「構造機能と計測分析」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成 21,22 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13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） 今回が最終の募集となるので、これまで採択課題のなかった分離分析、質量分析、試料前処理などの研究分野からの応募を重視した。

(4) 選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー4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	102 名	18 名	9 名

(5) 研究実施期間

平成 18 年 10 月～平成 22 年 3 月(8 名） 、～平成 23 年 3 月(1 名（吉田裕美研究者はライフイベントで一年間休職））

(6) 領域の活動状況

領域会議：7回
研究報告会：1 回
生命・計測分析合同研究会：3 回
研究総括（または技術参事）の研究実施場所訪問：25 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。購入設備の性能確認等に関して必要に応じて技術参事が研究者に協力し稼働をスムーズなものとした。

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

（評価の流れ）

平成 21 年 5 月　第 10 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 21 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 22 年 1 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 22 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 22 年 3 月　研究期間終了
平成 22 年 3 月　研究報告書提出

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

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

○荒船　竜一　研究者
光電子分光における光電子放出過程において電子と振動素励起の非弾性相互作用に注目し、その相互作用機構の解明に取り組んだ。レーザーを励起源とした光電子分光を Cu(001)-c(2x2)CO に対して行い、光電子放出現象に振動励起過程が含まれていることを観測し、振動励起非弾性相互作用における「選択律」を明らかにした。この非弾性光電子放出過程が共鳴散乱であると結論し、フォノン励起（脱励起）アシステッド光電子放出モデルを提案した。これは表面振動分光法に新奇計測法を提供するものであり、時間分解法への展開も期待される。

○安　東秀　研究者
電子スピン共鳴吸収法に原子分解能を有する原子間力顕微鏡の手法を応用し、探針直下の試料表面近傍の局所領域のみに高周波磁場を印加し、探針から直接スピン共鳴信号を検出することでスピン検出の空間分解能をナノスケールにまで飛躍的に高めることを狙った。局所領域でのスピン共鳴検出には電気的手法と機械的手法の 2 法の開発を並行して進めた。電気的手法による方法では、試料の境界条件によるスピン波のモードは検出したが、ナノスケールでの検出にはさらに高感度化が必要である。

○石濱　泰　研究者
オミクス解析のための試料前処理法の開発、微小エレクトロスプレー法の開発による LC-MS の高感度化、開発技術の網羅的プロテオーム解析への応用を目指した。試料前処理法としてリン酸化ペプチドの選択的濃縮法、膜タンパク質分解ペプチドの選択的抽出法を、分離法としてはナノ液体クロマトグラフィー、質量分析計（MS）とのエレクトロスプレーインタフェースの最適化などを行い、とくに翻訳後修飾であるリン酸化タンパク質の解析ではそれまで世界で知られていた2倍以上のタンパク質を検出同定するという注目すべき成果をあげた。一連の研究は今後のプロテオミクスにおける方向性を示したと言える。

○大野　雅史　研究者
超伝導体の急峻な転移領域を利用した温度計（TES）と電熱フィードバック（ETF）を組み合わせた

ETF-TES マイクロカロリメータによりシリコン半導体検出器より 2 桁以上優れたエネルギー分解能と早い応答速度を実現し、またTESピクセルをアレー化しアレーイメージングを行うために、カリフォルニア大で取得した SQUID で複数の検知部からの信号を識別する技術の応用を試みている。

〇迫野　昌文　研究者

分子シャペロンプレフォルディンを利用してアルツハイマー病の原因物質であるアミロイドβ(Aβ)オリゴマー全部を一度に定量する独創性の高い分析手法の開発を目指した。プレフォルディンは生体中の可溶性 Aβオリゴマーを選択的に認識するが、結合が弱く高感度定量法開発には至っていない。プレフォルディンの特異性を利用した高感度定量法の開発が望まれる。

〇佐藤　記一　研究者

生化学研究で必須の分析法として広く利用されているサザンブロッティング法、ノーザンブロッティング法、及びウェスタンブロッティング法のそれぞれについてマイクロチップ化による迅速分析法の実現を目的とした。三種のブロッディング分析法をマイクロチップ電気泳動を利用して実現するための基盤技術の開発に取り組み、チップ材料や電気泳動液条件の最適化、多分岐電場制御用流路の作成など創意工夫を重ねて、3種のブロッディング法実現の可能性を示した。実用化に向けた更なる研究の進展を期待したい。

〇初井　宇記　研究者

放射光から得られる軟 X 線を用い顕微軟 X 線分光法を構築し、荷電子が発現するその場で観測できるようにすることを目的に、透過型回折格子分光器を用い高感度軟 X 線分光器を構築した。塩酸フタロシアニン膜の X 線発光スペクトルを測定し、結晶膜のＮＫα 発光のみに共鳴非弾性散乱構造が現れることを明らかにした。また、DNA 分子の電子状態スペクトルの測定にも成功した。水溶液測定も可能とする方法を開発中であり、他の方法では測定できない情報が得られると成果が期待できる。

〇松田　康弘　研究者

元素選択的に電子・磁気状態を計測できる XMCD （X 線磁気円二色性分光）に超小型パルス磁場発生技術を導入し未踏強磁場を発生させ、強磁性体のみならず、常磁性体や反強磁性体も測定可能とすること及びパルス磁場励起における緩和過程ダイナミックス計測も目的とした意欲的な研究である。40 T パルス磁場を用い価数揺動現象を示す Eu イオンの XMCD が強磁場領域で価数依存となることを発見し、XMCD メカニズムが価数によって異なることを見出した。今後連続パルス磁場を用い時間分解 XMCD 測定もねらっている。

〇吉田　裕美　研究者

超微量タンパク質を電気化学的方法により絶対定量をする方法の開発を目的とした独創的な研究である。絶対定量法は一般には用いられる機会が少ないが、計測分析の基本であり、とくにタンパク質のように絶対定量が困難な物質に対して本計測法の開発は意義がある。

測定原理は水相｜有機相間をイオン性物質（タンパク質）を電気的に定量的移動させ、移動する電気量を測定する方法で、原理は単純であるが初めての装置であり各構成要素の開発が重要であった。本研究者は研究開始1年半後にライフイベントにより1年間の研究中断をしたので、装置開発に時間がかかったが、四級アンモニウムイオンをモデル化合物に選び測定原理の確認には成功している。ペンタペプチドを用いた絶対定量についても予備実験ながら成功しており、本研究の方法がタンパク質の絶対定量法として利用できる可能性が示されたことは高く評価できる。現段階では試料量としては 100 pmol 必要であるが、さらに微量化も可能である。定量精度を上げるためには装置の構成要素の更なる改善が必要であり、今後の進展に期待したい。

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

(10) 評価者

研究総括　寺部　茂　　兵庫県立大学　名誉教授

領域アドバイザー氏名(五十音順)

家　泰弘	東京大学物性研究所　所長・教授
大島　忠平	早稲田大学理工学術院応用物理科　教授
大橋　裕二	茨城県量子ビーム研究センター　コーディネーター
神原　秀記*1	(株)日立製作所　フェロー
北森　武彦	東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻　教授
坂入　実	(株)日立製作所中央研究所　主管研究長
庄子　習一	早稲田大学理工学術院電子光システム学科　教授
白木　靖寛	東京都市大学　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　名誉教授 ジーエルサイエンス株式会社技術開発部
田中　通義	東北大学　名誉教授
馬場　嘉信	名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻　教授
前田　瑞夫	(独)理化学研究所基幹研究所前田バイオ工学研究室　主任研究員
渡會　仁	大阪大学大学院理学研究科化学専攻　教授

*1 参画期間　平成 18 年 11 月～

（参考）　※吉田 裕美研究者の平成 23 年 3 月現在の情報を加算。

（1）外部発表件数

	国　内	国　際	計
論　文	9	45	54
口　頭	76	27	103
ポスター	49	54	103
出版	20	4	24
合　計	154	130	284

※平成 22 年 3 月現在

（2）特許出願件数

国　内	PCT	計
5	2	7

※平成 22 年 3 月現在

（3）受賞等

〇荒船　竜一　研究者

平成 20 年 11 月　　日本表面科学会 第 20 回論文賞

〇石濱　泰　研究者

平成 19 年 10 月　　第 39 回（2007 年度）内藤記念科学奨励金（研究助成）

平成 20 年　1 月　　Analytical Sciences 誌 Hot Article Award

平成 21 年　3 月　　2009 年度日本質量分析学会会誌賞

〇松田　康弘　研究者

平成 19 年　2 月　　日本物理学会学術誌　Papers of Editors' Choice

平成 21 年　3 月　　第 30 回本多記念研究奨励賞

〇吉田　裕美　研究者

平成 22 年　2 月　　Analytical Sciences 誌 Hot Article Award

（4）招待講演

国際　12 件

国内　24 件

※平成 22 年 1 月 31 日現在

別紙

「構造機能と計測分析」領域　研究課題名および研究者氏名

（研究費は平成22年1月末に推定した予測値）
（吉田 裕美研究者のみ平成23年3月末の値）

研究者氏名（参加形態）	研 究 課 題 名（研究実施場所）	現 職（応募時所属）	研究費（百万円）
荒船　竜一（専任）	非弾性光電子分光による表面・界面振動解析 （東京大学大学院新領域創成科学研究科）	科学技術振興機構　さきがけ研究者 （東京大学大学院新領域創成科学研究科　産学官連携研究員）	44
安　東秀（専任）	ナノスケール分解能スピン共鳴原子間力顕微鏡の開発 （東京大学物性研究所ナノスケール物性研究部門）	科学技術振興機構　さきがけ研究者 （東京大学物性研究所ナノスケール物性研究部門　リサーチフェロー）	44
石濱　泰（兼任）	オミクス解析用超微小エレクトロスプレー法の開発 （慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科）	慶応義塾大学大学院政策・メディア研究科　准教授 （慶応義塾大学大学院政策・メディア研究科　助教授）	41
大野　雅史（専任）	高速超伝導転移端マイクロカロリメータの開発 （東京大学大学院工学系研究科原子力国際専攻）	科学技術振興機構　さきがけ研究者 （東京大学大学院工学系研究科　特任助手）	47
迫野　昌文（専任）	毒性型アミロイドオリゴマーの高感度検出 （理化学研究所前田バイオ工学研究室）	科学技術振興機構　さきがけ研究者 （理化学研究所前田バイオ工学研究室基礎科学特別研究員）	45
佐藤　記一（兼任）	マイクロバイオブロッティング分析システムの開発 （東京大学大学院農学生命科学研究科）	東京大学大学院農学生命科学研究科助教 （東京大学大学院農学生命科学研究科　助手）	40
初井　宇記（兼任）	価電子をその場観測する顕微軟 X 線発光分光法の開発 （理化学研究所X線自由電子レーザー計画推進本部）	理化学研究所X線自由電子レーザー計画推進本部　チームリーダー （自然科学研究機構分子科学研究所助手）	42

松田　康弘 （兼任）	時間分解 X 線磁気円二色性分光法の開発 （東京大学物性研究所国際超強磁場科学研究施設）	東京大学物性研究所国際超強磁場科学研究施設　准教授 （東北大学金属材料研究所　助教授）	32
吉田　裕美 （兼任）	タンパク質の新規電気化学定量法の開発 （京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科）	京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 准教授 （京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科　助手）	36

研究課題別評価書

1．研究課題名

非弾性光電子分光による表面・界面振動解析

2．氏名

荒船　竜一

3．研究のねらい

超高真空中でよくキャラクタライズされた固体表面、およびその表面に吸着された分子が示す物理・化学現象の基礎的理解は、触媒、結晶成長機構の解明などの応用面でも非常に重要である。表面研究において振動状態に関する情報は電子状態と同様に重要であるが、現在いくつかの表面感度を持つ振動分光法が存在するにもかかわらず十分に整備されてはいない。例えば低い振動エネルギー・モードの緩和過程を直接測定できる手法、ヘテロ界面における振動分析などに適用可能な表面分光法はない。この背景の基、本研究では光電子放出過程における電子と振動素励起の非弾性相互作用に着目した。この相互作用のメカニズムはほとんど解明されていないが、エネルギー的にも空間的にも従来アクセスできなかった領域に振動分光を適用できる可能性を持っている。本研究の目的は非弾性光電子放出過程の詳細なメカニズムを解明し、レーザー励起による非弾性光電子分光を新規な表面・界面分析ツールとして完成させることである。

4．研究成果

本研究プロジェクトの基礎となる着想を説明するために分子吸着した金属表面からの光電子放出過程を考える(図 1)試料表面のフェルミ・レベル近傍において電子状態に特徴的な構造がなければ期待されるスペクトル形状はフェルミ・ディラック分布となる。ここで放出される光電子が吸着分子の振動(振動数ν_{vib}) を励起すると光電子は運動エネルギーを$h\nu_{vib}$失うことになる(図中の青矢印のパス)。この非弾性光電子放出過程は結果として，弾性的に放出された光電子スペクトルのレプリカがフェルミ・レベルの下$h\nu_{vib}$に形成させることになる。観測されるスペクトルは弾性、非弾性成分の和であるから、フェルミ・レベルの下$h\nu_{vib}$の位置にステップが現れると予想できる。我々はこの着想を基にレーザーを励起源とした

