り扱い が可能なこと、極性分子では吸着層の形成によりその取り扱いが困難なことを証明した。

③ナノ潤滑膜の膜厚分布をエリプソメトリーにより二次元像として計測することに成功し、ナノ潤滑 膜の吸着層が凝集現象に関係することなどを見出した。

上記の成果は、装置として統合が可能であり、摺動時の膜分布を観測し,水平・鉛直力測定と あわせて,多角的にナノ潤滑現象を定量化する手段として展開可能である。

研究成果は 18 篇の原著論文、2 件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づ く特許 3 件を出願している。また平成 17 年度に「2004 年度日本機械会船井賞(業績賞)」、「2004 年度日本トライボロジー学会論文賞」、平成 18 年に「2005 年度日本機械学会賞(論文)」を受賞し ている。

ナノトライポロジー計測を実現できる新規計測技術の開発に成功しており、潤滑剤の動的膜分 布など得られた知見は極めて多岐にわたる。微少空間における粘弾性測定はマイクロ化学チップ、 生体内流動など分析化学、生命科学分野においても有用な知見を与えると思われる。現在は静 的状態での測定であるが、実際のハードディスクのように高速で回転している表面での潤滑剤薄 膜の粘弾性測定に発展することを期待したい。

7. 主な論文等

## (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

## 論文(国際)

 S. Itoh, K. Fukuzawa, T. Ando, H. Zhang, Y. Mitsuya, "Viscosity Increase due to Confinement of Mobile Molecules of Perfluoropolyethers Measured by Fiber Wobbling Method", IEEE Transaction on Magnectics, Vol. 41, No. 10, pp. 3046 - 3048 (2005)

K. Fukuzawa, T. Deguchi, J. Kawamura, Y. Mitsuya, T. Muramatsu, H. Zhang, "Nanoscale patterning of thin liquid films on solid surfaces", Applied Physics Letters, Vol. 87, pp.203108-1 - 203108-3 (2005)

K. Fukuzawa, T. Ando, M. Shibamoto, Y. Mitsuya, H. Zhang, "Monolithically fabricated double-ended tuning-fork-based force sensor", Journal of Applied Physics, Vol. 99, No. 9, pp. 094901-1 - 094901-5 (2006)

K. Fukuzawa , S. Terada, M. Shikida, H. Amakawa, H. Zhang, Y. Mistuya, "Dual-axis micro-mechanical probe for independent detection of lateral and vertical forces", Applied Physics Letters, Vol. 89, 173120-1 -3 (2006)

· K. Fukuzawa, T. Shimuta, T. Yoshida, H. Zhang, Y. Mitsuya, "Direct Visualization of

Dewetting of Molecularly Thin Liquid Films on Solid Surfaces", Langmuir, Vol. 22, No. 16, pp. 6951–6955 (2006)

(2)特許出願

発明者:福澤健二、式田光宏、寺田論
発明の名称:測定プローブ、試料表面測定装置、及び試料表面測定方法
出願人:科学技術振興機構
出願日:2006.02.14

出願番号:特願2006-037030

発 明 者:福澤健二、式田光宏、寺田論 発明の名称:測定プローブ、試料表面測定装置、および試料表面測定方法

出 願 人:科学技術振興機構

出 願 日:2007.02.14(未公開)

出願番号:PCT/JP2007/052626

発 明 者:福澤健二、吉田智彦

発明の名称:膜厚分布測定装置

出 願 人:名古屋大学

出 願 日:2008.2.13(未公開)

出願番号:特願2008-032333

(3)受賞

・平成17年3月
 2004年度日本機械学会船井賞(業績賞)

・平成18年4月 2005年度日本機械学会賞(論文)

(4)学会発表

#### 口頭発表(国際)

 Kenji Fukuzawa, Shintaro Itoh, Kenta Suzuki, Yuseke Kawai, Hedong Zhang, and Yasunaga Mitsuya, "Conformation and Motion of Monolayer Lubricant Molecules on Magnetic Disks", Digest of the International Magnetics Conference (IEEE INTERMAG 2005), HB-10, pp. 954, Nagoya (2005), 2005

 Shintaro Itoh, Kenji Fukuzawa, Takamasa Ando, Hedong Zhang, and Y. Mitsuya, "Viscosity Increase due to Confinement Of Mobile Molecules of Perfluoropolyethers Measured by Fiber Wobbling Method", Digest of the International Magnetics Conference (IEEE INTERMAG 2005), HB-11, pp. 955, Nagoya (2005), 2005

· K. Fukuzawa, T. Shimuta, T. Yoshida, H. Zhang, Y. Mitsuya, "Visualization Of Dewetting of

Molecularly Thin Lubricant on Magnetic Disks by Ellipsometric Microscopy", Digest of the International Magnetics Conference (IEEE INTERMAG 2006), p. 423, San Diego (2006), 2006 • K. Fukuzawa, T. Shimuta, T. Yoshida, H. Zhang, and Y. Mitsuya, "Direct visualization of molecularly thin lubricant by ellipsometric microscope", The 3rd International Conference on Tribology, Kanazawa, 2006

 K. Fukuzawa , T. Deguchi, T. Muramatsu, H. Zhang, Y. Mitsuya, "Nanofabrication of Solid Surface Using Probe Oxidation", Extended Abstracts of the ASME-ISPS/ JSME-IIP Joint Conference on Micromechatronics for Information and Precision Equipment (MIPE 2006), Santa Clara, USA, S03\_02 (2006), 2006

(5)招待講演

### 招待講演(国内)

・福澤健二、"先端的ナノトライボロジー計測による情報記憶装置の革新"、日本学術振興会 ナノプローブテクノロジー第 167 委員会 第 38 回研究会「ナノプローブ関連先端計測」、2005 ・福澤健二、"分子厚さ潤滑膜のナノトライボロジー計測"、(社)日本材料学会 分子動力学 部門委員会、2005

- (B) その他の主な成果
- (1)論文(原著論文)発表 なし
- (2)特許出願 なし
- (3)受賞
  - ・平成17年5月 2004年度日本トライボロジー学会論文賞

#### 研究課題別評価書

1. 研究課題名

コインシデンス分光法による複合表面解析

2. 氏名

間瀬 一彦

3. 研究のねらい

現在、固体試料表面の組成・化学状態分析法として、X線光電子分光法、オージェ電子分光法 が広く利用されている。また、表面水素の検出には脱離イオン測定が利用されている。これらの 分析法において利用されている内殻光電子放出、オージェ過程、イオン脱離という3つの現象は 100フェムト秒内に起きる一連の過程であり、その全体像を明らかにするにはオージェー光電子コ インシデンス分光(APECS)と、光電子-光イオンコインシデンス(PEPICO)分光、オージェ電子 ー光イオンコインシデンス(AEPICO)分光が不可欠である。また、コインシデンス分光法を利用 すると、試料表面の組成と化学状態ばかりでなく、局所電子状態や内殻励起に由来するイオン脱 離機構などの情報も得ることができる。本研究のねらいは、APECSと、PEPICO分光、AEPICO 分光を1台で行うことができる表面複合解析装置を開発することによって、ナノテクノロジー、材料 科学、環境科学など幅広い分野の科学技術に貢献することである。

4. 研究成果

1)はじめに

固体表面に軟X線を照射す ると、内殻電子励起、オージェ 過程を経由してイオン脱離が 起きる(オージェ刺激イオン脱 離機構、図1)。内殻光電子と オージェ電子の運動エネルギ ーは元素固有の値を取り、化 学的環境も反映するため、X線 光電子分光(軟X線を試料表 面に照射し、内殻準位から



図1. オージェ刺激イオン脱離機構とコインシデンス分光法。

放出される光電子の運動エネルギーを測定する手法、X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS)、オージェ電子分光(電子線を試料表面に照射し、内殻正孔の緩和過程によって放出され るオージェ電子の運動エネルギーを測定する手法、Auger Electron Spectroscopy, AES)は試 料表面の組成・化学状態分析法として広く利用されている。また、脱離イオン測定(軟X線あるい は電子線などを試料表面に照射し、脱離するイオンを測定する手法)は表面水素の検出に利用さ れている。しかし、内殻電子イオン化、オージェ過程、イオン脱離という3つの現象は 100fsの時間 内に起きる一連の過程であり、その全体像を明らかにするにはオージェー光電子コインシデンス 分光(Auger photoelectron coincidence spectroscopy, APECS)と光電子-光イオンコインシ デンス(Photoelectron photoion coincidence, PEPICO)分光、オージェ電子-光イオンコイン シデンス(Auger-electron photoelectron coincidence, AEPICO)分光が不可欠である(図1参

照)。さらに、コインシデンス分光法を利用 すると、表面の組成と化学状態ばかりでな く、化学結合状態や局所電子状態などの 情報も得られる。そこで我々は、ナノテクノ ロジー、材料科学、環境科学など幅広い 分野の科学技術に貢献することを目的と してAPECSとPEPICO分光、AEPICO分 光を1台で行うことができる表面複合解析 装置の開発を行なった[1]。さらに、 APECSを用いて水(H<sub>2</sub>O)が解離吸着し たシリコン単結晶表面のサイト選択的なSi L23VVオージェスペクトルの測定、凝縮 H<sub>2</sub>Oの 4a<sub>1</sub> ← O 1s共鳴励起(O 1s内殻準 位から 4a1 非占有軌道への共鳴励起)に おけるO KVV共鳴オージェ電子とH<sup>+</sup> 光 イオンのコインシデンススペクトルの測定 を行ない、本装置が期待通りの性能を 発揮していることを確認した。