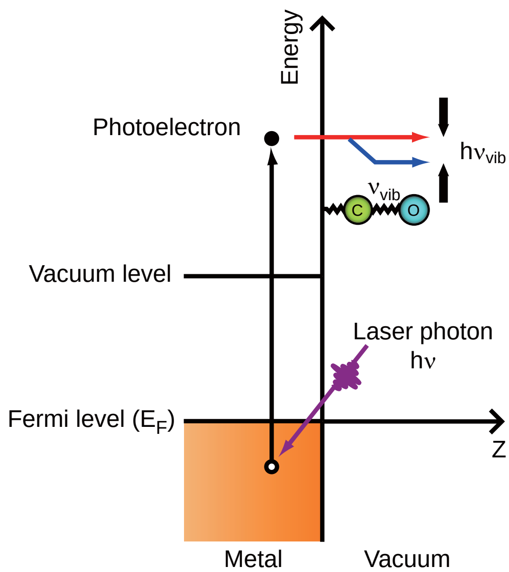


図 1：非弾性光電子放出過程のエネルギー・ダイアグラム。

光電子分光をCu(001)−c(2x2)COに対して行ったところ実際にこのようなステップ構造を見いだした[1,2]。この実験結果は光電子放出現象に振動励起過程が含まれているということを明確に示すものではあるもののその励起機構の詳細は全くといってよい程わかっていなかった。レーザー励起光電子放出過程における振動励起を新奇表面振動分光法として利用・確立するためにはその振動励起機構の解明が不可欠である。本プロジェクトではこの励起機構の詳細な描像を得ることを最大の目的として研究をすすめてきた。以下に主要な成果を示す。

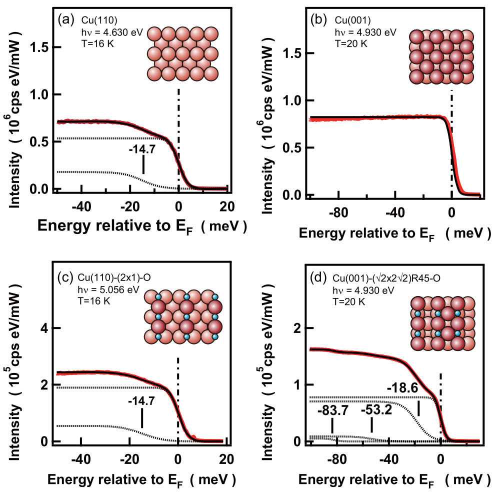


図 2:酸素吸着および清浄な Cu(110)[(a)および(c)]および Cu(001)[(b)および(d)]のレーザー光電子スペクトル。振動エネルギーに対応するステップの位置を縦線で示した。それぞれの表面構造もあわせて示す。

(I) 振動励起非弾性相互作用における「選択律」

図 2 に清浄および酸素吸着した Cu(001)、Cu(110)表面のレーザー励起光電子スペクトルを示す。これらの表面においてフェルミ・レベル近傍の電子状態に本質的な差はない。実際 He 光源やシンクロトロン放射光を用いた通常の光電子分光では、フェルミ・レベル近傍のスペクトル形状に顕著な違いは見られない。しかしながら、光源として低エネルギーのレーザー光を用いた場合、スペクトル形状は表面によって大きく異なる。酸素吸着の有無に関わらず Cu(110)表面にステップ構造が同じエネルギー位置に現われる。この結果はこの 14.7 meV のステップ構造が Cu のフォノンに由来するものであり、かつ表面局在フォノンではなく、バルク・フォノン由来であることを意味している。このステップ構造に加え酸素吸着 Cu(001)のスペクトルに現われるステップの帰属を Cu の電子バンド、フォノン・バンドを基に解析することによって行なった。これらのステップの帰属に伴い以下の 2 つの「表面振動励起選択律」を見いだした。1)励起されるフォノンの波数ベクトルは光励起された電子のそれと一致する。2)励起される振動モードの分極は表面に対して平行である。

これらの「選択律」は IRAS で見られる選択律に比べ厳密なものではない(例外がある)。また、理論的な裏付けが今後必要になるなど課題は多い。しかしこの分光法の特有のものであり、分光分析手法としてみたときに興味深い結果である[3]。

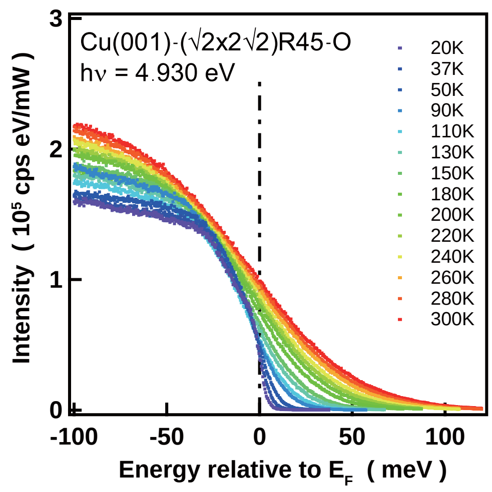


図 3:Cu(001)−(√2x2√2)R45O のレーザー励起光電子スペクトルの試料温度依存性

(II) (振動脱励起)エネルギー利得過程の観測:非弾性光電子放出に関する新モデルの提案

酸素吸着Cu(001)表面を試料としてスペクトル

の温度依存性を測定すると興味深い結果が得られた(図 3)。温度上昇に伴ってフェルミ・レベルにおける光電子強度が増大していることがわかる。この強度増大は清浄Cu(001)スペクトルでは見られなかったので、この強度増大もまた、光電子とフォノンの非弾性相互作用の観点から説明されるべきものである。振動エネルギーの大きさが熱エネルギーkTと同程度の場合、フォノン励起によるエネルギー損失だけでなく、フォノン脱励起に由来するエネルギー利得過程を考慮しなければならない。よく知られているように、フォノン励起確率とフォノン脱励起確率の比は$\exp(-h\nu_{vib}/kT)$で表される。この関係を考慮に入れてスペクトルの温度依存性を解析すると、この光電子強度の温度に依存した増大は、エネルギー利得成分の温度に伴う増大によって説明できる。

光電子放出過程におけるフォノン脱励起を実験的に示したのは本研究が初めてであり、低エネルギー励起光電子スペクトルの温度依存性を解析する際にフォノン脱励起過程を考慮することの重要性を指摘する結果である。しかしながら、この結果それ自身はフォノンとの非弾性相互作用ということから当然予想される事柄にすぎない。議論されるべき結果はエネルギー利得成分が検出されたということではなく、エネルギー利得過程があるにもかかわらず、弾性放出強度が温度によって変化していないということにある。これを説明するために、非弾性光電子放出のための新しいモデルー光電子放出過程において、表面ポテンシャルを乗り越えて放出される電子数がフォノン励起の存在によって増加するというモデルーを提案した。

(III)振動励起過程の同定

光電子放出過程におけるフォノン励起機構を同定するために、励起光エネルギー依存性を測定した(図 4(a))。非弾性成分の強度が励起光のエネルギーに対して強く依存することがわかる(図 4(b))。この結果は励起光のエネルギーに対して非弾性散乱断面積が減少していくことを示している。電子のフォノン励起による非弾性散乱メカニズムは 1)双極子散乱 2)衝突散乱 3)共鳴散乱の 3 つにカテゴライズされるが、本実験結果を解析することによって、このフォノン励起機構が主として 3)共鳴散乱に由来したものであることを明らかにした。

上述したフォノン励起によって電流(=放出光電子数)が増大するという描像や、共鳴散乱が主たる機構であるという点において、非弾性光電子放出過程と非弾性トンネル過程に類似点があることがわかる。非弾性トンネル過程の理論研究は近年急速に発達してきており、それを基にした非弾性光電子放出の理論が構築できると考えている。

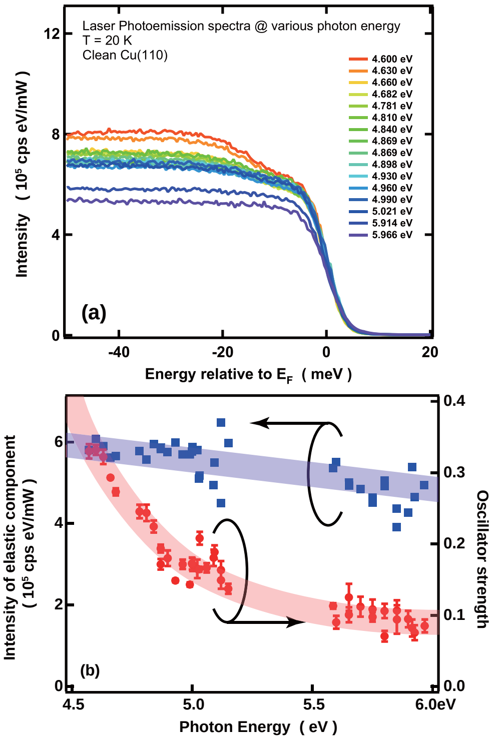


図 4:(a) Cu(110)のレーザー励起光電子スペクトルの励起光エネルギー依存性 (b) 弾性、非弾性成分強度の励起光依存性

参考文献:
[1] R. Arafune *et al.*, Phys. Rev. Lett. **95**, 207601 (2005).
[2] R. Arafune *et al.*, Surf. Sci. **600**, 3536 (2006).
[3] R. Arafune *et al.*, Phys. Rev.B **80**, 073407 (2009).

5. 自己評価

3 年間の系統的な実験を続けることによって、さきがけ提案当初では手がかりすら得られていなかかった非弾性光電子放出過程の機構について、そのシナリオまで提案できたことは評価している。この成果によって非弾性光電子分光が新規表面分光法として原理的には活用可能な手法であることを確立できたと思っている。しかしその一方で当初予定していた時間分解能をデモンストレートする実験等、完遂できなかった項目があることは忸怩たる思いがある。主な原因は超高真空システムの建設中に多数のトラブルに見まわれたこと、レーザー装置の故障等により装置修理に多大な時間がとられてしまったことがある。ひとりでこのような装置の建設を行いそれと平行して、実験・解析を行うスケジュールには少し無理があったのかもしれない。システムそのものの建設は成功したので今後、提案していた内容も含め、さきがけ研究中に着想を得たアイデア等の実現などの研究を発展していきたいと考えている。

6. 研究総括の見解

光電子の非弾性放出現象を利用し表面・界面の振動情報を計測する手法の開発である。表面吸着系に対しレーザー光電子分光を適用し光電子と表面振動素励起(フォノン、吸着種の分子振動など)との非弾性相互作用を観測し、その作用機構を解明し、新奇表面振動分光法を確立することを目指した。主たる成果は次の3点である。

1. 清浄および酸素吸着した Cu(001)、Cu(110)表面のレーザー励起光電子スペクトルを測定した結果から、2つの表面振動励起選択律を提案した。
2. スペクトルの温度依存性の測定結果から、表面ポテンシャルを乗り越えて放出される電子数がフォノン励起の存在によって増加するという非弾性光電子放出の新しいモデルを提案した。
3. スペクトルの励起光エネルギー依存性を測定した結果より、光電子放出過程におけるフォノン励起機構が主として共鳴散乱に由来したものであることを明らかとした。

非弾性光電子放出のメカニズムの解明に取り組み、新しい表面振動分光法の理論的基礎を確立した努力は高く評価できる。

これらの成果は 3 篇の原著論文にまとめられ、3 件の招待講演で発表された。また、平成 20 年度日本表面科学会第 20 回論文賞を受賞している。

本法は将来のプラズモニクスの発達に極めて重要であり、表面系研究への波及効果は極めて大きい。今回は、表面吸着系や界面の動的理解に関して本法の有効性を示す応用例の提示には至っていないが、材料を含めた詳細な検討が必要な段階であり、結論を急ぐ必要はない。インパクトのあるターゲットを探しつつ、この方法をさらにしっかり確立する努力を続けていただきたい。

7. 研究成果リスト

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

（1）論文（原著論文）発表

論文（国際）

・ R. Arafune, M. Q. Yamamoto, N. Takagi, and M. Kawai、"Mechanism of vibrational excitation in inelastic photoemission from solid surfaces", *Phys. Rev. B* **2009**, 80, 073407.

論文（国内）

・ 荒船竜一、 林慶、高木紀明、川合真紀、上原洋一、潮田資勝、"レーザー光電子スペクトル中に表われる振動励起非弾性構造"、*表面科学* **2007**、28、 378.

（2）受賞

・ 2008 年 11 月　日本表面科学会　第 20 回論文賞、表面科学　28(7), 378 (2007)「レーザー光電子スペクトル中に表われる振動励起非弾性構造　」

（3）学会発表

口頭発表（国際計4件）

・ M. Yamamoto, R. Arafune, N. Takagi, and Maki Kawai, Phonon Excitation by Inelastic Scattering of Photoelectron on Cu(110) and Ag(110),26th European Conference on Surface Science, Parma, Auditorium Paganini e Centro Congressi di Parma, September 1, **2009**.

・ R. Arafune, M. Yamamoto, N. Takagi, Yoichi Uehara, S. Ushioda , and M. Kawai, Energy gain process in laser photoemission through excitation of surface vibrations, The 6th Conference on Ultrafast Surface Dynamics, Kloster Banz, July 21, **2008**.

・ R. Arafune, K. Hayashi, N. Takagi, M. Kawai, Y. Uehara, S. Ushioda, Inelastic interaction between photoelectrons and surface vibrations, XII International Conference on Vibrations at Surfaces Erice, July 25, **2007**.

・ R. Arafune, K. Hayashi, N. Takagi, M. Kawai, Y. Uehara, S. Ushioda, Inelastic photoemission spectra of oxygen covered Cu(001) surfaces excited by laser photon, The 15th International Conference on Vacuum Ultraviolet Radiation Physics, Berlin, Berlin, Konzerthaus at Gendarmenmarkt, August 3, **2007**.

ポスター発表（国際）

・ R. Arafune, M. Yamamoto, N. Takagi, Y. Uehara, S. Ushioda , and M. Kawai、Inelastic component from surface vibrational excitation in laser photoemission、The 25th European Conference on Surface Science Liverpool, The University of Liverpool, July 29, **2008**.

（4）招待講演

招待講演（国内）

- 荒船竜一, 林 慶, 高木紀明, 川合眞紀, 上原洋一, 潮田資勝、レーザー光電子スペクトル中に現れる振動励起非弾性構造、第 28 回表面科学学術講演会, 早稲田大学, 11 月 15 日, 2008.
- 荒船竜一 、表面振動励起非弾性光電子放出、日本物理学会 第 62 回年次大会, 北海道大学, 9 月 21 日, 2007.
- 荒船竜一 、レーザー光電子分光における非弾性過程の観測、第 48 回真空に関する連合会, 学習院大学, 11 月 15 日, 2007

研究課題別評価書

1．研究課題名
ナノスケール分解能スピン共鳴原子間力顕微鏡の開発

2．氏名
安　東秀

3．研究のねらい

近年、大きな関心を集めているスピンエレクトロニクス創成の研究動向のなかで、今後、物質中のスピンダイナミクスをマイクロメートル、さらには、ナノスケールの空間分解能で解明することが必須となっている。そのなかで、走査プローブ顕微鏡(SPM)を用いた磁気共鳴(スピン共鳴)現象の検出は、ナノスケールでのスピンダイナミクスの情報を得る有用な手法であると期待される。

本研究では、探針を用いて探針直下の局所領域に高周波磁場を印加し、磁気共鳴を局所に励起及び検出する走査磁気共鳴顕微鏡の開発を目的とする。磁気共鳴の検出手法として、(1)探針から試料へ電気的にマイクロ波を入力する方法（電気的手法）、(2)高周波で機械振動する探針を用いて試料近傍にマイクロ波帯域の変調磁場を発生する方法（機械的手法）の二種類を採用し、磁気共鳴信号検出の空間分解能をナノスケールまでに飛躍的に高めることを狙って研究を行った。

4．研究成果

図1に走査磁気共鳴顕微鏡の概念図を示す。探針を用いて探針直下に磁気共鳴周波数に相当する高周波磁場を印加することにより、磁気共鳴を局所に励起及び検出する。さらに、探針を二次元に走査し、磁気共鳴信号を空間分解検出する。

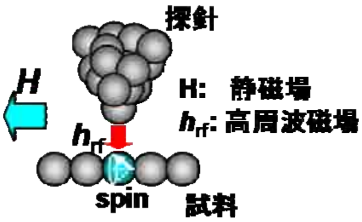


図 1，走査磁気共鳴(スピン共鳴)顕微鏡の概念図

具体的には、(1)探針から試料へ電気的にマイクロ波を入力する方法（電気的手法）、(2)高周波で機械振動する探針を用いて試料近傍にマイクロ波帯域の変調磁場を発生する方法（機械的手法）の二種類を採用した。以下に、それぞれの研究成果について詳述する。

<u>4-1.1，高周波（RF）プローブを用いた電気的手法による、磁気共鳴検出</u>

電気的手法では、図 2 に示すように、同軸型のセミリジッドケーブルを高周波(RF)プローブとして用い、探針先端からマイクロ波(0－10　GHz)を試料表面に照射して磁気共鳴を励起

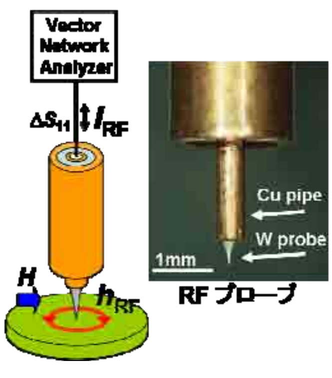


図 2，電気的手法を用いた磁気共鳴検出

する。磁気共鳴検出は、入力マイクロ波の反射シグナルであるS_{11}信号をネットワークアナライザを用いて測定し、磁気共鳴による吸収を検出する。RFプローブ先端にはタングステン探針が装着され、走査トンネル顕微鏡(STM)探針として用いることができる。

先ず、RFプローブによる空間分解磁気共鳴検出を示す適当な試料として、フェリ磁性体であるガーネット(YIG)の多結晶円板(直径10mm, 厚さ 1mm)を選んで研究を行った。図 3 に示すように、高周波プローブを試料中心直上(center)に配置すると、強磁性共鳴(FMR)信号がf_1 = 2.79 GHz(水平磁場 44 kA/m (550 Oe))の周波数に観測された。続いて、静磁場と水平方向(図 3(a))及び垂直方向(図 3(b))へ探針を試料中心(center)から試料端(edge)へ移動すると、それぞれ、f_2 = 3.07 GHz, f_3 = 3.13 GHzの周波数に新たな強磁性共鳴(FMR)信号が計測された。

さらに、試料全体をRFプローブを用いて走査した結果、f_1, f_2, f_3、それぞれのFMR信号の二次元マッピング像が得られた(図 4)。解析の結果、これらは試料端で反射されたスピン波(静磁波)が定在波を形成する際の異なる固有モードであると理解される。観測された固有モードの空間分布及び周波数から、それぞれが静磁場と平行(f_1, f_2)、垂直(f_3)な方向に伝播するスピン波モードであることを明らかにした(IEEE, Mag.. Lett. in press)。

以上、RF プローブを用いた電気的手法によりサブミリメートルのスケールでの磁気共鳴検出が可能であることを示したが、続いて、より微小な(薄膜)試料を用いてRF プローブの高空間分解能化と磁気共鳴信号の高感度化に取り組んだ。これまでに、RF プローブを用いて、Bi:YIG 薄膜(膜厚～5μm、セラミックス基盤工学研究センター、安達氏より提供)より FMR シグナルを得ている(図 5、3 種類の異なる静磁場における FMR シグナルを

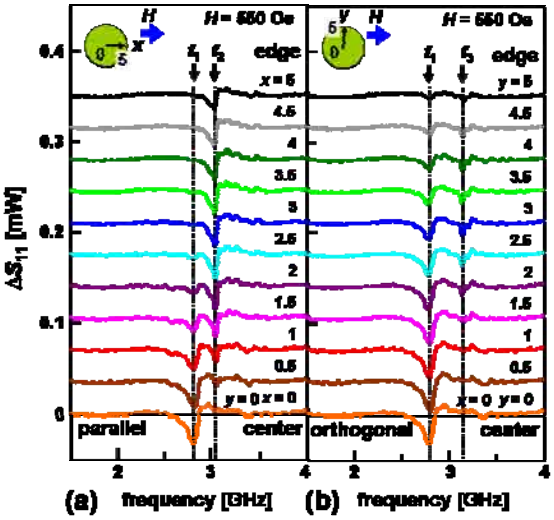


図 3, RF プローブを用いたガーネット(YIG)試料からの強磁性共鳴(FMR)の空間分解検出, 静磁場に対して(a)平行, (b)垂直方向

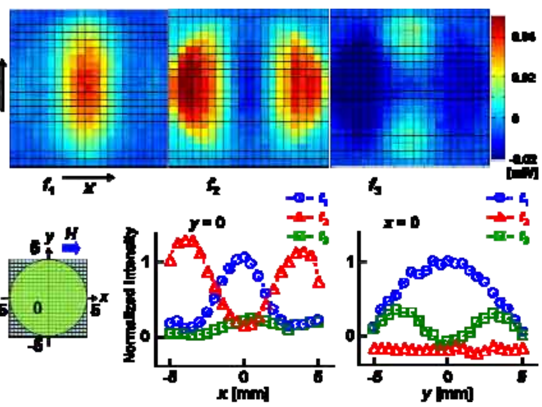


図 4, RF プローブを用いたスピン波の空間マッピング像

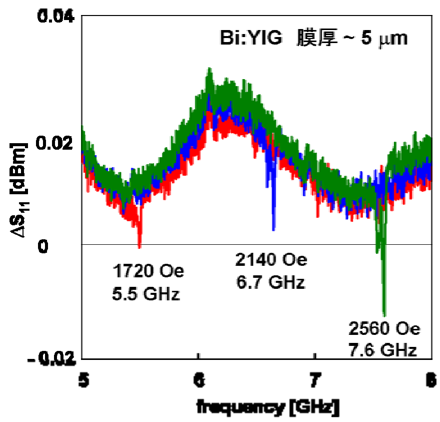


図 5, RF プローブを用いて Bi:YIG 薄膜(膜厚 5μm)より得られた FMR シグナル

重ねて表示。）

4-1.2, 高周波振動子-磁気共鳴プローブを用いた機械的手法による磁気共鳴検出

磁気共鳴信号を検出する機械的な手法として、高周波振動子磁気共鳴プローブの構築に取り組んだ。この手法では、100 MHz－1 GHz 程の帯域の共鳴周波数を有する機械振動子を用意し、振動子端に微小な磁性ワイヤを取り付け磁気プローブとして用いる(図 6)。磁気プローブを試料に近接させ励振することにより、探針直下の局所な試料位置に高周波磁場を生成して印加し、磁気共鳴の励起・検出を実現する。この際、共振周波数に相当する静磁場を掃印して印加する（例えば、1GHz の振動子では 29 [kA/m] (360 [Oe])）。

磁気共鳴信号の検出は、振動子のエネルギー散逸信号の変化により検出する。高周波振動子は、それ自身共振器を形成するため、共振器の Q 値に比例した磁気共鳴信号の高感度化が期待できる。

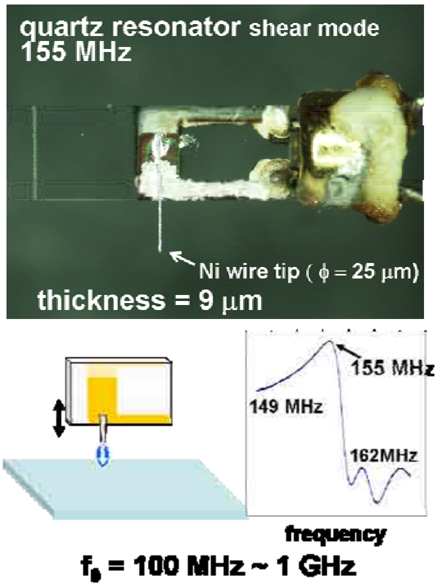


図 6, 高周波振動子磁気共鳴プローブを用いた磁気共鳴検出手法の取り組み、高周波振動子(155MHz)に取り付けられたニッケルワイヤ探針及び機械励振信号

図 6 中には、共振周波数 155 MHz の厚みすべり振動モード水晶振動子（厚み 9 μm）に、直径 25 μm のニッケル磁性ワイヤを取り付けた高周波振動子磁気プローブ及びその振動シグナルを示す。

研究期間内に、機械的手法を用いた磁気共鳴信号検出には至らなかったが、厚みすべりモードの極薄水晶振動子用いて、100 MHz (厚み 15 μm) – 1 GHz (厚み 1.5 μm)の共振周波数を有する高周波振動子磁気プローブの作成法を確立した。

4-2, 広域走査－走査磁気共鳴顕微鏡の構築

磁気共鳴信号検出の高分解能化を進める上で、先ず、マイクロメートルスケールの試料からの磁気共鳴信号検出を目指した。そのために、RF プローブを用いた広域走査が可能な走査磁気共鳴顕微鏡の構築に取り組んだ（図 7）。

試料には、マイクロメートルサイズのパーマロイ円板を用いた(直径 2 μm, 東京大学物性研究所、大谷研究室提供）。走査プローブ顕微鏡(SPM)を用いて、マイクロメートルスケールサイズの試料表面を走査するためには、試料位置探索のための粗動機構、広域走査に対応した走査機構が必要であり、ピエゾモーター（粗動

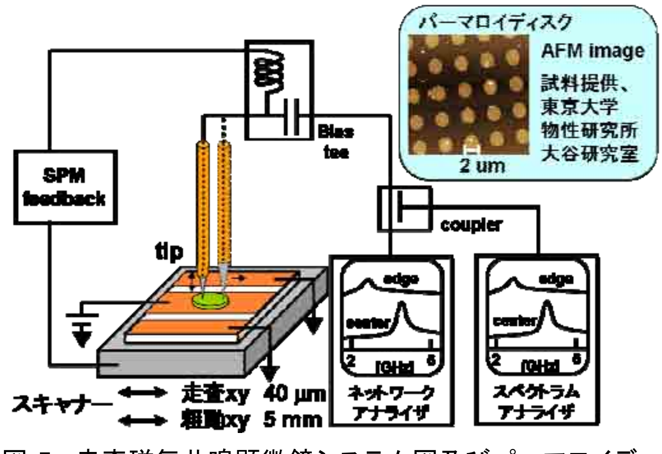


図 7, 走査磁気共鳴顕微鏡システム図及びパーマロイディスクの AFM 像

範囲 5 mm)、及び、広域走査が可能なピエゾスキャナー(走査範囲 40 μm)を用いた。RF プローブの電気線路は Bias Tee により、DC 電流検出線路と高周波電流検出線路に分けられ、DC 電流側では、トンネル電流等を検出して探針ー試料表面間の距離制御(SPM feedback)を、高周波電流側ではベクトルネットワークアナライザ、スペクトラムアナライザを用いて磁気共鳴信号を観測することができる。

直径 2 μm のパーマロイ円板の試料からは、ミリメートルサイズの試料と比較して磁気共鳴に寄与するスピン数が桁違いに少なくなることから磁気共鳴信号強度が検出感度以下になり、本研究期間中には FMR 検出は達成できなかった。しかしながら、今後、高感度化を達成した際に高精細に試料表面を走査する機構を構築した。

5. 自己評価

本研究では、ナノスケールの分解能を有する磁気共鳴検出プローブの開発を目指した。研究期間内に、RF プローブが磁気共鳴検出の空間分解能を有することをサブミリメートルの分解能で実証したが、目標のナノメートルスケールの分解能を示すには至らなかった。一方で、高周波機械振動子の作成法の確立、広域走査可能なプローブ顕微鏡システムの構築を実現し、今後の、磁気共鳴検出の高感度化・高分解能化に向けた要素技術を確立することができた。

6. 研究総括の見解

電子スピン共鳴吸収法に原子分解能を有する原子間力顕微鏡の手法を応用し、探針直下の試料表面近傍の局所領域のみに高周波磁場を印加し、探針から直接スピン信号を検出することでスピン検出の空間分解能をナノスケールにまで飛躍的に高めることを狙った。局所領域でのスピン共鳴検出には電気的手法と機械的手法の 2 法の開発を並行して進めている。それぞれの主たる成果は次の2点である。

1.高周波プローブを用いた電気的手法の開発において、ガーネット円板の磁気共鳴の検出に成功すると共に、その2次元分布の計測にも成功し本法が試料内のスピン波モード解析に応用可能なことを実証した。

2.高周波振動子—磁気共鳴プローブを用いた機械的手法の開発において、100Mz～1GHz の磁気共鳴信号検出に対応可能な高周波振動子プローブの作成法を確立した。

電気的手法による方法では、試料の境界条件によるスピン波のモードは検出したがナノスケールのスピン共鳴検出には至っていない。また、機械的手法では共鳴信号の検出には至っていない。しかし、双方のプローブの高感度化研究や広域走査磁気共鳴顕微鏡の製作など目標実現に必須となる要素技術を着実に構築していることは高く評価できる。

これらの研究成果は 3 篇の原著論文にまとめられており、学会招待講演でも発表されている。

ナノスケール分解能を有するスピン共鳴原子間力顕微鏡は、磁性体や有機分子の構造分析や、スピンエレクトロニクス素子への適用などの科学技術に対する波及効果は極めて大きい。更に着実に研究を進めて本法の完成度を高め、インパクトのある測定例が提示されることを期待したい。

7. 研究成果リスト

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

（1）論文（原著論文）発表

論文（国際）

- T. An, N. Ohnishi, T. Eguchi, Y. Hasegawa, P. Kabos, ″Local excitation of ferromagnetic resonance and its spatially-resolved detection by using an open-ended radio frequency probe″, *IEEE Mag. Lett.* **2010** , in press.
- T. An, T. Nishio, T. Eguchi, M. Ono, A. Nomura, K. Akiyama, Y. Hasegawa, ″Atomically resolved imaging by low-temperature frequency-modulation atomic force microscopy using a quartz length-extension resonator″, *Rev. of Sci. Inst.* **2008**, 79, 033703.