2)電子-電子-イオンコインシデンス 分光装置

我々が開発したAPECSとPEPICO分 光、AEPICO分光を1台で行なうことが できる電子-電子-イオンコインシデン ス(Electron electron ion coincidence, EEICO)分光装置を図2に示す。本装 置は同軸対称鏡型電子エネルギー分 析器(Coaxially symmetric mirror analyzer, ASMA、エネルギー分解能 (Ε/ΔΕ)~80)と円筒鏡型電子エネルギ



# 図2. 電子-電子-イオンコインシデンス (EEICO)分光装置。



ー分析器(Cylindrical mirror analyzer, CMA、E/ΔE~20)、飛行時間型イオン質量分析器 (Time-of-flight ion mass spectrometer, TOF-MS)などから構成されている。本装置を用いて測定し たH<sub>2</sub>Oが解離吸着したSi(111)表面(H<sub>2</sub>O/Si(111))のSi-L<sub>23</sub>VV-Si<sup>0</sup>-2p APECSスペクトルと、 Si-L<sub>23</sub>VV-Si<sup>1+</sup>-2p APECSスペク トルを図3に示す。それぞれ、 H<sub>2</sub>O/Si(111)表面のSi 0価サイ トとSi 1価サイト近傍の価電子 状態を反映したSi<sup>0</sup> L<sub>23</sub>VV、Si<sup>1+</sup> L<sub>23</sub>VVオージェ電子スペクトル に対応する。

本装置で測定した凝縮H<sub>2</sub>Oの  $4a_1 \leftarrow O 1s 共鳴励起(hv = 532.9 eV)におけるO-KVV-H<sup>+</sup>$ AEPICOスペクトルを図4に示す。このスペクトルは、前にPEPICO、AEPICO分光専用の電子-イオンコインシデンス(Electron ion coincidence,



図4. 4a1←O 1s 共鳴励起(hv=532.9 eV)における O-KVV-H<sup>+</sup> AEPICOスペクトル(赤丸)と通常の オージェ電子スペクトル(実線)。

EICO)分光装置で測定した結果[2]を再現している。この共鳴AEPICOスペクトルのピーク位置と ピークの強度比が傍観型共鳴オージェスペクトル( $4a_1$ 軌道の電子が参与しない型のオージェ過 程)の形状に類似していることから、H<sup>+</sup>の脱離機構として、1)表面H<sub>2</sub>O分子の $4a_1 \leftarrow O 1s共鳴励$ 起、2)O 1s正孔寿命内におけるO-H結合伸張、3)傍観型オージェ過程、4)H<sup>+</sup>脱離、というイオン脱離機構が提案されている[3]。

3)ミニチュア電子-イオンコインシデンス分光装置の開発

2)で述べた EEICO 分光装置は高性能であるが、専用超高真空装置が必要である。そこで、汎用超高真空装置にも取付け可能なICF114マウントミニチュア電子 --- イオンコインシデンス(EICO) 分光装置(図5)も開発した[4]。

参考文献

- T. Kakiuchi, E. Kobayashi, N. Okada, K. Oyamada, M. Okusawa, K. K. Okudaira and K. Mase, J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom., 161 (2007) 164.
- [2] A. Nambu, E. Kobayashi, M. Mori, K. K. Okudaira, N. Ueno and K. Mase, Surf. Sci. 593 (2005) 269.
- [3] K. Mase, M. Nagasono, S. Tanaka, T. Sekitani and S. Nagaoka, Fizika Nizkikh Temperatur 29 (2003) 321.
- [4] T. Kakiuchi, E. Kobayashi, K. K. Okudaira, N. Fujita, M. Tanaka and K. Mase, Anal. Sci. 24 (2008) 87.



(EICO)分光装置。
### 5. 自己評価

本研究において、ねらいとしていたオージェー光電子コインシデンス分光(APECS)と、光電子 ー光イオンコインシデンス(PEPICO)分光、オージェ電子ー光イオンコインシデンス(AEPICO) 分光を1台で行なうことができる電子ー電子ーイオンコインシデンス分光装置の開発に成功した。 また、汎用超高真空装置に設置できるミニチュア電子ーイオンコインシデンス分光装置も開発した。 さらに、APECSによってSiO<sub>2</sub>/Si界面とSiO<sub>2</sub>超薄膜表面の局所価電子状態研究、PEPICO、 APECS、AEPICOの組み合わせによって、凝縮SiF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CD<sub>2</sub>Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>のサイト選択的イオン脱離 の研究を行ない、本研究手法が試料表面の組成と化学状態ばかりでなく、局所電子状態や内殻 励起に由来するイオン脱離機構の解明に非常に有用であることを示した。このため、当初の目的 はほぼ達成することができた。

6. 研究総括の見解

固体表面への X 線照射により生成する光電子、オージェ電子、イオンを同時に測定し、表面機 能性サイトの電子状態を解明するコインシデンス分光技術の開発に挑戦した。汎用性の高い表 面計測複合解析装置の実現を狙う。主たる成果は次の2点である。

①2つのエネルギー分析器と質量分析器を搭載した光電子-オージェ電子-脱離イオンの同時 計測が可能なコインシデンス分光器を完成した。

②SiO<sub>2</sub>/Si界面、SiO<sub>2</sub>超薄膜表面の局所荷電子状態、Si表面に凝縮した有機シリコン化合物のサイト選択的イオン脱離解離などを解明し、本装置の有用な応用例を示した。

極めて難しい実験技術を追求し、光電子、オージェ電子、イオンの分光法を統合したコインシデンス分光装置を完成したことは高く評価できる。データ解析法と実験室内用装置の開発もあわせて進め、この方法を一般に普及させるための強い努力も感じる。

研究成果は 17 篇の原著論文、6 件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づく特許 5 件を出願している。また平成 16 年度には「第 29 回真空技術賞」を受賞している。

コインシデンス分光法ならではの新しい情報が得られつつあり、固体の評価法の新分野を切り 開いている。今後は、分解能と感度の更なる改良により、この方法の特性を利用した応用例をさ らに拡大し、一般化を進めていくことが期待される。材料科学、ナノテクノロジー、環境科学など幅 広い分野の科学技術、産業への貢献は極めて大きいものと予想する。

7. 主な論文等

### (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

## 論文(国際)

・A. Nambu, E. Kobayshi, M. Mori, K.K. Okudaira, N. Ueno and K. Mase、"Isotope effects in H<sup>+</sup> (D<sup>+</sup>) desorption induced by  $4a_1 \leftarrow O$  1s resonant transition of condensed  $H_2O$  ( $D_2O$ )"、 Surface Science、593 巻、1-3 号、269-275 ページ、2005 年。 ・E. Kobayashi, K. Mase, A. Nambu, J. Seo, S. Tanaka, T. Kakiuchi, K.K. Okudaira, S. Nagaoka and M. Tanaka, "Recent progress in coincidence studies on ion desorption induced by core excitation", Journal of Physics: Condensed Matter, 18 巻、30 号、S1389-S1408 ページ、 2006 年。

T. Kakiuchi, E. Kobayashi, N. Okada, K. Oyamada, M. Okusawa, K.K. Okudaira and K. Mase,
 "Development of an electron electron ion coincidence analyzer for Auger photoelectron coincidence spectroscopy (APECS) and electron ion coincidence (EICO) spectroscopy", J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom., 161 巻、1-3 号、164-171 ページ、2007 年。

・E. Kobayashi, J. Seo, A. Nambu and K. Mase, "Development of a miniature double-pass cylindrical mirror electron energy analyzer (DPCMA), and its application to Auger photoelectron coincidence spectroscopy (APECS)"、Surface Science、601 巻、1-3 号、 3589-3592 ページ、2007 年。

・T. Kakiuchi, E. Kobayashi, K.K. Okudaira, N. Fujita, M. Tanaka and K. Mase, "Construction and Evaluation of a Miniature Electron Ion Coincidence Analyzer Mounted on a Conflat Flange with an Outer Diameter of 114 mm", Analytical Sciences, 24 巻、1 号、87-92 ページ、2008 年。

(2)特許出願

発 明 者:間瀬一彦、小林英一、南部英

発明の名称:電子-電子-イオンコインシデンス分光器、電子-電子-イオンコインシデン ス分光法、電子-電子コインシデンス分光法、及び電子-イオンコインシデンス分光法

- 出 願 人:高エネルギー加速器研究機構
- 出 願 日:2005.06.01
- 出願番号:特願2005-161509

発明者:間瀬一彦、小林英一、南部英
発明の名称:液体窒素溜め付ホルダー
出願人:高エネルギー加速器研究機構
出願日:2005.5.11
出願番号:実願2005-003111

## 発 明 者:間瀬一彦、小林英一

発明の名称:電子-イオンコインシデンス分光器、及び電子-イオンコインシデンス分光法

- 出 願 人:高エネルギー加速器研究機構
- 出 願 日:2006.03.24

出 願 番 号: 特願 2006-082329

発 明 者:間瀬一彦、藤田斉彦

発明の名称:電子・イオン・軟 X 線検出器

- 出 願 人:高エネルギー加速器研究機構
- 出 願 日:2007.3.28
- 出願番号:実願2007-002120

発 明 者:間瀬一彦、垣内拓大

発明の名称:真空装置用加熱冷却機構付き試料ホルダー

出 願 人:高エネルギー加速器研究機構

出 願 日:2007.11.28

出願番号:実願2007-009159

(3)受賞

·平成 16 年 10 月 第 29 回真空技術賞(平成 16 年度)