（2）学会発表

口頭発表（国際）

- T. An, T. Eguchi, Y. Hasegawa, ″Scanning magnetic resonance microscopy: Spatially resolved imaging of ferromagnetic resonance on a yttrium iron garnet disk″, 2009 American Physical Society March Meeting. (2009)

口頭発表（国内）

- 安東秀、江口豊明、長谷川幸雄、″高周波プローブによる強磁性共鳴の空間分布測定″、2009 年春季応用物理学関係連合講演会 (2009)
- 安東秀、江口豊明、長谷川幸雄、″走査プローブ顕微鏡による強磁性共鳴の空間分布測定″、第 69 回応用物理学会学術講演会 (2008)

ポスター発表（国際）

- T. An, T. Eguchi, Y. Hasegawa, ″Spatially resolved measurements of ferromagnetic resonance by scanning probe microscopy″, 5th International Symposium on Surface Science and Nanotechnology (ISSS-5) (2008).

（3）招待講演

招待講演（国内）

- 安東秀、″高周波プローブを用いた空間分解磁気共鳴検出″、財団法人新世代研究所、プレ研究会「単一スピンを捉える SPM」 (2008)

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

（1）著書

- 安東秀、江口豊明、長谷川幸雄、″長辺振動水晶振動子を用いた周波数変調原子間力顕微鏡による原子分解能観察″、精密工学会誌, Vol.74, No.7, 687-690, 2008
- 安東秀、野村淳士、西尾隆宏、江口豊明、秋山琴音、長谷川幸雄、″長辺振動水晶振動子の周波数変調原子間力顕微鏡への応用＝原子分解能　カセンサ＝″、超音波テクノ, Vol.21,

No.4, 60-64, 2009

（2）学会発表

口頭発表（国際）

- T. An, A. Nomura, T. Nishio, T. Eguchi, K. Akiyama, Y. Hasegawa, ″Direct detection of force gradient using atomic force microscopy with very small oscillation amplitude″, 2008 American Physical Society March Meeting (2008)

研究課題別評価書

1．研究課題名
オミクス解析用超微小エレクトロスプレー法の開発

2．氏名
石濱　泰

3．研究のねらい
　ヒト、マウスをはじめとする様々な生物種のゲノムシークエンスプロジェクトが終了し、本格的なポストゲノム時代が始まった。トランスクリプトミクスが DNA マイクロアレイや次世代シーケンサとともに実用化された一方、プロテオミクスについては解析技術の飛躍的な進歩があるにもかかわらず、現在までに全プロテオーム一斉解析法は実用化されていない。現在、最も有力な分析手段は質量分析計を用いる方法である。通常、タンパク質混合物は質量分析計に導入する前に、感度や溶解性を向上させる為にトリプシンなどの消化酵素を用いてペプチドに断片化し、液体クロマトグラフィーで分離しながらタンデム質量分析計でペプチドのアミノ酸配列情報を読み取る。このショットガンプロテオミクス法の問題点は試料の複雑さと試料成分間の濃度差の広さであり、これを解決することがプロテオーム解析法の網羅性拡大につながる。さきがけ研究では、ショットガンプロテオミクス法を3パート（試料前処理、分離、質量分析）に分け、技術開発を行うこととした。試料前処理では、全プロテオーム中で重要度が高いが解析が困難な2つのサブプロテオーム（リン酸化修飾プロテオームおよび膜プロテオーム）にフォーカスした試料前処理法を検討した。分離パートでは、従来から用いられてきた多次元分離法ではなく、質量分析計にオンラインで接続した逆相クロマトグラフィーそのものの性能向上を目指した。質量分析パートでは、逆相クロマトグラフィーとのインターフェースにもなっているエレクトロスプレーイオン化法を極微小化することによる感度向上を検討した。これらのパートを統合し、ショットガン法を用いたプロテオーム解析システムの網羅性向上を目指した。

4．研究成果
　ショットガンプロテオミクス法では、細胞・組織などの試料から抽出されたタンパク質混合物はトリプシンなどの消化酵素を用いて断片化される。トリプシン消化ペプチドは通常は強イオン交換クロマトグラフィーや等電点電気泳動法などを用いて分画され、それぞれの画分はタンデム質量分析計とオンラインで接続したナノ液体クロマトグラフィー（nanoLC）を介して、質量分析に供される。ショットガンプロテオミクス法の高性能化を目指し、本法を 3 パート（試料の前処理法、オンライン分離法　およびエレクトロスプレーインターフェース）に分け、以下の検討を行った。

(4-1）網羅的解析に向けた試料前処理法の開発

【リン酸化修飾ペプチドの高選択的濃縮法の開発】

タンパク質の翻訳後修飾は遺伝子解析では決して得られない情報であり、細胞の様々な機能をコントロールする必要不可欠な役割を果たしている。したがって、プロテオーム解析の標的として翻訳後修飾情報を積極的に解析していくことは、細胞機能を理解する上できわめて重要である。様々な翻訳後修飾の中で、最も一般的な修飾の一つにタンパク質リン酸化があり、哺乳類では全タンパク質の 20–30%がリン酸化修飾を受けると言われている。この可逆的リン酸化反応は細胞内シグナル伝達をはじめとして多くの重要な細胞機能の制御に関わることが知られている。通常、細胞全抽出物由来のペプチド混合物中のリン酸化ペプチド存在量は 1ppm 以下であり、リン酸化修飾タンパク質のプロテオーム解析（リン酸化プロテオーム解析）を行うにはリン酸化ペプチドに選択的な濃縮法が必須である。まず、古くからリン酸基に対して親和性を有することが知られているチタニアやジルコニアなどの酸化金属を担体として用いた酸化金属クロマトグラフィーを検討したが、親和性はわずかだが大量に存在する非リン酸化ペプチド(主として酸性ペプチド)により、リン酸化ペプチドをほとんど検出することができなかった。そこで、酸化金属に対する親和性がリン酸基より弱く、カルボン酸よりも強いヒドロキシ酸で酸化金属を修飾することにより、細胞抽出物の消化ペプチド混合物からリン酸化ペプチドを選択的に濃縮する方法を確立し、HAMMOC 法 (Hydroxy Acid-Modified Metal Oxide Chromatography)と名づけた（図 1）。

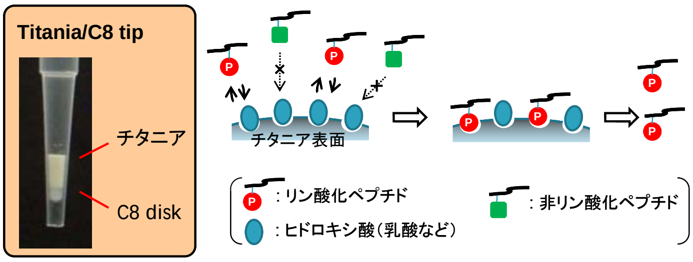


図 1　HAMMOC 法の原理

HAMMOC 法により 100μg 程度の細胞抽出タンパク質試料から、数千個のリン酸化サイトを同定することが可能となった。ヒト由来培養細胞株に対し大規模解析を行った結果、タンパク質公共データベース UniProt に登録されているヒトタンパク質 20,328 種のうち 61%がリン酸化修飾をうけていることを実験的に証明した（図 2）。

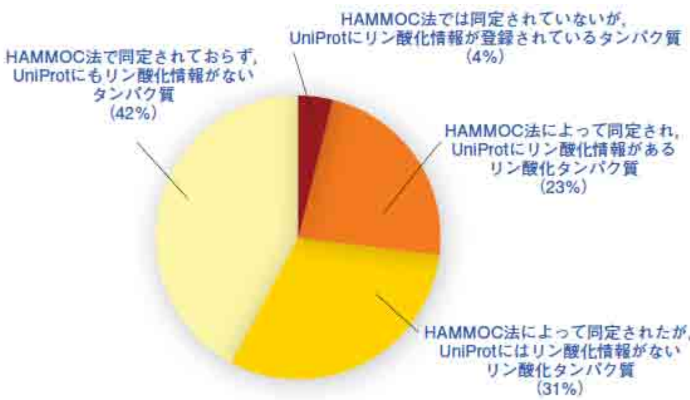


図 2　ヒトタンパク質におけるリン酸化修飾

ここで全体の 31%に相当する 6,315 タンパク質については、今回 HAMMOC 法によって初めてリン酸化修飾を受けることがわかったものである。このことは HAMMOC 法が従来法と比較し、いかに優れているかを表している。HAMMOC 法を植物プロテオーム解析に応用し、世界で初めて植物リン酸化プロテオームの全体像を明らかにした。その結果、シロイヌナズナおよびイネにおいて、存在しないと言われていたチロシンリン酸化が哺乳動物と同じ程度存在することを明らかにした。HAMMOC 法は現在キット化され、全世界で販売されている。また、さきがけ成果に基づく応用研究として、抗がん剤等として使用されているキナーゼ阻害薬の薬効メカニズム評価法に HAMMOC 法を用いる研究を開始している（JST 育成研究）。

【膜タンパク質の抽出・消化法の開発】

細胞膜には様々な種類のタンパク質が局在し、細胞認識や分子輸送，細胞外シグナルの伝播など生命活動を維持するための重要な機能を担っている。しかし，膜プロテオーム解析において，膜タンパク質を可溶性タンパク質と同程度に抽出および同定することは困難であった。これは、膜タンパク質は一般的に発現量が少なく、難溶性であるためで、加えた可溶化剤がトリプシンなどの消化酵素の活性を阻害したり、可溶化剤が LC-MS/MS システムの安定性や感度を妨害したりするからである。そこで、トリプシン活性を阻害せず可溶化剤を効率よく除去できる方法を検討し、陰イオン性界面活性剤であるデオキシコール酸ナトリウム(SDC)等の胆汁酸を可溶化剤として用いる方法を確立した。これは、動物の消化管中でのトリプシンによる食物の消化をミミックしたものであるためトリプシンとの相性もよく、1%濃度でトリプシン活性を約 5 倍上昇させ、SDS とほぼ同等の膜タンパク質可溶化能を示した。消化後の SDC 除去は、有機溶媒相を加えた試料溶液を酸性条件にすることで SDC のみを有機相に移動させることにより達成した。SDC のような二相間を移動する界面活性剤（Phase Transfer Surfactant)を用いるため、本法を相間移動溶解法（PTS 法）と名づけた。SDC を用いた PTS 法を従来法と比較すると、約 14 倍同定効率の向上が認められた。

(4-2)オンライン LC 分離の高性能化

ショットガンプロテオミクスの問題点である試料の複雑さと試料成分間の濃度差の広さを軽減するため、オンライン LC 分離の性能向上を検討した。従来の粒子充填型カラムを用いた緩勾配グラジエントによる分離スペースの拡大には限界があり、より分離効率の高いカラムが必要であった。そこで高理論段数が期待できるメートル長をもつモノリス型シリカカラムを検討することとした。PTS プロトコールを用いて調製した大腸菌細胞抽出試料 4μg を 3.5m 長カラムに注入し、グラジエント時間を 40 時間に設定し測定したところ、発現プロテオームの約 8 割に当たる 1,991 タンパク質を一度に同定することができた。さらに測定を繰り返したところ、計 360 時間でマイクロアレイデータの 1.15 倍にあたる 2,929 タンパク質(31,563 ペプチド)が同定された。このうち 953 種は膜タンパク質で、マイクロアレイ測定で検出された膜タンパク質をコードしている mRNA は 919 種であったので、発現している膜タンパク質もほぼ 100%本システムによって同定されていると考えられる。

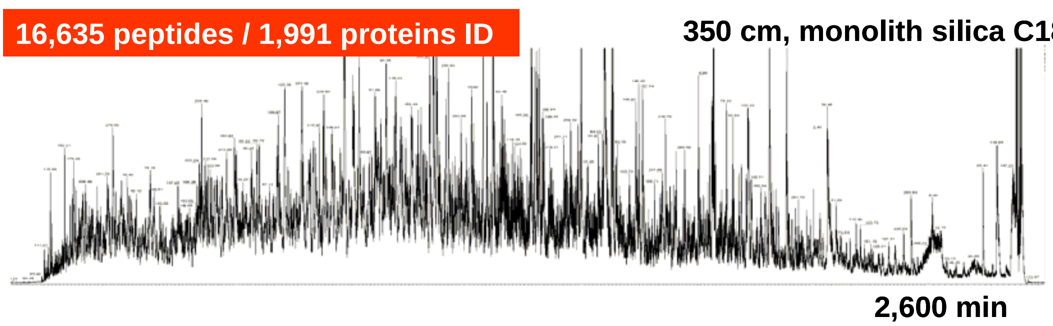


図 3 モノリスカラムを用いた大腸菌抽出試料の TIC クロマトグラム

(4-3)エレクトロスプレーイオン化法の高感度化

スプレーニードル先端を従来の 6μm から 2μm まで微小化し、オリフィスとの距離を近づけ、ス

プレー電圧と流速を最適化することにより、MS シグナルの向上が認められた。さらなる高感度化をはかるため、オリフィス入口を加工し、V 字型の広口タイプのオリフィスキャピラリーを作製した。スプレーヤーの先端をオリフィス内に設置したところ、200-500nL/min の流速下で最大の感度上昇を確認した（図 4）。本条件は 75-100μm 径カラムに適用可能であり、汎用型 nanoLC とのカップリングで様々な LC-MS システムの構築が可能である。

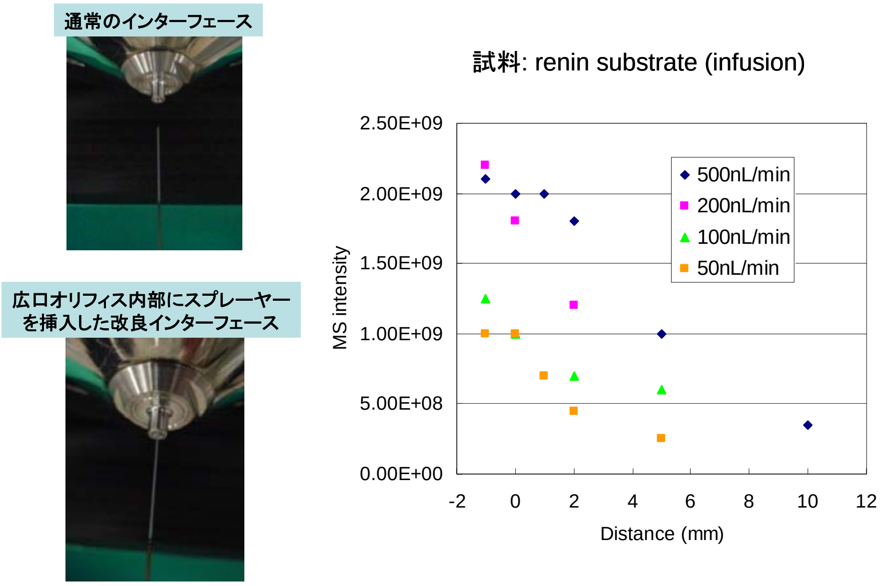


図4　広口オリフィスを用いた高感度エレクトロスプレーインターフェース

【謝辞】 本研究を進めるにあたり、メートル長モノリスキャピラリーカラムを作製、供給していただいた京都工芸繊維大学　田中信男教授、修士 1 年三輪昌平氏に感謝いたします。

5. 自己評価

当初の目標は（1）エレクトロスプレー微小化・オンライン LC の最適化による高感度化（2）網羅的解析に向けた前処理法の開発(膜タンパク＆リン酸化タンパク)の２つを行い、（3）網羅的プロテオーム解析へ応用すること、であった。（2）の前処理法の開発に関して、リン酸化修飾についてはHAMMOC 法、膜タンパク質については PTS 法という独自の方法の開発に成功し、世界レベルの性能を実現できた。したがって、自己評価は満点である。（1）について、エレクトロスプレーの微小化やインターフェースの工夫により高感度化が実現可能であることを示すことができたが、実際のショットガンプロテオーム解析においては試料中の成分濃度差の広さに起因する MS 測定時のイオン化抑制が最も重要な因子であることがわかったため、研究期間後半は高分離能分析法の開発に注力した。試料成分のイオン化抑制と複雑性を軽減するために最も一般的に用いられている多次元分離法ではなく、メートル長モノリスカラムを用いた一次元 LC-MS システムで緩勾配グラジエント溶出を行うことにより高分離とイオン化抑制軽減を実現することに成功した。本法により大腸菌については、プロテオーム一斉解析の目処がたった。ただしヒトをはじめとする哺乳動物のプロテオーム一斉解析を達成するには更なる工夫が必要であり、（1）（3）については 90 点の達成

率とした。

6. 研究総括の見解

オミクス解析のための試料前処理法の開発、微小エレクトロスプレー法の開発による LC-MS の高感度化、開発技術の網羅的プロテオーム解析への応用を目指した。主たる成果は次の 3 点である。

1.チタニア等の金属酸化物を吸着剤とするリン酸化ペプチドの前処理法にヒドロキシ酸を添加することにリン化ペプチドに対する親和性を飛躍的に高めることに成功しHAMMOC 法と命名した。これにより世界中で知られていたヒトタンパク質におけるリン酸化修飾部位の2倍以上を同定することに成功した。また、膜タンパク質の選択的抽出法としてデオキシコール酸を可溶化剤として用いる相間移動溶解法を開発し、従来法よりも約 14 倍同定率の向上に成功した。

2.シリカモノリス逆相ミクロカラム 3.5 m 長に緩勾配グラジエント溶離法を適用し、大腸菌抽出試料中の 1991 タンパク質を一度の分析で同定した。これは発現プロテオームの約 8 割に相当し、今後のプロテオーム解析法に一つの方向性を示した。

3.エレクトロスプレー法のニードル径、オリフィス形状の最適化、電圧、流速などの最適条件の把握を行いMS検出の高感度化に成功した。

また、他の研究機関や企業との共同研究を推進し、その結果として得られたタンパク質リン酸化に関する興味深いいくつかの知見、前処理用キットの商品化などの実績も高く評価される。

これらの成果は 22 篇の原著論文にまとめられ、20 件の招待講演で発表された。また平成 19 年に第 39 回内藤記念科学奨励金、平成 20 年に Analytical Sciences 誌 Hot Article Award、平成 21 年に日本質量分析学会会誌賞を受賞している。

試料前処理、高性能分離、高感度MS検出まで幅広く検討し豊富なノウハウを蓄積しつつ力強い研究を推し進め、実用的な全プロテオームの解析手法の基礎を着実に築いたといえる。今後は、プロテオミクスのみならず広くオミクス研究分野への応用を視野に入れた解析法の展開を期待したい。

7. 研究成果リスト

A. **さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの**

（1）論文（原著論文）発表

論文（国際）

- T. Masuda, N. Saito, M. Tomita, Y. Ishihama, ″Unbiased quantitation of Escherichia coli membrane proteome using phase transfer surfactants″, *Mol Cell Proteomics* 2009, 8, 2770-7.
- N. Sugiyama, H. Nakagami, K. Mochida, A. Daudi, M. Tomita, K. Shirasu, Y. Ishihama, ″Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in Arabidopsis″, *Mol. Syst. Biol.* 2008, 4, 193.
- Y. Kyono, N. Sugiyama, K. Imami, M. Tomita, Y. Ishihama, ″Successive and selective release of phosphorylated peptides captured by hydroxy acid-modified metal oxide chromatography″, *J*

Proteome Res 2008, 7, 4585–93.

- N. Sugiyama, T. Masuda, K. Shinoda, A. Nakamura, M. Tomita, Y. Ishihama, "Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid–modified metal oxide chromatography for nano–LC–MS/MS in proteomics applications", *Mol. Cell. Proteomics* 2007, 6, 1103–9.

（2）特許出願

研究期間累積件数：5件

発　明　者：石濱泰、増田　豪
発明の名称：タンパク質試料の調製方法
出　願　人：学校法人慶應義塾
出　願　日：2007 年 10 月 2 日
出 願 番 号：特願2007－259176

発　明　者：石濱泰、京野完
発明の名称：リン酸化ペプチド又はリン酸化タンパク質の分離方法
出　願　人：学校法人慶應義塾、ジーエルサイエンス株式会社
出　願　日：2008 年 4 月 20 日
出 願 番 号：特願2008－102268

発　明　者：石濱泰、モントン　マリアロウェナニコデマス
発明の名称：吸着防止方法、吸着防止材、内壁コートキャピラリ、その製造方法、及び、リン酸化合物とアニオンの同時分析方法
出　願　人：学校法人慶應義塾、日油株式会社
出　願　日：2008 年 5 月 22 日
出 願 番 号：特願2008－134494

発　明　者：石濱泰、増田　豪
発明の名称：タンパク質試料の調製方法
出　願　人：学校法人慶應義塾
出　願　日：2008 年 9 月 30 日
出 願 番 号：PCT/JP2008／068124

発　明　者：石濱泰、モントン　マリアロウェナニコデマス
発明の名称：吸着防止方法、吸着防止材、内壁コートキャピラリ、その製造方法、及び、リン酸化合物とアニオンの同時分析方法
出　願　人：学校法人慶應義塾
出　願　日：2009 年 5 月 22 日

出 願 番 号 :PCT/JP2009/059436

（3）受賞

- 2007 年 10 月　 第 39 回（2007 年度）内藤記念科学奨励金(研究助成)、「マラリアのシグナル伝達プロテオーム解析」
- 2008 年 1 月 Analytical Sciences 2008, 24, Hot Article Award 、”Automated Phosphoproteome Analysis for Cultured Cancer Cells by Two-dimensional NanoLC-MS Uing a Calcined Titania/C18 Biphasic Column”
- 2009 年 3 月　 2009 年度日本質量分析学会会誌賞「プロテオミクス解析用ナノ液体クロマトグラフィー質量分析システム」

（4）著書

- 増田豪、石濱泰, ″ショットガンプロテオミクスによる膜タンパク質の網羅的解析のための試料調製法″ J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. 2009, 57, 145-151.
- 杉山直幸, 石濱泰, ″リン酸化プロテオーム解析による分子標的薬評価″, 実験医学「プロテオミクスが解き明かす情報伝達ネットワーク」, 服部成介, 石濱泰 編, 羊土社, 東京, 2009, Vol. 27, pp. 2552-57.
- 京野完, 杉山直幸, 石濱泰, ″翻訳後修飾プロテオミクスの最前線″, 細胞工学別冊「明日を拓く新次元プロテオミクス」, 中山敬一, 松本雅記 編, 学研メディカル秀潤社, 東京, 2009, pp. 41-50.
- 石濱泰, ″プロテオミクスにおけるナノ LC-MS システム″ Chromatography 2008, 29, 25-31.
- 石濱泰, ″プロテオミクス解析用ナノ液体クロマトグラフィー質量分析システム″ J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. 2007, 55, 157-164.

（5）学会発表

口頭発表（国際）

- Y. Ishihama, T. Masuda, M. Iwasaki, M. Tomita, ″Unbiased Quantitation of Membrane Proteome Using Phase-Transfer Surfactants.″ HUPO 8th Annual World Congress　(2009).
- N. Sugiyama, Y. Kyono, K. Imami, S. Ohnuma, M. Tsukahara, M. Tomita, Y. Ishihama, ″Evaluation of Kinase Inhibitors by Phosphoproteomics-based Phosphorylation Profiling.″ HUPO 8th Annual World Congress (2009).
- Y. Kyono, N. Sugiyama, K. Imami, M. Tomita, Y. Ishihama, ″Optimization of Elution Conditions for Phosphopeptides Captured by Aliphatic Hydroxy Acid-Modified Metal Oxide Chromatography (HAMMOC).″ HUPO 7th Annual World Congress (2008).
- K. Imami, N. Sugiyama, Y. Kyono, M. Tomita, Y. Ishihama, ″Phosphoproteome analysis using a calcined TiO2/C18 biphasic column and a novel stable isotope labeling method.″ The 33rd International Symposium on High performance Liquid Phase Separations and Related

Techniques (HPLC 2008 Kyoto) (2008).

口頭発表（国内）

・岩崎未央, 三輪昌平, 冨田勝, 田中信男, 石濱泰, "プロテオーム一斉解析のためのショットガンプロテオミクス測定システムの構築." 第29回キャピラリー電気泳動シンポジウム (2009).

（6）招待講演

招待講演（国際）

- Y. Ishihama, "Exploring Signaling Proteome by High Performance Phosphoproteomics." 2009 TPS International Proteomics Conference and 5th AOHUPO MPI Workshop (2009).
- Y. Ishihama, "Hydroxy Acid-Modified Metal Oxide Chromatography for Uncovering and Exploiting Phosphoproteome." 2008 Taiwan-Japan Proteomics Symposium 'Frontier in Protein PTMomics' (2008).
- Y. Ishihama, "Signaling Proteome of Breast Cancer by High-Accuracy Mass Spectrometry." Organization for Oncology and Translational Research 4th Annual Conference (2007).

招待講演（国内）

- 石濱泰, "Development of proteomics technologies to open the new phases of biological applications." 第 32 回日本分子生物学会年会 (2009).
- 石濱泰, "リン酸化プロテオミクスの高性能化とシグナル伝達研究への応用." 第 82 回日本生化学会大会(2009).

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

（1）論文（原著論文）発表

論文（国際）

- T. Umezawa, N. Sugiyama, M. Mizoguchi, S. Hayashi, F. Myouga, K. Yamaguchi-Shinozaki, Y. Ishihama, T. Hirayama, K. Shinozaki, "Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis", *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106, 17588-93.