(4)学会発表

口頭発表(国内)

・垣内拓大、小林英一、岡田直之、小山田健、奥沢誠、奥平幸司、間瀬一彦、"電子-電子 -イオンコインシデンス分光装置の開発、性能評価、SiO<sub>2</sub>/Si(111)のサイト選択的Si LVVオ -ジェ過程研究への応用"、第 47 回 真空に関する連合講演会、2006 年。

・垣内拓大、藤田斉彦、間瀬一彦、"オージェ-光電子コインシデンス分光法による二酸化チ タン(TiO<sub>2</sub>(110))清浄表面と欠陥表面のTi 2p内殻電子励起に由来したCoster-Kronig遷移の 研究"、第 48 回 真空に関する連合講演会講演、2007。

・藤田斉彦、垣内拓大、間瀬一彦、田中正俊、"オージェ-光電子コインシデンス分光法 (APECS)による凝縮四塩化シラン(SiCl<sub>4</sub>)及びCl/Si(111)のサイト選択的オージェ過程の研 究"、第 48 回 真空に関する連合講演会講演、2007 年。

・垣内拓大、藤田斉彦、間瀬一彦、"オージェー光電子コインシデンス分光法を用いた酸化シ リコン(SiO<sub>2</sub>/Si)超薄膜の表面界面のサイト選択的オージェ電子スペクトルの測定による局 所価電子状態の研究"、第 21 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、2008 年。

# ポスター発表(国際)

・間瀬一彦、小林英一、奥平幸司、"Development of a Miniature Cylindrical Mirror Analyzer (CMA) Involving a Time-of-Flight Ion Mass Spectrometer and Its Application for Ion Desorption Induced by Core-Electronic Transitions"、第9回放射光装置に関する国際会議 (The ninth International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation (SRI 2006)、 2006 年。 (5)招待講演

# 招待講演(国際)

・間瀬一彦、"Auger decay and ion desorption studied with Auger-photoelectron coincidence spectroscopy (APECS) and electron-ion coincidence (EICO) spectroscopy"、International Symposium on Surface Science and Nanotechnology (ISSS-4)、2005 年。

・間瀬一彦、"Core excitations, Auger decays, and ion desorption of surface molecules studied by Auger-photoelectron and electron-ion coincidence spectroscopy"、原子、分子、 表面の多粒子分光法に関する国際会議(the International Conference on "Many particle spectroscopy of atoms, molecules, clusters and surfaces"、2006 年。

・小林英一・間瀬一彦、"Ion desorption dynamics induced by core-excitations of surface molecules using electron angle-resolved-photoion coincidence spectroscopy"、The 11th Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation 、2007 年。

#### 招待講演(国内)

・漁 剛志、上野信雄、奥平幸司、小林英一、下條竜夫、田中健一郎、長岡伸一、間瀬一彦、 森 正信、吉田啓晃、"電子-イオンコインシデンス分光装置の開発"、第 45 回真空に関する 連合講演会、2004 年 10 月、2004 年。

・間瀬一彦、"放射光励起によるナノプロセス"、2006 年春季 第 53 回応用物理学関係連合 講演会、2006 年。

(B) その他の主な成果

なし

## 研究課題別評価書

1. 研究課題名

原子時計精度での超高分解能レーザー分光計測

### 2. 氏名

御園 雅俊

3. 研究のねらい

多原子分子の超高分解能レーザー分光による精密計測の重要性が高まっている。たとえば、 環境ホルモン等による環境汚染が深刻な社会問題となっているが、多くの汚染物質については、 その光化学的な研究はなされてはおらず、分解のメカニズムは未だ不明である。

このような環境汚染物質や生体分子の光化学的な性質を研究するためには、それらの物質の 基礎となる基本的な多原子分子の分光学的性質を研究することがきわめて重要である。多原子 分子の電子励起状態間の相互作用や解離のダイナミクスは、励起準位の微小なシフトや広がり、 分裂等として現れるため、高分解能レーザー分光によってこれらを精密に計測する必要がある。

このような微小な効果の精密な計測において重要となるのが、優れた精度を持つ光波長の目 盛、すなわち、波長標準(周波数標準)である。従来の波長標準データ集(アトラス)の分解能はド ップラー効果によって制限されており、スペクトル線幅は数百MHz(相対精度 10<sup>-6</sup>)と広いため、高 分解能スペクトルの解析には不十分であった。このため、我々は、精度約3 MHz(相対精度 10<sup>-8</sup>) をもつアトラスを作成した。これは従来のアトラスの精度を2桁向上させたもので、現在では、海外、 国内を問わず、高分解能分光学の研究者に広く利用されている。しかしながら、多原子分子の電 子励起状態におけるダイナミクスを詳細に研究するためには、1 MHz以下の極微小なシフトや広 がり、分裂等をも測定する必要があり、このアトラスでもまだ不十分である。

一方で、現在、光周波数コムを利用した周波数標準の研究が進められている。この光周波数コムを利用すれば、優れた精度を持つ分光計測の目盛が得られ、高精度な分子スペクトル測定を 行うことができる。

本研究では、光周波数コムと高分解能な分子分光法を組み合わせた分光システムを開発し、 これを利用して分子の高分解能レーザー分光計測を行うことを目標とした。

4. 研究成果

本研究では、高精度な光周波数の目盛である光周波数コム、高分解能分子分光システムであ るドップラーフリー2 光子吸収分光システム、それらを組み合わせた光シンセサイザーの開発を行 った。これらについて順に述べる。

(1)高精度な光周波数の目盛 - 光周波数コムの開発 光周波数コムを光周波数の目盛として活用できることは、そのスペクトルを考えるとよく理解で きる。光周波数コム出力光のスペクト ルを図 1 に模式的に示す。光周波数 コムは、この図のように一定間隔で並 んだモードからなるので、これらのモ ードを光周波数の目盛として利用す ることができる。このためには、モード の間隔(f<sub>rep</sub>)と、オフセット周波数 (f<sub>CEO</sub>)を安定化する必要がある。この 安定化の基準として、GPS衛星に搭



載されたセシウム原子時計を利用した。これによって、原子時計から光周波数の精確な目盛を安価に得ることができる。

光周波数コムは、超短パルスレーザー、フォトニック結晶ファイバー、自己参照システムからな る。まず、超短パルスレーザーを独自に開発した。超短パルスレーザーのスペクトルをみると、繰 り返し周波数に等しい間隔でモードが並んでおり、これを光周波数コムとして利用できる。しかしな がら、レーザー出力そのままでは、スペクトルの広がりが狭いので、これを広げる必要がある。こ のためにフォトニック結晶ファイバーを利用した。超短パルス光をフォトニック結晶ファイバーに通 すと、モード間隔が一定のままスペクトルが広がっていく。このようにして、1オクターブ以上にわた って広がった光周波数コムを得ることに成功した。

製作した光周波数コムの全景を図2に示す。写真奥が独自に 開発したチタンサファイアレーザーで、パルス幅約 20 fs、繰り 返し周波数 100 MHz である。光周波数コムでは周波数安定度 が問題となるため、安定性に配慮した設計とした。とくに、レーザ ー共振器中には利得媒質であるチタンサファイア結晶以外の光 学部品を設置せず、分散補償のためにチャープミラーを使用し た。また、利得媒質であるチタンサファイア結晶やそのマウント を温度制御に配慮した設計とし、光学部品のマウントを振動の



図2. 開発した光周波数コム

影響を受けにくい設計とした。写真中ほどにフォトニック結晶ファイバー、写真手前に光周波数コ ムを安定化するための自己参照システムが設置されている。実際の運用においては、これらの部 分にもカバーを取り付けている。



図3. f<sub>rep</sub>とf<sub>CEO</sub>の時間変化

製作した光周波数コムの*f<sub>rep</sub>とf<sub>CEO</sub>を*安定化した際の時間変化を図 3 に示す。いずれも、安定化 開始前は周波数が変動しているが、安定化開始後は周波数の変化が抑えられていることが分か る。以上に示したように、光周波数コムを製作し、その安定化に成功した。

(2) 超高分解能レーザー分光システム - ドップラーフリー2 光子吸収分光システム

気体分子の分光においては、その運動に起因するドップラー効果によってスペクトル幅が広がってしまい、分解能に制限が生じる。本研究では、この制限を受けず、量子力学的限界まで分解能を高めることのできる、ドップラーフリー2光子吸収分光システムを開発した。製作したシステムを図4に示す。

この分光法では、2 枚の鏡で構成され た光共振器内でレーザー光を往復させること によってドップラー効果を相殺する。測定の際 には常に共鳴条件が保たれる必要があるた め、これを行う安定化システムを製作した。こ の光共振器内の光強度と、システムで生成さ れる誤差信号を図 5 に示す。この誤差信号を、 光共振器を構成する鏡の 1 つに取り付けたピ



図4. ドップラーフリー2光子吸収分光システム。 (a) 全景 (b) 光共振器周辺



図5. ドップラーフリー2光子吸収分光システムの 光共振器内の光強度と誤差信号

エゾ素子に帰還することによって、常に共鳴条件を保つことに成功した。以上述べたように、ドップ ラーフリー2 光子吸収分光システムの開発に成功した。

(3) 光シンセサイザーの開発

光シンセサイザーは、光周波数コムを利用して、レ ーザー分光用の光源の周波数を制御するシステム である。上に述べたように、製作した光周波数コムの 各モードの周波数は安定化されている。この各モード を光周波数の基準として、分光光源の周波数を掃引 する。