研究課題別評価書

1. 研究課題名
高速超伝導転移端マイクロカロリメータの開発

2. 氏名
大野　雅史

3. 研究のねらい
　超伝導体を用いた放射線検出器は既存半導体検出器の分光性能を大きく超える優れた X 線リアルタイムスペクトロメータであり、特に放射光応用あるいは X 線天体観測等の先端科学領域において絶大な威力を発揮するものと期待されている。とりわけ超伝導体の急峻な転移領域を利用した温度計（TES：Transition Edge Sensor）と電熱フィードバック（ETF：Electro Thermal Feedback）を組み合わせた ETF-TES マイクロカロリメータはシリコン半導体検出器より 2 桁以上優れたエネルギー分解能を実現しうる。しかしながら、現状では TES は有感面積（ピクセル数）、応答速度に制約があり、実用レベルにはまだ達していない。このうち TES の応答速度が十分でない一つの理由としては、電圧バイアスにより動作させた TES がバイアス点の安定化と X 線検出の両方の機能を担い、X 線検出のための最適な動作条件を満たさないという点にある。本研究ではエネルギー分解能を劣化させずに、速い応答速度と高い放射線吸収効率を実現する TES マイクロカロリメータの実現を目指し、TES の機能の一部を自己温度安定機能を有する吸収体にもたせた独自の TES ピクセル素子構造を提案、実証を進める。さらにこの TES ピクセルをアレイ化し、各ピクセルを電気的に並列にバイアスする独創的な TES アレイ駆動方式と周波数分割型 SQUID マルチプレクサ信号増幅システムを適用して信号読み出しを行う大面積 TES ピクセルアレイイメージングを実現することを目標とする。

4. 研究成果
[自己温度安定機能を有する放射線吸収部と温度センサ部を分離した新TES構造]
　極低温に冷却し比熱を極小化した物質に放射線を吸収させ、生じる比較的大きな温度上昇を、超伝導−常伝導転移領域における急峻な温度抵抗変化を用いた高感度な温度センサにより電気信号に変換して放射線のエネルギーを測定するのが TES マイクロカロリメータの検出原理である。急峻な温度抵抗変化を示す超伝導転移領域中においてセンサを安定に動作させるためには、TES を定電圧バイアス下で駆動させ、この時生じる強い電熱フィードバックを利用する。TES に一定の電圧を印加すると TES の転移領域中の抵抗によりジュール加熱が生じ、これとセンサから外部へ逃げる熱量とが等しくなる点で熱的な平衡状態が生じる。このような系に放射線が入射されると TES の温度が上昇し抵抗値は転移曲線に沿って上昇するが、定電圧バイアスされているためにセンサを流れる電流が減少する。すると TES 内のジュール発熱量も減少し、系が冷却される

方向に負の熱的なフィードバックが生じる。したがって元のバイアス点への帰還が促進され、バイアス点の安定化と応答時定数の高速化が図られることとなる。光子入射による TES の電流減少は微小変化であるために一般的に超伝導量子磁束干渉素子(SQUID)を用いて低インピーダンスな電流増幅を行うことにより読み出され、これより入射した光子 1 個ずつのエネルギーが極めて高精度に検出されることとなる。本研究実施者等はこれまでにイリジウム/金近接 2 重層超伝導薄膜を用いた TES において 5.9keV の X 線に対して 6.9eV のエネルギー分解能を達成している。しかしながら、これまで試作した検出素子においては、超伝導薄膜が温度センサと放射線吸収体の役割を兼ねており、その厚さは高々100nm 程度であり 6keV 程度のX線の吸収効率は非常に低いものであった。今後、TES の応用を広げる上で、エネルギー分解能の向上のみならず、検出効率の向上と計数率(応答速度)の改善は必要不可欠である。現在、国内外の TES 開発研究グループにおいて、超伝導薄膜温度センサ上に放射線吸収効率の高い錫やビスマス製の金属膜吸収体を覆いかぶせるような構造(マッシュルーム吸収体構造)を持つ素子の開発が進められているが、このような構造の放射線吸収体においては、フォトン入射位置により信号波形が変化し分光特性が損なわれ、さらに応答時定数も劣化する現象が明らかになってきている。そこで、本研究では、マッシュルーム吸収体構造とは異なり、放射線吸収部と超伝導温度センサを分離し、これらを電気的に直列接続した新規 TES 構造を提案した。図 1 に新規 TES 構造の原理検証を目指した試作検出素子を示す。これはイリジウム/金近接 2 重層からなる 25μm 角の極めて小さな超伝導温度センサ部に 150μm 角程度の金膜製の放射線吸収部を電気的に直列接続したものである。このような構造の場合、放射線吸収体中にも TES バイアス電流が流れてジュール発熱が生じている。吸収体でのフォトン吸収による熱が超伝導薄膜温度センサ部に伝わり TES としての抵抗変化が生じれば、瞬時に吸収体内を流れる電流が減少し、これに伴いジュール発熱量も減少するため熱的フィードバックが発生して冷却が促進される。したがってこれまで超伝導薄膜温度センサに集約されていた自己温度安定機能(バイアス点安定化機能)の一部あるいは大部分を放射線吸収部に担わせることで放射線吸収部自体がアクティブに動作すること、つまり吸収体内部での冷却が促進され高速応答に寄与することとなり、一方、温度センサ部は極度に小型化され、超伝導薄膜内の

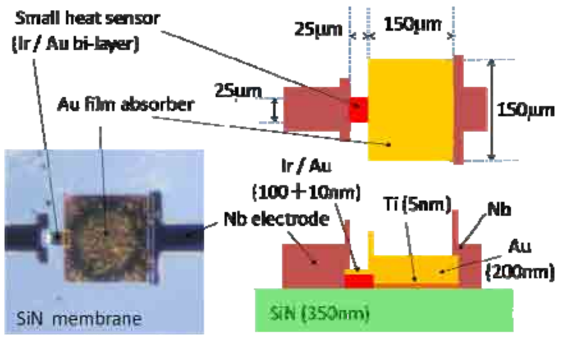


図 1: 放射線吸収部と温度センサを分離、直列接続した新規 TES 構造と試作素子。

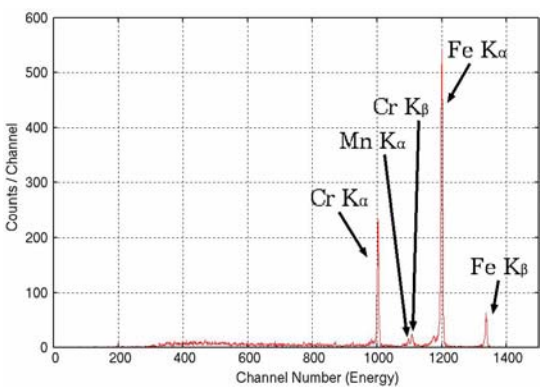


図 2: SPring-8 にて放射線吸収部と温度センサを分離、直列接続した新規 TES 構造の試作素子で検出したステンレスサンプルの蛍光X線スペクトル

温度分布はほぼ完全に除去される(無視できる)ために理想的な電流信号生成機構として機能することから優れたエネルギー分解能が期待できる。SPring-8 BL01B1 において、放射光をステンレスサンプルに照射し、発生した蛍光X線を本試作素子を用いて測定した。得られた蛍光X線スペクトルを図 2 に示す。ステンレスに含まれる元素に起因した特性X線のエネルギーピーク Cr Kα (5415eV), Mn Kα (5899eV), Cr Kβ (5947eV), Fe Kα (6404eV), Fe Kβ (7058eV)が分離できている。なお、X 線検出波形の立下り時定数は 200μs 以下、エネルギー分解能は 6.4keV において 29.9eV(FWHM)が得られており、本素子構造において優れた分光特性を有する蛍光X線分析が可能であることを実証した。

[TESピクセルアレイの作製とアレイ素子多チャンネル信号読み出し回路の開発]

TES が高エネルギー分解能を得るには入射エネルギーがフォノンに変換され、それが超伝導体薄膜全域に拡散し充分な温度上昇をもたらすことが重要となり、そのため有感面積が数 100μm 四方以下の非常に狭いものに限られ、1 つのピクセルだけではほとんど実用にはならない。そこで小さなピクセルを多数並べたTESアレイ検出器の開発を進め、さらに個々のピクセルからの信号情報を元にイメージング検出器として発展させる試みとして、本研究実施者はこれまでに超伝導 Ir ピクセル 10 個からなる 1 次元 TES ピクセルアレイ検出器を試作し、13eV 程度の高エネルギー分解能と全イベントの入射ピクセル位置を特定することに世界で初めて成功している。このイメージング TES は全ピクセルに並列バイアスを適用して各ピクセルからの信号を合わせて 1 つの SQUID アレイを用いた回路で合理的に信号を読み出し、各ピクセルからの出力信号波形を位置に応じて変化させ、SQUID で得られた信号波形からその位置を求めようという独創的な発想に基づいたものである。本研究では TES の有感面積拡大を図るため前項にて動作実証を済ませた常伝導放射線吸収領域/超伝導温度センサ部分離型ピクセルのアレイ化を進めた。図 3 に示した試作アレイ素子は、複数(図 3 では 10 個)のピクセルを同時に電気的に並列にバイアスし、それらのピクセルを流れる信号電流を合算して読みだすものであり、金膜の極小超伝導温度センサ部の大きさを意図的に変化させてある。この極小超伝導温度センサの形状、大きさの違いに起因する熱特性の微妙な変化が放射線入射信号波形に反映されることから、詳細な信号波形解析により各々のピクセル入射信号の弁別を可能にする。本研究では、冷凍機極低温ステージ上にこのような並列バイアスピクセルアレイ素子をさらに複数組並べ、周波数分割型 SQUID マルチプレクサの適用をすることで、これらアレイ素子を同時に駆動させ信号読み出しを行い、大規模 TES ピクセルイメージングの実現を目指している。周波数分割型 SQUID マルチプレクサは TES ピクセルと LC フィルタを組み合わせ、各 TES ピクセルを異なる周波数で AC バイアスし、各ピクセルからの電流を合算して一つの SQUID にて信号増幅を行った上で駆動周波数毎に信号を分離して各ピクセルでの入射応答を検出する方式であり、UC Berkeley (UCB)の Adrian Lee 等はこの方式にて赤外天文観測用 TES ボロメータアレイにおいて動作実績を有し世界最先端の技術を有している。このマルチプレクサをX線単一光子検出用 TES に適用するためには、X線入射応答信号が数百 μ 秒以下の時定数をもつ指数減衰波形となり非常に速い

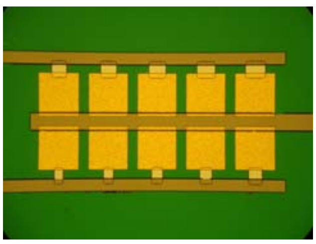


図 3: 作成した常伝導放射線吸収部/極小超伝導温度センサ部分離型 10 ピクセル並列バイアスアレイ素子

ため、分割する個々の周波数バンド幅が 1MHz 程度必要となり、例えば 12 ピクセル同時に読みだす場合は 1×12=12MHz 程度の帯域にて読み出し回路が安定に動作することが必須となる。本研究実施者は UCB にて Adrian Lee 等の協力を得て SQUID マルチプレクサ読み出し回路を試作し回路のループゲイン周波数特性を精査した（図 4 参照）。その結果、熱流入を抑制しつつ SQUID と室温増幅回路間の配線長を最小限にし、浮遊インダクタンスの小さい LC フィルタを選択し使用することで回路の周波数帯域を大幅に拡大できることが明らかになった。TES ピクセルアレイを並列バイアスにより駆動する信号読み出し原理と周波数分割型 SQUID マルチプレクサ動作原理は全く異なるため、これら 2 つの方式を組み合わせることで大規模 TES アレイイメージングが実現可能になると考えられる。

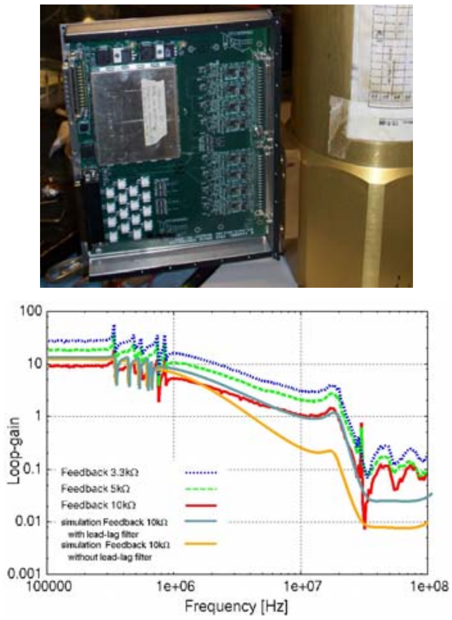


図 4:バークレーにて試験した 8ch 周波数分割型 SQUID マルチプレクサコントローラ制御ボードと SQUID マルチプレクサ回路ループゲインの周波数特性

5. 自己評価

超伝導転移端センサの高性能化を目指した検出素子開発研究では、近年諸外国において、超伝導薄膜上に常伝導金属製パターンを形成することで、常伝導金属直下のセンサ領域の超伝導転移温度を低下させ、つまり意図的に常伝導状態を保たせ、センサを流れる電流経路を制限することにより、高エネルギー分解能化を狙うこと、そしてこの常伝導金属パターン上にマッシュルーム状放射線吸収体を搭載することで、超伝導薄膜領域内の感度ムラがエネルギー分解能劣化に響かないようにする手法が主流になりつつある。本さきがけ研究では、検出性能スペックとしてエネルギー分解能を劣化させずに、高速応答かつ高放射線吸収効率を目指してきたが、その根底にある開発意図の原点は、上述のような電流経路を制限すること、つまり折角、温度感度（信号生成能力）を持つ超伝導体の一部分をわざわざ殺してまで、低ノイズ化を図ろうとする他研究グループの手法に疑問を抱き、これまで集約しすぎていた超伝導薄膜センサ内部の役割をシンプルに整理することで、超伝導センサの能力をフルに引き出せる手法を編み出そうということにあり、それゆえ、独自の放射線吸収領域と超伝導温度センサ領域部に分離し電熱的に直列接続した新規超伝導転移端センサ素子構造を着想するに至った。本研究期間内において、エネルギー分解能では、まだ従来の構造を持つ検出素子を超えるには至っていないが、新規素子構造の原理検証、動作実証には成功しており、放射線吸収領域内に信号電流を流し、自己温度制御機構を機能させるという本研究の最大の意図は達成できたと考えている。現在、本素子構造を持つ作製素子のエネルギー分解能劣化の主たる要因は、図 1 の素子写真において放射線吸収領域金薄膜上に現れている模様が示すことからも、作製薄膜の不均一性および微細パターン形成等における素子作成プロセスの不完全性によるところが大きいと考えられる。しかしながら、このような作製プロセス上の諸問題は日々、試行錯誤を経て着実に解決してきており、たとえば図 3 のアレイ素子写