このためには、光周波数コムの出力光と分光光源



図6. 光周波数コムと分光光源とのビート

の出力光の周波数差を制御すれば良い。これらの光を重ねて測定するとビートが観測されるので、 このビート周波数(f<sub>beat</sub>)を制御する。本研究においては、図6に示すように、このビートの測定に成 功した。 さらに、光シンセサイザーを広 い周波数範囲にわたって掃引す る際、f<sub>beat</sub>が 0, f<sub>rep</sub>/2, f<sub>rep</sub>付近とな ると、ビート成分をフィルターで 取り出すことができなくなる(図 7(a))。本研究では、音響光学変 調器を利用して分光光源の周波 数をシフトさせるシステムを開発



図7. 光周波数コムと分光光源とのビート。(a) f<sub>beat</sub>~0の場合。 (b) 音響光学変調器で周波数シフトさせた場合。

した。これによって、*f*<sub>beat</sub>の値によらずビート成分をフィルターで取り出すことができるようになった (図 7(b))。

5. 自己評価

本研究の目的は、光周波数コムを利用した超高分解能分光計測システムを製作すること、および、それを使用して実際に分子分光を行うことである。

まず、分光計測システムの製作については、光周波数コムおよびドップラーフリー2 光子吸収分 光システムの開発に成功し、両者を組み合わせた光シンセサイザーの完成にあと一歩のところま で迫ることができた。これを完成させるために、原理的な問題は既にないといえるが、電気的・機 械的雑音の除去を地道に続けていく必要がある。

分光計測システムを完成させることができなかったため、分子分光を行うことができなかった点 は残念であった。しかし、細部に至るまで準備は済ませてあり、光シンセサイザーが完成次第、す ぐに分子分光を行える体制は整っている。

また、研究期間中に、光周波数コムの研究に中心的な役割を果たした J. L. Hall と T. W. Haensch の両氏にノーベル物理学賞が与えられた。このためもあってか、比較的地味な分野であ った精密分光法の研究が脚光を浴び、競争が激化することになった。この中にあって、本研究は、 多原子分子の高分解能分光へ向けたシステム開発として、独自性を打ち出すことに成功したと考 えている。

6. 研究総括の見解

多原子分子の分光学的研究は、環境問題や生命科学の基礎として極めて重要である。本研究 は、ますます高精度化する分光計測に必要となる優れた精度の波長目盛を持つ安定化した光周 波数コムの実現を狙う。さらに、この光周波数コムと2光子吸収分光を組み合わせた超高分解能 分光システムの実現をも狙う。主たる成果は次の2点である。

①GPS 衛星に搭載されたセシウム原子時計を利用したきわめて安定性の高い光周波数コムを完成させ1オクターブ以上にわたって周波数同定が可能な装置開発に成功した。

②光周波数コムとのドッキングを前提としたドップラーフリー2 光子吸収分光システムを作成し、誤 差信号による制御方法により、ドップラーフリー計測を可能とする共鳴条件を安定して維持するこ とに成功した。 本研究の基本部分がそれぞれ完成したことは評価できる。研究成果は1件の原著論文にまと められ、10件の学会発表で公表された。

今後、①安定化した周波数コムと②ドップラーフリー2 光子吸収分光システムとのドッキングに より、さまざまな多原子分子の精密スペクトルの測定が可能となり、ダイナミクス解析の応用例が 発表されることが期待される。GPSに搭載した原子時計を利用して手軽に高精度を得るというユ ニークな発想は実現しており、重要性がますます高くなる超高分解能レーザー分光の普及の促進 に資するだろう。幅広い分野に応用可能な計測基盤技術として大きな貢献が期待できる。

## 7. 主な論文等

# (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

- (1)論文(原著論文)発表 なし
- (2)特許出願 なし
- (3)学会発表

## 口頭発表(国際)

• M. Misono, M. Okubo, K. Dairiki, "Development of a system for high resolution spectroscopy with an optical frequency comb," International Symposium on Molecular Spectroscopy 61st Meeting, (The Ohio State University, USA), 2006.

## 口頭発表(国内)

・御園雅俊, "超高分解レーザー分光のための光周波数コムの開発,"九重分光学関連夏 季セミナー2005, 2005.

・御園雅俊, 大久保光士, 大力研介, "光周波数コムを利用した超高分解能レーザー分光シ ステムの開発 II," 第六回 分子分光研究会, 2006.

・御園雅俊, "光周波数コムを利用した二光子吸収分光システムの開発,"平成 18 年度日本 分光学会九州支部研究会, 2007.

## ポスター発表(国内)

• M. Misono, T. Todo and T. Kohmoto, "Stabilization of a single frequency light source in visible region by using optical frequency comb," 平成 19 年度 日本分光学会年次講演会, 2007

### (B) その他の主な成果

(1)論文(原著論文)発表

## 論文(国際)

· M. Okubo, J. Wang, M. Baba, M. Misono, S. Kasahara and H. Kato, "Doppler-free two-photon excitation spectroscopy and the Zeeman effects of the S<sub>1</sub>  ${}^{1}B_{1u}(v_{21}=1) \leftarrow S_{0}$  ${}^{1}A_{g}(v=0)$  band of naphthalene-d8," Journal of Chemical Physics, Vol. 122, No. 14, 144303 (2005). (2)特許出願 なし

## 研究課題別評価書

1. 研究課題名

生細胞内分子を見るデグロンプローブの開発

2. 氏名

三輪 佳宏

3. 研究のねらい

近年,急速に発展しているバイオイメージング研究。現在の技術では、取り出して培養している 細胞の中の様子は非常に詳しくイメージングすることができるが、まだ生きたままの動物での観察、 とくにヒトのモデル動物として病気の治療や薬の開発に使われているマウスでのイメージングは 容易ではない。今後、たくさんの細胞からなる動物個体の中で、一つ一つの細胞がどのように全 体として統合されているのかを明らかにしていくためには、実験動物を殺すことなく体内での分子 挙動を見る技術を発展させることが必要である。

我々は、大腸菌が持っている Tet リプレッサー(以下 TetR)タンパク質の遺伝子をヒトの細胞に 導入して発現させて解析している中で、正しいアミノ酸配列の野生型 TetR タンパク質は ヒト細胞 中でも非常に安定だが、いくつかの変異を導入した変異体では、非常に不安定になって分解され てしまうことを見いだした。以前にも正常なタンパク質は細胞中で安定だが、変異型タンパク質は とても不安定になってしまい、細胞中ですぐに分解されてしまう例は知られていた。ところがそれだ けではなく、この TetR タンパク質が結合する、感染症の治療に使われる抗生物質のドキシサイク リン(以下 dox)を加えておくと、不安定な変異タンパク質であっても安定化して分解されなくなるこ とも見いだした。このことは「抗生物質があるか、ないかで、分解されるかどうかが制御される」と いう新たな性質を獲得した変異体をつくりだすことができることを意味している。そこで、こうした分 子間相互作用依存性に分解制御がかかるタンパク質を「デグラトンプローブ」(申請時はデグロン プローブ)と名付け、本研究ではその実際の応用を進めることと、新たなプローブを効率よく開発す るための分子基盤を明らかにすることを目標に研究を行った。

4. 研究成果

1) デグラトンプローブの生きた動物個体イメージング への応用

この変異 TetR を応用することで、生きたままの動物の中でいまどこに dox という薬が存在しているかを見ることができるようになるのではないかと考えて、研究を開始した。まず変異 TetR タンパク質を、それ自体が蛍光を発することができる蛍光タンパク質 GFP との融合タンパク質として細胞中に発現させると、





普段の細胞中では GFP も変異 TetR と道連れになって分解されてしまうため、細胞からほとんど 蛍光が検出されなかった。ところがここに dox を加えると、変異 TetR に結合して分解を止めるので、 融合タンパク質全体が安定化して細胞中に蓄積し、非常に明るい緑の蛍光が観察されることを見 いだした。すなわち、今、細胞の中に dox という薬があるかどうかを、緑の蛍光が光っているかどう かで判定できる実験系を構築することができた。

そこで次に、この「変異 TetR-GFP」融合タンパク質が全身の細胞で作られているような遺伝子 導入マウスを作成した。このマウスは普段は光っていない普通のマウスだが、dox を投与すると、 dox が存在する間だけしかも dox が存在する場所だけが緑に光ることが予想され、生きたままの マウスの体内の薬を光として検出できると期待される。これまで投与後の薬の挙動を調べるには、 もっぱら血中濃度の経時変化が調べられている。しかし実験動物を用いた場合でも、解剖してど の臓器に薬が達しているかを調べることは可能だが、その場合には数百匹という大量の動物を殺 しながら実験をすることが必要であった。また解剖すると言っても、1つ1つの細胞の種類を分け て集めることは大変なので、どんな種類の細胞に薬がよく取り込まれているのかを判定すること は困難であった。ところが今回作成したマウスで観察してみると、薬が取り込まれている細胞だけ が光るので、高い解像度でイメージングすることが可能になり、どういう種類の細胞に薬が取り込

まれやすいかを簡単に判断で きた。しかも薬を投与してから、 体から排出されてなくなって行 くまでの時間経過を、たった1 匹の動物で連続して観察する ことが可能になった。



図2 Tet デグラトンプローブ発現マウス

そこで多数のマウスで比較してみると、遺伝的な背景がよくそろったマウスであっても1匹ごとに かなりの個体差があることも明らかになってきた。さらにマウスの成長に合わせて体内の薬の動 態が変化することなども同じ個体で連続して観察できた。また、母親マウスにだけ薬を投与しても 母乳の中に薬が混じってしまうため、その母乳を飲んでいる生まれたばかりの新生仔にも薬が移 行してしまい、仔マウスが緑に光ることも観察された。

このように、生きたままの実験動物で薬の動きを観察できるということは、少ない動物しか飼育し ていなくてもこれまでよりはるかに正確なデータをとることが可能になり、優れた薬の開発の上で、 非常に有用であることが期待される。また犠牲にする動物も少なくでき、動物愛護の点からも非常 に望ましい。

2) デグラトンプローブの開発基盤の確立

2-1)分解制御プローブに至適な蛍光タンパク質の探索

こうして、タンパク質分解制御プローブは、哺乳動物はもちろん様々な生物種に幅広く応用で きる優れた技術であることを示すことができた。そこでもう一つの重要なテーマとして、こうしたプロ ーブを次々と開発できるような技術基盤を確立することを目指して、研究を行った。

まず初めに、今回用いた蛍光タンパク質である GFP が、本当にこうしたプローブに適しているか どうかについて検証した。というのも、GFP は細胞内で非常に安定で分解を受けにくいタンパク質 であることが知られているからであり、もしも他の蛍光タンパク質を用いることで、薬を除去した際 の蛍光の消失が早くなるのであれば、時間分解能の高いより実体に即した計測が可能になると 期待される。そこで、GFP を 13 種類の他の蛍光タンパク質に置き換えたプローブを作成し、培養 細胞を用いて、1)プローブそのものの明るさ(感度)、2)dox の有無による蛍光強度の違い(バッ クグラウンド)、3)薬物の濃度変化に応じた蛍光強度の時間変化(時間分解能)について解析した。 その結果、dox 添加時には GFP よりも強い蛍光が得られるのに、dox 非添加時にはほとんど蛍光 が検出されないプローブや、dox の変化に合わせた蛍光強度の時間変化も早いプローブを開発す ることができた。今後、他のプローブを開発する際には、この知見に基づいて目的に合った蛍光タ ンパク質を用いることにより、より幅広い解析に対応できることが明らかとなった。

2-2)様々な生物種での共通性について

新規プローブの開発を容易にするためのもう一つの考え方として、今回見いだしたような、タン パク質の状態を見分けながら分解制御するシステムの分子実態を明らかにできれば、今後のデ グラトンプローブ開発を効率よく進めることが可能になると期待される。そこで、この分解制御シス テムは哺乳動物に特徴的なものか、それとも広く様々な生物種に共有されているのかについて解 析した。まず同じ脊椎動物のゼブラフィッシュの受精卵を用いて、Tet デグラトンプローブを強制発 現させて、dox の有無による蛍光強度の変化を観察した。その結果、dox の濃度依存的に蛍光強 度が増強されることが明らかとなり、魚類にも同じような分解制御システムが存在することが示さ れた。次に節足動物のショウジョウバエにおいても受精卵に発現ベクターの DNA をインジェクショ ンし、dox の有無による蛍光強度の違いを解析したところ、やはり dox の濃度依存的に蛍光増強 が起こることを見いだした。このことから、不安定な変異タンパク質が他の分子と相互作用するこ とで分解制御を受けるシステムは、広く普遍的に様々な生物に備わっていることが明らかとなっ た。

2-3)タンパク質の状態を見分ける分子実体の解明

次にいよいよその分子実体を明らかにすることを試みた。Tet デグラトンプローブの状態を見分 けて分解している以上は、分解制御因子はなんらかの形でこのプローブに結合していると予想さ れる。そこで、FLAG タグを結合させたプローブを細胞に過剰発現させた後、抗 FLAG 抗体で沈殿 させ、一緒に沈殿してくるタンパク質を質量分析によって網羅的に解析した。21種類のタンパク質 が同定された中で、通常の状態では結合が見られないのに、プロテアソーム阻害剤の MG132 を 添加してタンパク質分解を強制的に止めた場合にのみ結合が見られる、因子 F と名付けたタンパ ク質に注目し、さらに解析を行った。この因子 F の遺伝子発現をノックダウンできる shRNA の実験 系を構築し、細胞内での量を減らしてみたところ、その減り方に依存して dox を添加していないに もかかわらず Tet デグラトンプローブの蛍光強度が増強されることを見いだした。このことは因子 F がプローブタンパク質の状態を見分けて分解系に引き渡す、一種の細胞内の警察官のような役割をしているタンパク質であることを示唆している。

5. 自己評価

研究の前半において、予定していたトランスジェニックマウスを作成するとともに、前例の少ない 生きたままでのマウス in vivo イメージングについて、新しい装置の導入、撮影条件の検討、定量 的な解析手段の確立など、様々な技術開発を実施できた。特に、この方法を使うことで初めて、各 臓器の細胞の中に実際に薬物が到達しているかどうかをイメージングできるなど、当初予想して いた以上に発展することができ、「何がどこまで見えるのか」ということを先駆けて解析できたこと は非常に意義があったと考えている。その応用の一つとして、実験動物個体における薬物動態に 関して、たとえ遺伝的な背景がよくそろっていてもかなりの個体差が出ることなども突き止めること ができたことも、有意義な成果であったと考えている。

研究の後半は、分解制御を応用する本研究のプローブに適した蛍光タンパク質の幅広い探索 など、プローブ開発の基盤となる基礎技術に関しても情報を蓄積することができた。蛍光タンパク 質を使っている研究者は世界的にも非常に多いが、成熟や分解といった細胞内での基本的な動 態に関して網羅的に解析している例は少ない。

一方で、デグラトンプローブの分解制御の仕組みが生物種を超えて様々な動物に保存されてい るかどうかを明らかにすることや、このシステムの分子実体を解明することを目標に解析をすすめ たが、思った以上に手こずってしまい本研究期間中に十分に論文として公開することが間に合わ なかったことは、大きな反省材料である。最後の最後に間に合いはしたものの、今後早急に検証 を進めて発表することが必要である。

6. 研究総括の見解

生きたままの動物個体中の薬物等の分布を可視化するプローブの開発を目指し、これをデグラ トンプローブと命名して、特徴あるプローブ作製概念を展開している。主たる成果は次の2点であ る。

 ①デグラトンプローブを全身に発現したマウスを作り、それを用いた薬物の in vivo イメージングに 成功した。本手法が哺乳動物だけでなく動物全般に幅広く応用できる可能性を実証した。
 ②各種蛍光タンパク質をタンパク質分解制御タンパク質に結合したプローブを作製し、感度、バッ クグランド、時間分解能の改善を図り、蛍光イメージングに最適なプローブの開発に成功した。

実用に直結する生体内薬物動態を可視化するデグラトンプローブを開発し、その信頼性と一般 性を高めた努力は高く評価される。また、トランスジェニックマウスであっても一匹ごとに薬物動態 に個体差があることを確認するなど、このプローブによる生命現象研究に応用面でも興味深い進 展を見せている。また、本プローブの作用機構に関する研究も進め、興味ある手がかりを得て、更 なる解明を進めている。

研究成果は1篇の原著論文、15件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づ く特許3件を出願している。また平成17年度に「第37回倉田記念日立科学技術財団研究助成」、 平成 20 年度に、「財団法人島津科学技術振興財団研究開発助成」を受賞している。

このプローブ概念の一般化は、本さきがけ領域として大いに期待したいところであり、理論的裏 付けとなる研究の更なる進展に期待したい。基礎的な生命科学研究はもちろん、創薬や環境問 題などへの多大な貢献が期待できる。

## 7. 主な論文等

## (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

- (1)論文(原著論文)発表 なし
- (2)特許出願
  - 発明 者:三輪 佳宏
  - 発明の名称:テトラサイクリン系抗生物質によるタンパク質分解制御法
  - 出 願 人:科学技術振興機構
  - 出 願 日:2005.09.15
  - 出願番号:特願2005-269074
  - 発明 者:三輪 佳宏
  - 発明の名称:テトラサイクリン系抗生物質によるタンパク質分解制御法
  - 出 願 人:科学技術振興機構
  - 出願日:2006.08.31
  - 出 願 番 号:PCT/JP2006/318673
  - 発明 者:三輪 佳宏

発明の名称:抗生物質によるタンパク質の転写・分解二重制御法

- 出 願 人:科学技術振興機構
- 出 願 日:2007.03.15(未公開)
- 出願番号:特願2007-065415

発明 者:三輪 佳宏

発明の名称:抗生物質によるタンパク質の転写・分解二重制御法

- 出 願 人:科学技術振興機構
- 出 願 日:2008.03.14(未公開)
- 出 願 番 号:PCT/JP2006/未通知
- (3)受賞
  - ·平成 17 年 3 月 第37回倉田記念日立科学技術財団研究助成(平成16年度)
  - ·平成 20 年 2 月 財団法人 島津科学技術振興財団 研究開発助成(平成19年度)

(4)著書

・田中順子、三輪佳宏、"デグラトン・プローブータンパク質分解を応用した分子イメージング 法--"、高分子(高分子学会刊行)、2005

・田中順子、三輪佳宏、"フローサイトメトリーのすすめ?"、バイオテクノロジージャーナル (羊土社)