真に示すとおり、最近（研究終了直前）の作製素子は目視による観察でも明らかに改善が認められるほどである。今後、さらなる微細パターン形成の歩留まり率向上が進めば、製膜の均質性のみならず、放射線吸収領域と超伝導温度センサの熱結合状態を改良するような熱特性改善が見込まれ、本研究で提唱した新規素子構造が検出素子全体を効率良く機能させられる分、エネルギー分解能、検出効率、応答速度全てにおいて既存の手法より秀でたスペックを達成できるものと期待している。

また、本研究期間後半においては、大規模超伝導転移端センサアレイの信号読み出し実現のために、並列バイアスを適用して動作させるアレイ素子の開発と並行して、本研究開始当初は想定していなかった周波数分割型 SQUID マルチプレクサの開発を、UC Berkeley と共同にて進めることができ、ようやく、X線分析の実用レベルとなりうる有感面積、ピクセル数を達成する見通しが立てられるようになった。現在、周波数分割型 SQUID マルチプレクサにおいて世界最先端のレベルを誇る UC Berkeley の技術を習得し、本格的にこの技術を世界ではじめてX線検出用大規模アレイ読み出しに応用することを前提に開発研究を実施できた意義は大きいと考える。

６. 研究総括の見解

超伝導薄膜の転移領域の大きな抵抗変化を利用して、ユニークかつ有用なカロリメータの実現を狙うものである。従来に比べて格段に大きなピクセル数を持つとともに、シリコン半導体検出器より 2 桁以上優れたエネルギー分解能の実現を目指すチャレンジングな研究である。

主たる成果は次の２点である。

1. 独創的な放射線吸収部と超伝導温度センサとを分離した分離型ピクセルを開発し、蛍光 X 線分析において 6.4keV におけるエネルギー分解能 29.9eV、X 線検出波形の立下り時定数 200μs の分光特性を実現した。
2. アレイ化した分離型ピクセルの多チャンネル信号の読み出し回路を検討し、並列バイアス方式と周波数分割型 SQUID マルチプレクサ方式を組み合わせた方式により、各ピクセルの信号波形の同時処理が可能である見通しを得た。

TES マイクロカロリメータの開発と並行して、読み出し技術の習得等を行い、両者の特徴を生かしつつ最適化を図り、実用性の高い大規模 TES アレイイメージング実現へ開発を推進した努力を高く評価する。

これらの成果は 8 篇の原著論文にまとめられ、2件の招待講演で発表された。

TESアレイについては詰めるべき点が残っており今後のデータの積み上げに期待したい。集積化に関しては、どこまでの集積度が達成されたらどのようなメリットがあるのか、そのための技術課題が何であるかの一段の詰めが必要である。世界をリードするマイクロカロリメータの実現を期待したい。

７. 研究成果リスト

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

（1）論文（原著論文）発表

論文(国際)

- M. Ohno , H. Sato, K. Mishima , T. Ikeda, H. M. Shimizu, "Low Energy Particle Detector Using a Superconducting Transition Edge Sensor"、 *IEEE Trans. App. Supercond.* **2007**, 17, 2, 328-331.
- M. Ohno, F. Mori, Y. Minamikawa, R. M. Thushara Damayanthi, H. Takahashi, H. Sato, H. Toyokawa, "Development of High Count Rate TES Microcalorimeters", *J. Low Temp. Phys.* **2008**, 151:229-233.
- M. Ohno, H. Takahashi, R. M. Thushara Damayanthi, Y. Minamikawa, K. Nishimura, H. Toyokawa, "Development of a new TES structure using a radiation absorber self-adjusting the operating temperature", *IEEE Trans. App. Supercond.* **2009**, 19, 3, 473-476.

(2)著書

- 大野 雅史、低温検出器 -TES(Transition Edge Sensor)- 、電気学会高機能放射線発生利用技術専門委員会技術報告書(2009)

(3)学会発表

口頭発表(国内)

- 大野 雅史、高橋 浩之、全 伸幸、R.M.T.Damayanthia、南川 泰裕、森 文彬 、低温検出器 -TES(Transition Edge Sensor)- 、平成 19 年電気学会全国大会、シンポジウム「原子力・核融合における電気計装および放射線発生技術の動向」(2007)
- 大野 雅史, 森 文彬, 西村 堅太郎, 南川 泰裕, Thushara Damayanthi, 高橋 浩之、自己温度安定性を有する放射線吸収体を用いた超伝導転移端マイクロカロリメータ、2008 年春季第 55 回応用物理学関係連合講演会(2008)

ポスター発表(国際)

- M. Ohno, H. Takahashi, R.M.T. Damayanthi, Y. Minamikawa, K. Nishimura, H. Sato, H. Toyokawa、Development of a new TES structure using a radiation absorber self-adjusting the operating temperature、2008 Applied Superconductivity Conference (2008)
- Masashi Ohno, Martin Lueker, Kam Arnold, Matt Dobbs, Elizabeth George, William Holzapfel, Naoko Iyomoto, Adrian Lee, Helmuth Spieler, Hiroyuki Takahashi, Benjamin Westbrook, Paul Richards, Readout circuit using the Frequency-Domain SQUID Multiplexing technique for X-ray TES microcalorimeters, 13th international workshop on Low Temperature Detectors (LTD-13)(2009)

(4)招待講演

招待講演(国際)

- Masashi Ohno, Hiroyuki Takahashi, Nobuyuki Zen, Yasuhiro Minamikawa, Fumiakira Moria, R.M.T.Damayanthi 、Ir-TES Development at The University of Tokyo 、2nd CREST

Nano-Virtual-Labs Joint Workshop on Superconductivity (NVLS2006)(2006)

招待講演(国内)

- 大野雅史、高橋浩之、「X線イメージングを目指した超伝導検出器の開発」2010 年春季 第 57 回応用物理学関係連合講演会シンポジウム「放射線分科会企画-X線イメージングの最前線」(2010)

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

- F. Mori, Y. Minamikawa, R. M. Thushara Damayanthi, S. Leman, N. Zen, M. Ohno ,H. Takahashi, H. Toyokawa, H. Tanida, T. Uruga, "Synchrotron Beam Test of a Position-Sensitive Small-Pixel Ir-TES Array", *J. Low Temp. Phys.* **2008**, 151:150-154.
- Y. Minamikawa, H. Sato, F. Mori, R. M. Thushara Damayanthi, M. Ohno, H. Takahashi, "Simulation of Transient Response of Ir-TES for Position-Sensitive TES with Waveform Domain Multiplexing", *J. Low Temp. Phys.* **2008**, 151:229-233.

(2)学会発表

口頭発表(国際)

- Y. Minamikawa, K. Nishimura, R.M.T. Damayanthi, M. Ohno, H. Takahashi, The University of Tokyo、Simulation of Transient Response and TES Noise Parameters、2008 Applied Superconductivity Conference (2008)

研究課題別評価書

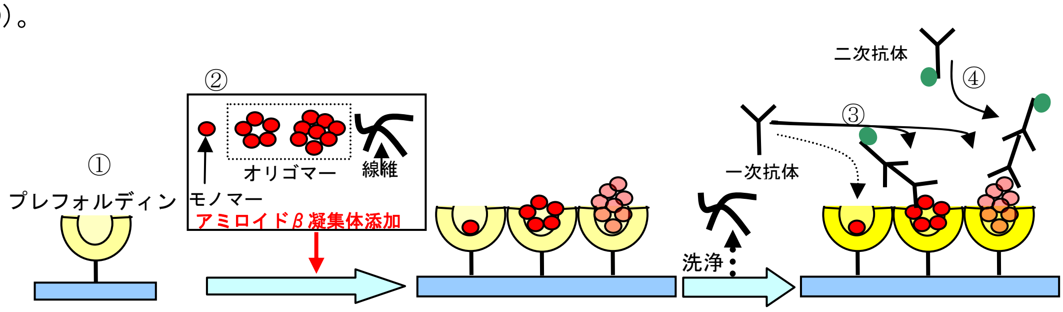
1. 研究課題名
毒性型アミロイドオリゴマーの高感度検出

2. 氏名
迫野　昌文

3. 研究のねらい
　アミロイドβやプリオンなどに代表されるタンパク質の自己組織化により引き起こされるタンパク質コンフォメーション病は、現在大きな社会問題として取り上げられている。アルツハイマー病の原因物質とされるアミロイドβは、自己組織化に伴い、線維状の形態をとることで細胞毒性を示すものと考えられてきた。しかし、近年、線維体よりもその構造中間体である可溶性オリゴマーがもっとも高い細胞毒性を示すことが明らかとなり、また、生体内でも可溶性オリゴマーが組織壊死を引き起こしていることも示されている。一方、アルツハイマー病の診断は、早期治療の面において非常に重要であるが、困難を極めているのが実情である。
　これまでに考案されたアミロイドβ検出法は、比較的毒性の低い線維形態を検出する方法が大勢を占めており、アミロイドβ凝集体の形状による識別、特に可溶性オリゴマーのみを特異的に検出する方法の開発はいまだ十分ではない。近年、より診断性を高めるために、可溶性オリゴマーに特異的認識能を有する抗体の作製が盛んに行われている。抗体の高い標的認識能を利用することにより、可溶性オリゴマーに対する効率的な検出を可能にしている例がいくつか報告されている。しかし、抗体によるアミロイドβ検出は、抗体の認識標的である特定重合量のオリゴマーにしかその効力を示さない。特に、アルツハイマー病患者に含まれる可溶性オリゴマーは、2量体から数十量体と言われており、全てを同時に認識する抗体の作製は極めて難しいといえる。
細胞毒性と真に相関性の高いアミロイドβ検出のためには、不溶性の線維状凝集体を認識せず、また、幅広い重合度の可溶性オリゴマーのみを認識する必要がある。よって、診断性を高めるには、サンプル中に含まれる全ての可溶性オリゴマーを柔軟に認識するシステムの開発、及びその検出感度の向上が重要であるといえる。

4. 研究成果
　1. 分子シャペロンプレフォルディンの可溶性オリゴマー認識能を利用した手法
<u>測定原理</u>
　超高熱性古細菌由来のプレフォルディンは 2 つのαサブユニットと 4 つのβサブユニットからなる 6 量体であり、お椀状の構造をしている。お椀の内部は疎水性アミノ酸が占めており、直径約 10nm の疎水空孔を形成している。アミロイドβは疎水性が高いことから、プレフォルディンとよく相互作用する性質を有しており、また、プレフォルディンの疎水空孔は非常に大きいため、サイズの

大きな可溶性オリゴマーに対しても十分に認識しうるだけの空間を保持している。これまでにも、他の分子シャペロンを用いたアミロイドβ線維化抑制の報告はされているが、それらはアミロイドβモノマーのみを捕捉するものであり、可溶性オリゴマーを認識していない。プレフォルディンのように、可溶性オリゴマーまで捕捉する分子シャペロンは報告されておらず、極めて稀な性質の分子シャペロンである。測定の流れを以下に示す。プレフォルディンを ELISA プレートに固定化し、その後プレート表面をブロッキングする(①)。アミロイドβ凝集体とプレフォルディンを相互作用させる(②)。Anti-Aβとプレフォルディンに捕捉されたアミロイドβを相互作用させる(③)。HRP で標識した二次抗体を添加し、洗浄操作の後、基質を添加しプレートリーダを用いて発光測定を行う(④)。



結果

プレフォルディン固定用プレートとしてNunc社のImmobilizerAminoを用いた。所定濃度で炭酸バッファーに溶解したプレフォルディンをウェルに添加し24時間のインキュベートを行い、固定化されたプレフォルディン量を、プレフォルディン抗体を用いて測定した。その結果、固定化されるプレフォルディン量は添加時の濃度依存的に上昇し、300nM 以上の濃度で固定化量が平衡に達した。次に、アミロイドサンプルをプレフォルディン固定化プレートのウェルに添加し、37 度で 1 時間反応を行った。アミロイドサンプルは、アミロイドβモノマー、可溶性オリゴマー、線維をそれぞれ調製し用いた。次に、アミロイドβ抗体である 6E10 抗体を添加し、その後 HRP コンジュゲート二次抗体を添加し、化学発光によりアミロイドβ量を計測した。5μM のアミロイドサンプルを添加した際において、モノマー及びオリゴマー状態において顕著なシグナルが見られたが、線維状態は、シグナルが見られなかった。このことから、プレフォルディン固定化プレートには線維状アミロイドがほとんどつかず、オリゴマー及びモノマー状態のみが選択的に補足されたことが示唆された。しかし、モノマーとプレフォルディンの相互作用は本来あまり大きくないことが以前の実験から示されていたことより、モノマーはプレフォルディンを介さずにプレート上に非特異的に吸着していることが推察された。そこで、日油より市販の MPC ポリマーを用いてプレートのブロッキングを行うこととした。プレフォルディンを固定化したプレートに MPC ポリマー(BL-206)を添加して、各アミロイドサンプルを添加し同様の実験を行った。そ

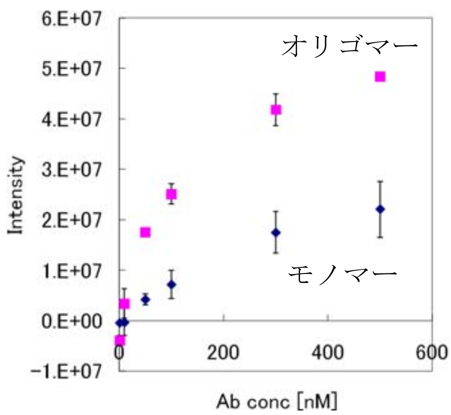


図 1.プレフォルディン固定化プレートによるアミロイドの検出

の結果、プレフォルディン非固定化プレートにおいてアミロイドサンプルの非特異的吸着の効果的な抑制が見られた。そこで、10nM プレフォルディンをプレートに固定化しBL-206でブロッキングを行い、このプレフォルディン固定化プレートを用いてアミロイドサンプルの検出を行った。その結果、モノマーとオリゴマーで明らかな吸着特性の違いが見られた（図1）。これより、プレフォルディン固定化プレートはアミロイドオリゴマー特異検出に有効であることが示された。