・吉田直樹、田中順子、三輪佳宏、"デグラトン・プローブを用いた生きたマウス体内での蛍 光分子イメージング"、細胞工学(秀潤社刊行)、2006

・三輪佳宏、田中順子、吉田直樹、"デグラトン・プローブを用いた蛍光イメージング"、蛋白 質 核酸 酵素(共立出版刊行)、2007

・三輪佳宏編集「-実験がうまくいく- 蛍光・発光試薬の選び方と使い方」羊土社 10 月
 2007 年

(5)学会発表

口頭発表(国内)

・藤村 浩史、田中 順子、後藤 勝年、三輪 佳宏、"Tet system における Tet オペレーター 繰り返し配列の影響"、第27回 日本分子生物学会年会、2004

・吉田 直樹、田中 順子、三輪 佳宏、"in vivo イメージング技術を応用した血液脳関門の 可視化"、第30回 日本分子生物学会年会、2007

ポスター発表(国内)

・吉田友里、藤村浩史、田中順子、三輪佳宏、"Tet 二重制御系による conditional gene targeting 技術の開発"、第30回 日本分子生物学会年会、2007

(6)招待講演

## 招待講演(国際)

 Miwa Y. and Tanaka J. "A novel method to visualize protein interactions in living cells using fluorescent protein." -Cancer and Hypoxya 2005-, 2005

### 招待講演(国内)

・三輪佳宏、田中順子、吉田直樹、後藤勝年、"生細胞内分子を見るデグラトンプローブの開発"、第6回日本蛋白質化学会年会、2006

・三輪佳宏、"ここまでできる! マウス in vivo イメージング"、臨床応用を目指した産学連携 セミナー3-分子細胞イメージングと疾患・創薬研究-、2006

・三輪佳宏、田中順子、吉田直樹、"バイオイメージングにおける異分野融合"、第15回農芸 化学 Frontiers シンポジウム、2007

・三輪佳宏、吉田直樹、田中順子、"Visualizing molecules in living mammalian animals using degraton probes"第59回日本細胞生物学会・第40回日本発生生物学会 合同大会、2007

## (B) その他の主な成果

# (1)論文(原著論文)発表

# 論文(国際)

· Kagoshima H, Nimmo R, Saad N, Tanaka J, Miwa Y, Mitani S, Wooland A. The C. elegans CBF $\beta$  homologue BRO-1 interacts with the Runx factor, RNT-1, to promote stem cell proliferation and self-renewal Development 134, 3905-3915, 2007

(2)特許出願 なし

# 研究課題別評価書

1. 研究課題名

界面のキラリティを捉える非線形顕微分光の開発

2. 氏名

八木 一三

3. 研究のねらい

生体分子が不斉(キラル)であることは良く知られている。最近、極微量の分子が界面に自己組 織的に集合して形成されるキラル界面(不斉界面)とそれに基づく分子認識能が重視されつつあ る。しかし、キラル界面ではそのキラリティに関与する分子・原子数が圧倒的に少なく、界面のキ

ラリティを評価できる汎用ツールは現状では確立されていない。現 在最も高感度なキラル分光法は、二次高調波発生(SHG)法や和周 波発生(SFG)法等の二次非線形分光法であると見なされており、キ ラル液体の評価や液体表面の単分子層などについてキラリティを計 測した結果が続々と報告されている。本研究では SHG もしくは SFG 分光計を基に、キラル界面を評価するための高感度化を図ると同時 に、局所的なキラリティをも検出可能な顕微分光化を目指した。



図1 SHG および SFG 法 の概要。

4. 研究成果

(1)二次高調波発生(SHG)分光による原子配列がキラルな金単結晶表面の評価

金属単結晶の高指数面の中には、ステップとキンクのジグザグ構成によりキラリティを発現し、 それに基づく不斉認識・不斉反応が可能な表面配向が報告されている。本研究では、このような

不斉金単結晶表面を調製し、SHG回転異方 性(SH-RA)測定による評価を試みた。金単 結晶表面は火炎溶融法により作製し、任意の 方向に切り出し、鏡面研磨を行うことで調製し た。SHG測定は空気中で行い、入射光として ナノ秒の可視パルス光を用い、反射光に含ま れるSH光(元の半分の波長を有する光)の強 度を検出した。SH-RAパターンは、入射・出射 の偏光を規定した状態で試料表面をその法 線について回転させながらSH光強度を測定 し、得られたSH強度を方位角に対して極座標 プロットすることで得た。図2に本研究で用い たAu(643)<sup>S</sup>およびAu(643)<sup>R</sup>面の表面構造を示



図 2 Au(643)<sup>s</sup>面と Au(643)<sup>R</sup>面の構造。

図 3 Au(643)<sup>S</sup>および Au(643)<sup>R</sup>におけるSH-RA パターン(p/p)。 す。これらの面はステップを構成する原子が捩れた配列を構成するため互いに鏡面対称である。 これらの面についてp-偏光入射/p-偏光出射(p-in/p-out)の条件で測定したSH-RAパターンは 図 3 に示したとおり、明確な鏡像対称性を示した。他の偏光条件(p-in/s-out、s-in/p-out、 s-in/s-out)でもSH-RAパターン自体がキラリティを示した。これらのSH-RAパターンは、Au(111) 表面のC<sub>3</sub>v対称をベースとし、その上に任意のオフセット角度を付与したステップ・キンクによる表 面対称性の破れ(C<sub>s</sub>およびC<sub>2</sub>v対称性)を重畳した理論式によりフィッティングできた。このような結 果は測定波長を変えても再現され、SH-RAパターンの測定により表面のキラリティを評価できるこ とが明らかになった。また、キラルサイトの表面密度を変えた試料で測定を実施すると、パターン の形状が変形し、これについてもパターンフィッティングで得られたパラメータの比と表面に存在す るキラルサイト数(実際には同じ形状のジグザグ単原子ステップのステップ密度)との相関が認め られ、表面のキラリティ判別だけではなく、キラルサイト数の定量にも利用できることを明らかにし た。最近になって、我々の成果と対比して、線形反射分光異方性でもキラリティ判別ができること が示されたが、キラルサイト数の定量には至っていない。そのため、依然として非線形分光の優 位性は明確である。

(2)和周波発生分光によるキラル分子修飾表面の分析

次に、キラル分子で形成された薄膜におけるキラリティ を評価するため、界面の振動構造に敏感な可視−赤外和 周波発生(SFG)分光計を構築した。ガラス基板上に構築 した 1.1'-bi-2-Naphthol(以後、BINOL と略す)の結晶性 薄膜をそれぞれ構築した。赤色光(640 nm)のピコ秒パル スと赤外光のフェムト秒パルスを同時かつ同位置に照射 した際、それぞれの反射光の間に特定の方角に向けて発 生する SFG 光を測定した。このとき、赤色光の偏光を表 面に対して垂直に偏向している赤外光の偏波面に対して 左右にそれぞれ 45° 傾けて(実際には位相差を制御し て)SFG スペクトルを測定することにより、キラリティが判 別できる(赤色光の偏波面が、光の進行方向から見て、 右側に傾いている場合を+m、左側に傾いている場合を -mと標記する)。図4にS-BINOLとR-BINOLのそれぞ れの SFG スペクトルを示す。赤色光の偏光が左右どちら かに傾くだけで、信号強度が大きく変化することがわかる。 また、当然、ラセミ混合物(R-体とS-体が等量含まれてい る状態)の結晶膜では、このような差が認められなかった。 さらに、キラリティに起因する信号の変化量は、ppp 偏光 状態で測定したスペクトル強度の 20~50%にまで及び、他 の光学的手法と比較して、圧倒的な感度を有することが わかる。これは、SFG という二次の非線形光学現象が、



図 4(a) R-BINOL, (b)S-BINOL 薄膜の SFG スペクトル。(実線:p(+m)p, 破線: p(-m)p 偏光配置での測定結果) 偏光配置の 標記は、[SFG][Visible][IR]の偏光状態を示 す。P 偏光は、試料表面に対して垂直な電 場成分が優勢、m は mixed (P+S)) (c)はそ れぞれの差分をプロットしたもの。

反転対称性の崩れた場でのみ起こることに起因する。p(+m)p 偏光条件でのスペクトルからp(-m)p 偏光条件でのそれを差し引いてプロットすると、図 4(c)のようになり、あたかも円二色性(CD)スペ クトルと同等のスペクトルが得られ、明確なキラリティの判別が可能であることを示唆している。こ の系については、それぞれの鏡像体で表面修飾を行った基板上への結晶成長が、結果として異 なる膜構造の形成につながることも見いだしている。

上記のような結晶膜と比較して単分子層レベルに なると、信号に寄与する分子数が圧倒的に少なく、 キラリティの判別も難しくなる。しかしながら、SFG信 号が得られる膜であれば、本来得られるべき感度を 考慮すれば、単分子層でもキラリティの判別が可能 であろう。そこで、末端にカルボン酸基を有するメル カプトデカン酸をAu表面に修飾した後、末端にアミノ 基を有する 1,1'-Binaphthyl-2,2'-diamineをペプチド 結合により固定化した試料を調製した。図 5(a)に生 スペクトルを表示するが、Auからの信号(黒線)と比 較して、S-ビナフチル修飾表面からの信号(赤線) には、ディップが明確に見える。このスペクトルをAu からのスペクトルで規格化し、IR波数に対してプロッ トしたのが図 5(b)である。ちょうど、ビナフチルリング のC-H伸縮に対応する 3050 cm<sup>-1</sup>にバンドがあり、 可視光の偏光を(+m) → (-m)へと変えることで、バ ンド強度も変化することから、ビナフチル基のキラリ ティを捉えていることが明確である。今回の修飾法 では、ペプチド結合による表面固定分子数が完全 被覆よりもかなり小さいため、分子層の配向があま



図 5(a) S-binaphthyl 修飾金表面(赤線)と清 浄金表面(黒線)からの SFG スペクトルおよ び(b)清浄金表面からの SFG スペクトルによ り規格化した S-binaphthyl 修飾表面の SFG スペクトル。入射可視光の偏光を(赤線)+45° と(青線)-45°に設定し、測定した結果をそ れぞれ示している。横軸は入射した赤外光の 波数に換算している。

り揃っていないことが予想され、スペクトルがブロードになり、かつバンド強度も小さくなってしまっ ているが、これをビナフトジチオールのようなリジッドな単分子層を形成する分子にすることで、よ り高S/N・高S/Bのスペクトルが得られると考えている。いずれにしても、サブモノレイヤーレベル でキラリティ判別が可能であることが確認できた。以上の結果については、論文としてまとめてい る段階であり、結晶膜については投稿済み、単分子膜については投稿準備中である。

5. 自己評価

当初の目標に対しておよそ 6 割程度の進展であると考えている。キラル単結晶表面のキラリティ ィ判別と、表面分子層のキラリティ評価は、ほぼ目標(以上)の感度に達した。特に、可視光が非 共鳴(可視・赤外二重共鳴ではない状態)でも、SFG 測定により単分子層あるいはサブモノレイヤ ーレベルでキラリティ判別が可能であることを示すことができた。キラル分子をキラル表面に作用 させた時の *in situ* 測定に関しては、顕微分光化の立ち上げと産総研の本務である界面水スペクト ルの計測を優先したため、滞っている。顕微分光化に関しては、端緒としてマクロ光学系に STM を組みあわせた実験系を組んだが、明確な信号増強を確認できなかった。この実験自体はさきが け研究3年目初頭に実施する予定だったが、結局1年ほど遅れての実施となった。

研究開始直後に所属の異動があり、異動先の組織と実験室の立ち上げに1年近くかかったた め、この間ほとんど実験が出来なかったことが大きく響いた(結局、この期間の遅れがそのまま研 究全体の遅れになってしまった)。さらに異動先の研究ターゲットが燃料電池に特化されており、 当初予定していた(可視領域で共鳴が可能な)生体分子やペプチドのようなキラル巨大分子を試 料として使用できなかったことも(理解していたとはいえ、予想外に制限があり、)災いした。いず れにしても、現在残っている研究課題については、目標がはっきりしているので、本務と平行して 境界領域的なテーマを設定することにより研究を継続したい。

6. 研究総括の見解

キラル界面ではキラル分子の密度が低いため、界面キラリティ計測は困難であった。研究者は 非線形顕微分光を用いることによりキラル界面を評価できる高感度かつ実用的な分析方法の実 現に挑戦している。この結果、次の2点の成果を挙げている。

①金単結晶の表面キラリティを SHG 回転異方性測定により明確に識別し、かつキラルサイト数の 定量化を可能とした。

②BINOL 薄膜のキラリティを可視-赤外 SFG 分光により明確に識別できた。かつ、この方法により単分子層のキラリティの判別も可能であることを証明した。

これらの成果により、非線形分光を用いた本計測法により触媒、生体分子、ナノ材料などの未解 明の局所キラリティ分析が可能となることが証明された。

研究成果は 6 篇の原著論文、2 件の学会招待講演にまとめられている。また、この研究成果に 基づく特許 1 件を出願している。

SHG 分光による金属表面のキラリティ分析技術と和周波発生分光によるキラル分子薄膜およ びキラル修飾表面の分析技術を開発したことは高く評価できる。今後は、構築中のTipenhanced SFG に展開することにより、界面における光学活性分子研究への貢献が一層拡大す ると期待する。

7. 主な論文等

## (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文) 発表

# 論文(国際)

 Ichizo Yagi, Masaki Chiba and Kohei Uosaki, "Optical Recognition of Surface Chirality at Au(hkl) Single Crystalline Surfaces by Second Harmonic Generation Rotational Anisotropy", Journal of the American Chemical Society, 127(36), 12743–12746 (2005)

· Ichizo Yagi, Kensuke Mikami, Kojiro Ebina, Masayuki Okamura, Kohei Uosaki , "Size-dependent Carrier Dynamics in CdS Nanoparticles by Femtosecond Visible-pump/IR-probe Measurements", Journal of Physical Chemistry B, 110 (29), 14192-14197 (2006)

## 論文(国内)

・八木一三、魚崎浩平、"二次高調波発生分光法による金属電極/溶液界面の電子構造評価とキラル化学への展開"、光化学, Vol. 36, No. 1, p.2-9 (2005)

## (2)特許出願 なし

(3)学会発表

## 口頭発表(国際)

· Ichizo Yagi, Kensuke Mikami, Kojiro Ebina, Kohei Uosaki, "Dynamic Behaviors of CdS Nanoclusters Monitored by Time-resolved Visible-pump/IR-probe Spectroscopy", 5th International Symposium on Ultrafast Surface Dynamics(Renamed 46th IUVSTA Workshop on Ultrafast Surface Dynamics), 2006

· Ichizo Yagi, Masaki Chiba, Kohei Uosaki, "Optical recognition of naturally chiral metal surfaces by optical second harmonic generation", The American Chemical Society 232nd National Meeting, 2006

### 口頭発表(国内)

・八木一三、千葉正樹、魚崎浩平、"二次高調波発生法による金単結晶表面のキラリティ評価"、電気化学会第72回大会、2005

・八木一三、千葉正樹、魚崎浩平、"金属単結晶キラル電極表面の分光学的評価"、第25 回表面科学講演大会、2005

・八木一三、"表面和周波発生分光によるキラル表面の評価"、第27回表面化学講演大会、 2007

(4)招待講演

## 招待講演(国際)

· I. Yagi, M. Chiba, K. Uosaki, "Optical Recognition of Naturally Chiral Gold Single Crystalline Surfaces", Symposium on Nanostructure Control at Solid Surfaces for the Construction of Nano-molecular/Bio Devices, 2005

# (B) その他の主な成果

(1)論文(原著論文)発表

### 論文(国際)

 Akari Hayashi, Hideo Notsu, Ken' ichi Kimijima, Junichi Miyamoto and I. Yagi, "Preparation of Pt/Mesoporous Carbon (MC) Electrode Catalyst and its Reactivity toward Oxygen Reduction", Electrochimica Acta, in press (2008) (2)特許出願

発 明 者: 林灯、八木一三、君島堅一

発明の名称: 燃料電池用電極触媒およびこれを用いた燃料電池

出 願 人: 独立行政法人 産業技術総合研究所

出 願 日: 2008.01.31(未公開)

出願番号: PCT/JP2008/051406

(3)招待講演

招待講演(国内)

・八木一三, "ナノ構造制御に基づく燃料電池電極触媒の開発"、北大化学系関連 JST さき がけ研究者によるシンポジウム・化学を基盤とする物質科学イノベーション、2008

# 研究課題別評価書

1. 研究課題名

新規分離・分析場としてのナノチャンネル集合体

2. 氏名

山口央

3. 研究のねらい

物質の空間的・時間的な分離・分析手法は、複数の化学物質の網羅的分析手段として必須とい える。研究者はこれまでに、ナノチャンネル集合体作製に関する革新的技術を世界に先駆けて開 発し、精密分子ふるい能を有する分離・分析場として有効であることを実証してきた。本研究では、 ナノチャンネル集合体作成技術を基軸に分離・分析場としてのナノチャンネルの特異性を解明す ると共に、ナノチャンネルの特異性を利用した物質の空間的・時間的分離手法の開発を目指した。 特に、サイズの異なる一連のナノチャンネル集合体作製手法と機能化手法の確立、ナノチャンネ ル内部の特異な物理物性の解明を図り、ナノチャンネル内部での物質移動を利用した分離・分析 手法の設計と構築を重点的に推進した。

4. 研究成果

(1)ナノチャンネル集合体作成技術の確立

ナノチャンネル集合体は、陽極酸化アルミナ(PAA)膜の円柱状マクロ細孔内にシリカー界面活 性剤ナノ複合体を形成することで得られる。ナノチャンネル内部における物質移動過程は、チャン ネル径と形状に大きく依存することが予想されるため、サイズの異なる一連の界面活性剤を用い たナノチャンネル集合体作成条件について精査した。その結果、表1に示すように直径3~12 nm

表 1 各種界面活性剤を用いて作製した NAM のメソ細孔構造

	界面活性剤						
	Brij76	CTAB	Brij56	Brij78	Brij98	P123	F127
細孔径 /nm	3.0	3.4	3.8	4.6	5.1	8	12
細孔構造	1D	3D	3D	3D	3D	1D or 3D	3D



図1 P123を用いて作製したNAM

の範囲で直径が異なるシリカナノチャンネル集合体の作製が可能となった。また、トリブロックコポ リマーであるP123 界面活性剤を用いた系では、一次元(1D)配向した 1Dナノチャンネル構造、螺 旋あるいはcubic構造の 3Dナノチャンネル構造の作り分けが可能となった(Adv. Mater., 2008)。図 1 にP123 を用いてシリカナノチャンネル集合体を形成させたPAA膜(以降NAMと呼称)の模式図を 示す。さらに、シランカップリングの鋳型交換修飾法を用いたナノチャンネル内部の機能化が可能 であることを確認した(Anal. Sci., 2006)。このように、一連のサイズと構造を有するNAMの作成条 件を確立した。

### (2)ナノチャンネル内部の物性評価

ナノチャンネル内部に閉じこめられた分子の物性(極性、粘性、分子運動性など)は、バルクと異 なることが知られている。これら諸物性の定性的かつ定量的な評価は、ナノチャンネル内部にお ける物質移動を利用した物質分離の設計・開発において必要不可欠である。本研究では、時間 分解蛍光(TRF)分光法による分子運動性の定性評価、膜透過実験による物質拡散の定量評価 を行い、ナノチャンネル内部における物質拡散過程の分子論的な解明を行った。

TRF 分光法による物性評価(JPCB, 2006)では、CTAB が充填された直径 3.4 nm のシリカナノチ ャンネル内部に種々の蛍光プローブ分子(クマリン色素)を導入し、クマリン色素の蛍光ダイナミッ クストークスシフト(DSS)解析を行った。その結果、いずれのプローブ分子においても DSS 寿命が バルク溶液中に比べて3桁程度大きく、シリカナノチャンネル内部の分子運動性がバルク溶液中 に比べて極端に低下することを確認した。さらに、CTAB 充填のシリカナノチャンネル内部におけ る種々のフェロセン誘導体の見かけの拡散係数(DNAM)を膜透過実験により算出(JPCB, 2008) したところ、バルク溶液中に比べて5桁程度小さな値であることが分かった(表 2)。ナノチャンネル 内部におけるクマリン色素およびフェロセン誘導体の存在分布を図 2 に示す。いずれの系におい ても、疎水的な分子はチャンネル中央部に分布し、親水的かつ電荷を有する分子はチャンネル内 壁近傍に分布することが示唆された。

以上の他に、界面活性剤が充填されていないシリカナノチャンネル内部に閉じこめられたアルコ ール分子の粘性および物質拡散係数の評価を行うなど、シリカナノチャンネル内部における分子 運動性と分子の拡散挙動に関する解明は達成できた。



図2 CTAB充填シリカナノチャンネル内部における(a)クマリン色素、(b)フェロセン誘導体の存在分布

(3)ナノチャンネル集合体を用いた分離・分析システムの構築

NAM のクロマトグラフィー応用を目指した場合、NAM の膜厚を 0.5 mm 以上とすることが上記の 拡散係数の値から見積もられた。本研究期間内では、このような膜厚の NAM を作製することがで きなかったためにクロマトグラフィー応用は達成できなかった。作製できなかった要因が PAA 膜作 製にあるため、研究期間終了後も PAA 膜作製の諸条件(印加電圧、酸浴組成など)を精査するこ とで問題を解決し、クロマトグラフィー応用について取り組んでいく。

トリブロックコポリマーである F127 を用いる ことで直径 12 nm のシリカナノチャンネル集合 体を有する NAM が作製できる。このナノチャ ンネル直径は、様々な生体酵素分子をシリカ ナノチャンネル内部に導入可能な値であり、 酵素を NAM に導入することで酵素触媒膜の 作製が可能である。本研究では、グルコース オキシターゼ(GOD)をチャンネル内部に固定 化 した NAM (GOD-NAM)を作製し、 GOD-NAM にグルコース溶液を通液させた場



図3 シリカナノチャンネル集積膜にGODを固定化した 酵素触媒膜

合の酵素触媒反応について検討した(図 3)。その結果、GOD-NAM ではほぼ 100%の反応効率 が観測され、生体酵素を導入した NAM が酵素センサーや酵素触媒反応へ応用可能であることを 確認した(Chem. Commun., 2008)。

これまでに、CTABを用いて作製した NAM では、チャンネル直径(3.4 nm)に依存した分子ふるい 効果が発現することを見出している。本研究では、この他に 3~12 nm の間で一連のチャンネル直 径を有するシリカナノチャンネル集合体の形成に成功している。今後、これらの NAM を用いた物 質のサイズ分離についてさらなる検討を進めていく。

5. 自己評価

本研究では、ナノチャンネル内での物質移動を利用した分離分析手法の開発を目指し、新規ナ ノチャンネル集合体の作製とナノチャンネル内部の物性評価、そして新規分離分析技術への応用 を具体的目標とした。作製については、ほぼねらい通りに一連のチャンネル径を有するナノチャン ネル集合体の作製に成功した。また、物性評価についてはナノチャンネル内部での物質拡散挙 動の定性的・定量的な解明が達成できた。このように、ナノチャンネル集合体に関する基礎的な 知見についての研究成果は得られた。一方、革新的な分離技術への応用については、本研究期 間内にはっきりとした結果を残すことができなかった。これは、具体的な分離対象を研究期間内に 設定してこなかったためと考えている。しかし、本研究期間内での試行錯誤によって、ナノチャンネ ルを利用した分離分析技術の応用対象系についての目星がついてきた。今後も、対象系を絞っ てナノチャンネル集合体を利用した分離技術の開発に取り組み、当初目標の達成を図っていく。 6. 研究総括の見解

独自に開発したナノチャンネル集合体作成技術を基軸に、分離・分析場としてのナノチャンネル の有効性を検証すると共に、ナノチャンネルの特異性を利用した物質の空間的・時間的分離手法 を確立することを研究のねらいとしている。主たる成果として次の2点を挙げることが出来る。

1) 一連のサイズと構造を有するナノチャンネル集合体作成技術を開発した。

2)時間分解蛍光分光法によりナノチャンネル内の物質拡散挙動の計測を可能とした。

また、応用面では、グルコースオキシターゼをチャンネル内部に固定化した GOD-NAM を作製し ほぼ 100%の酵素触媒反応効率を観測した。酵素センサーや酵素触媒反応へ応用も期待でき る。

研究成果は14篇の原著論文、3件の学会招待講演にまとめられている。またこれら成果により、 平成17年度には2005年度日本分析化学会奨励賞受賞を受賞している。

当初の目標であるナノチャンネルの特異性を利用した物質の空間的・時間的分離手法を確立 し、ナノチャンネルを組み込んだ集積型分析チップへの展開するまでに到らなかったものの、各種 ナノチャンネル集合体作成技術を確立し、ナノチャネル中の物質の種々の物理定数を実測し、ナ ノ空間の新たな特異性を明らかにしており、着実に目標に向かって進歩している。これからの応用 面の進展も含めて分析分野の基盤技術として期待は大きい。

7. 主な論文等

#### (A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

# 論文(国際)

 A. Yamaguchi, Y. Amino, K. Shima, S. Suzuki, T. Yamashita, N. Teramae, "Local environments of Coumarin Dyes within Mesostructured Silica-Surfactant Nanocomposite", J. Phys. Chem. B, 110, 3910–3916 (2006).

A. Yamaguchi, T. Yoda, S. Suzuki, K. Morita, N. Teramae, "Diffusivities of

Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium inside Silica-Nanochannels Modified with Alkylsilanes", Anal. Sci, 22, 1501–1507 (2006).

A. Yamaguchi, H. Kaneda, W. Fu, N. Teramae, "Structural control of surfactant-templated mesoporous silica formed inside columnar alumina pores", Adv. Mater., 20, 1034–1037 (2008).
A. Yamaguchi, M. M. Mekawy, Y. Chen, S. Suzuki, K. Morita, N. Teramae, "Diffusion of metal complexes inside silica-surfactant nanochannels within a porous alumina membrane", J. Phys. Chem. B, 112, 2024–2030 (2008).

•W. Fu, A. Yamaguchi, H. Kaneda, N. Teramae, "Enzyme catalytic membrane based on a hybrid mesoporous membrane", Chem. Commun., 853–855 (2008).

(2)特許出願 なし

(3)学会発表

## 口頭発表(国際)

·Akira Yamaguchi, Takashi Yoda, Jun Watanabe, Moataz Mahmoud Mekawy, Yong Chen, Logudurai Radhakrishnan, and Norio Teramae, "Self-assembly of silica-surfactant nanochannels in a porous alumina membrane", Pacifichem 2005, Dec 2005, Honolulu, USA.

## ポスター発表(国際)

·Akira Yamaguchi, Takashi Yoda, Jun Watanabe, Moataz Mahmoud Mekawy, Yong Chen, Logudurai Radhakrishnan, and Norio Teramae, "Self-assembly of silica-surfactant nanochannels in a porous alumina membrane", PITTCON 2006, Mar 2006, Orlando, USA.

(4)招待講演

## 招待講演(国内)

・山口央「垂直配向型ナノチャンネル集積化膜の創製と分離分析場としての応用」第 8 回機 能構造と分析化学シンポジウム、2005 年 1 月、東北大学

・山口央「垂直配向型ナノチャンネル集積膜の開発と分離分析応用」第4回資源科学研究所 フォーラム、2005年3月、東京工業大学

・山口 央「ナノチャンネル集積膜の作製と物質創製場への応用」第 23 回無機分析化学コロ キウム、2006 年 6 月、川渡

### (B) その他の主な成果

- (1)論文(原著論文)発表 なし
- (2)特許出願 なし
- (3)受賞

·平成 17 年 9 月 2005 年度日本分析化学会奨励賞受賞

(4)学会発表

## 口頭発表(国際)

·Yong Chen, Kotaro Morita, Akira Yamaguchi, and Norio Teramae, "Transport properties of molecules across mesoporous membrane composed of silica-surfactant nanochannels", Pacifichem 2005, Dec 2005, Honolulu, USA