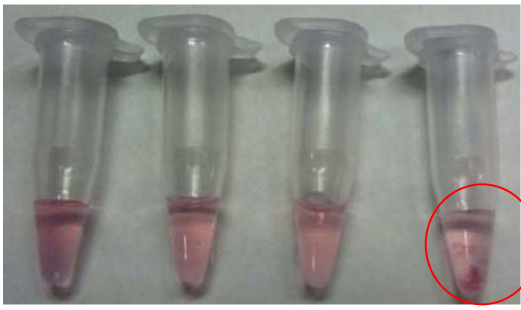
2. アミロイドβ抗体担持金コロイドによるアミロイド凝集体の検出

<u>測定原理</u>

アミロイドモノマーで免疫して得られたモノマー特異抗体は、可溶性オリゴマーや線維などの状態に関わらず結合することが多い。モノマー抗体である 6E10 や 4G8 などのクローンは、オリゴマーや線維の染色にも多く用いられている。そこで、この状態に左右されない幅広い特異性を利用して以下のような検出システムを考案した。金コロイド上にモノマー抗体を担持したものを調製する。オリゴマーや線維などの凝集状態にあるアミロイドと混合すると、コロイドはアミロイド上に集約され、また架橋点となり大きな複合体を形成すると考えられる。この際、複合体は沈殿もしくはコロイドのプラズモンシフトが観測されると考えられることから、簡便に凝集状態を見極めることができる。一方、モノマーはコロイドと結合しても、架橋点とならないことからコロイドは分散状態を保ち続けるため、上記のような変化を示さない。よって、凝集状態のものだけをスクリーニングすることが可能となる。

<u>結果</u>

20nm 直径の金コロイドに 6E10 を溶解した 10 倍希釈濃度の PBS 緩衝液を添加し、一定時間インキュベートした。その結果、抗体は金コロイドに非特異的に吸着し、抗体担持金コロイドを作製できた。しかし、このコロイドは、PBS 緩衝液中において極めて不安定で凝集しやすいことがわかった。また、抗体濃度を上げていくにつれてコロイド凝集は抑制されるものの、複合コロイドのチューブへの吸着のため回収率が著しく低下した。そこで、抗体担持ステップにおいて BSA を添加し、ブロッキング効果が得られるか実験をした。その結果、BSA を添加することで抗体担持金コロイドは緩衝液中においても非常に安定な状態を保つことができるようになった。この複合金コロイドの洗浄ステップの後、アミロイドサンプルを添加し、1時間室温でインキュベートした後のコロイドの状態を調べた。その結果、5μM のアミロイドサンプルにおいて、線維状態にあるものは沈殿体を形成することがわかった。（図 2）よって、線維状態にあるものはこの金コロイドで簡便に検出できることが示された。しかし、可溶性オリゴマーにおいてはスペクトルの変化、凝集形成などは見受けられなかった。そこで、動的光散乱を用いて 10nM の可溶性オリゴマー添加サンプルの大きさを計測したところ、金コロイドよりもオリゴマーの大きさだけ大きい複合体が形成されていることがわ



PBS　　monomer　oligomer　　Fibril

図2.複合コロイドと各種アミロイドの相互作用

かった。これは、金コロイドがオリゴマーと認識するものの、コロイドの立体障害により複数のコロイドの集約が抑制されているものと示唆された。よって、コロイドの大きさについて今後検討していく必要がある。

5. 自己評価

可溶性オリゴマーは、その構造に分布があり一様ではないことから、ターゲットとすべき測定対象が不明瞭であることが研究当初からの課題であった。特に、ある特定サイズのオリゴマーに毒性があるのか、オリゴマーの毒性メカニズムは分子量によらず同じであるのか等、重要な点が現在も回答が出ておらず、その状況下でのオリゴマー測定法の開発は極めて挑戦的であった。当初の提案であった、分子シャペロンとオリゴマーの相互作用を利用した測定法は、検出感度は低いもののアミロイドの取る他の構造とオリゴマーを明確に分けて、オリゴマーを検出できるものであることは示せた。しかし、様々な方法を試そうとした結果、散漫な結論しか得られなかったことは大いに反省すべきと考えており、今後の研究の進め方において教訓にしていきたいと考えている。

6. 研究総括の見解

アルツハイマー病の原因物質であるアミロイドβ(Aβ)オリゴマーは分子量分布が広く、オリゴマー全部を一度に定量するのは困難であるが、分子シャペロンプレフォルディン(PDF)が Aβオリゴマー認識に有効であろうという独創性の高い発想に基づき、これを選択的に分析する手法の開発を目指した。主たる成果は次の 2 点である。

1. Aβモノマー、繊維、可溶性オリゴマーの中から、可溶性オリゴマーと特異的に吸着する PDF 固定化プレートの開発に成功したが、生体中の可溶性 Aβオリゴマーを定量するには結合が弱く、感度が不足している。

2. PFD が金コロイドの凝集抑制効果を持つことを発見したが、PDF と金コロイドとの相互作用が強く、可溶性オリゴマーの検出には適していなかった。

前者のプレフォルディンを用いる方法は実用的な感度が得られていないが、分子シャペロンを分子量の大きな物質の識別法として応用可能であることを実証したことは高く評価される。後者の凝集現象を用いる方法も、アイデア段階ではあるが、実用性の高いスクリーニング法に繋がることが期待される。

これらの研究成果は2篇の原著論文にまとめられて発表された。

今後、プレフォルディンとオリゴマーの相互作用についてデータをさらに積み上げつつ、高感度化などの実用課題を解決していくことが必要と考えられる。Aβ)オリゴマーと PDF との特異的相互作用をアフィニティー電気泳動の形でマイクロチップに応用することも可能と考えられる。原理的に抗体を凌ぐ汎用性が期待できるため、計測分析の基盤技術として波及効果は大きい。引き続き更なる研究と工夫とを続けて欲しい。

7. 研究成果リスト

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

（1）論文（原著論文）発表

論文（国際）

- M. Sakono, T. Zako, H. Ueda, M. Yohda, M. Maeda, "Formation of highly toxic soluble amyloid beta oligomers by the molecular chaperone prefoldin", *FEBS journal* **2008**, 275, 5982-5993.

（2）特許出願

研究期間累積件数：1 件

発　明　者：迫野昌文、座古保、前田瑞夫

発明の名称：アミロイド凝集体の検出試薬及び検出方法

出　願　人：独立行政法人　科学技術振興機構

出　願　日：平成 21 年 12 月 10 日

出 願 番 号：特願 2009-28652

（3）著書

- Masafumi Sakono, Tamotsu Zako, "Amyloid oligomers: Formation and toxicity of Aβ oligomers" FEBS Journal, in press

（4）学会発表

口頭発表（国内）

- 迫野昌文、微粒子を捕まえるタンパク質とその工業利用に関する展望、化学工学に関する沖縄ワークショップ（2008）
- 迫野昌文・座古保・上田宏・養王田正文・前田瑞夫、高毒性アミロイドオリゴマーの検出に向けた分子シャペロンの利用、第 56 回　高分子討論会（2007）

ポスター発表（国際）

- Masafumi Sakono, Tamotsu Zako, Hiroshi Ueda, Masafumi Yohda, Mizuo maeda、Inhibition of amyloid beta fibrillation and formation of soluble amyloid oligomers by molecular chaperone、IPA 2007 Osaka silver congress (第 26 回日本認知症学会)（2007）

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

（1）論文（原著論文）発表

論文（国際）

- T. Zako, M. Sakono, N. Hashimoto, M. Ihara, M. Maeda, "Bovine insulin filaments induced by reducing disulfide bonds show a different morphology, secondary structure and cell toxicity from intact insulin amyloid fibrils", *Biophysical Journal* **2009**,96, 3331-3340.

（2）学会発表

口頭発表（国際）

- Masafumi Sakono, Arata Utsumi, Tamotsu Zako, Chika Sugino, Masafumi Yohda, and Mizuo Maeda, Formation of non-toxic amyloid-like fibrils in the presence of small heat shock protein, APBiochEC'09 (2009)

ポスター発表(国際)

- Masafumi Sakono, Tamotsu Zako, Masafumi Yohda, Mizuo Maeda, Size-selective interaction between gold nanoparticles and molecular chaperone, The 238^{th} ACS National Meeting (2009)

研究課題別評価書

1. 研究課題名

マイクロバイオブロッティング分析システムの開発

2. 氏名

佐藤　記一

3. 研究のねらい

サザンブロッティング分析（以下、サザン分析）は DNA を、ノーザンブロッティング分析（ノーザン分析）は RNA を電気泳動分離後、膜に転写したのち特定の配列を有したプローブ DNA と相補的結合（ハイブリダイゼーション）をさせて、目的とするDNA やRNA が存在していることを証明する実験法である。同様に、ウェスタンブロッティング分析（以下、ウェスタン分析）はタンパク質を SDS 電気泳動によりサイズ分離した後、抗体と特異的結合をさせて、目的とするタンパク質の存在確認を行う分析法である。これら三つの手法はいずれも電気泳動によって多数の物質が混在する試料をサイズ分離した後、特異的結合によって目的成分のみを検出するものであり、共通の技術を基にしている。基礎医学、分子生物学や生化学など生命科学に関して、遺伝子レベルやタンパク質レベルでの解析や遺伝子組み換えなどを利用している研究では、目的とする遺伝子やタンパク質が存在している（もしくはいない）ことの証明として、必ずこれらの分析法が利用されている。そのため、当該研究分野において最も重要かつ利用頻度の高い必須の分析手法といえる。

しかしながらこれらの分析法には共通する問題点が存在する。最も大きい問題は、分析にかかる時間が長いということである。電気泳動分離に 1～数時間程度、そのあとのブロッティング・ハイブリダイゼーションに一晩かけるのが一般的であり、それ以外の操作も加味すると最低 24 時間程度は必要となる。また、これらは熟練を要する煩雑な手作業で行われており、これが研究の効率を低下させている。そこで本研究では、分析時間の大幅な短縮と煩雑な手作業を減らすことをめざし、ブロッティング分析に必要な分離、結合、検出のすべてのプロセスを一枚のチップ上で行えるマイクロシステムの開発を試みた。マイクロチップシステムはサンプル量や試薬量の削減だけでなく、様々なプロセスの高効率化と時間の短縮、一枚のチップ上に複数のプロセスが集積化可能といった特徴があり、これら性質をうまく活用すれば従来法に比べて飛躍的に優れた分析法が開発できると考えられる。

4. 研究成果

<u>連続型サザン分析法の開発</u>

サザン分析を実現するためには、DNA 断片を電気泳動分離し、目的の配列を有する断片のみをプローブ DNA と結合させる必要がある。そこで、電気泳動流路の下流に結合領域をつなげたチップを作製し、電気泳動された試料が分離された順にプローブに接触する方法を考案した。図 1 に

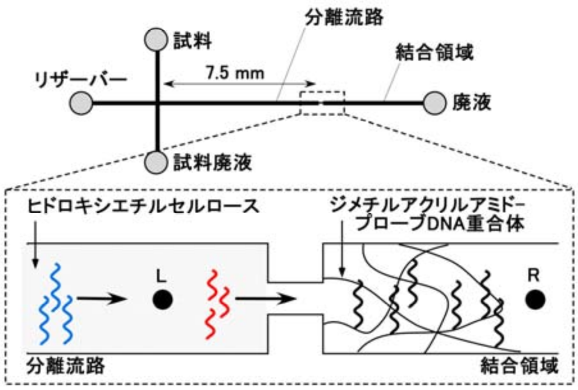


図1 連続型マイクロサザン分析法の原理
分離流路で分離されたDNA断片が結合領域にはいるとすぐにプローブと結合し、下流へ泳動されなくなる。従って検出点LとRで得られたエレクトロフェログラムの差から標的DNAを知ることができる。

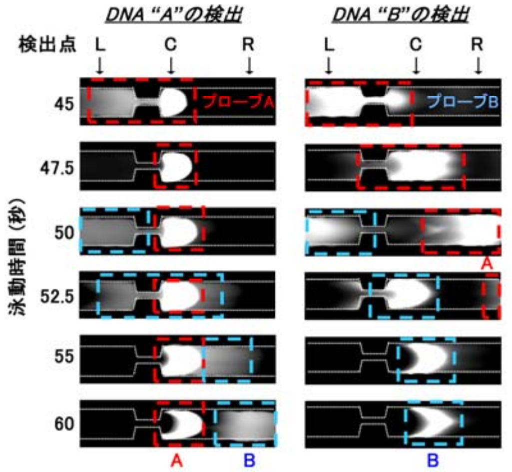


図2 連続型マイクロサザン分析法による分析結果
A,B二種類のDNA断片を分析した結果。左はAに右はBに対するプローブが固定化されており、標的のDNAだけが結合する。

示すような流路を持つチップをシリコーンゴムの一種であるPDMSとスライドグラスを用いて作製し、流路中央のくびれから左側を分離流路、右側を結合領域とした。分離流路は分離ポリマーとしてヒドロキシエチルセルロースの溶液を満たし、結合領域には結合ポリマーとして一本鎖のプローブDNAを固定化したジメチルアクリルアミドの溶液を充填した。ここで、あらかじめ蛍光標識した一本鎖DNA断片試料を電気泳動分離すると、分離流路内でDNA断片はその大きさに応じて分離され、小さい断片から順にくびれ部に到達する。多くの断片は結合領域に入ってもそのまま下流へと泳動されるが、プローブDNAと相補的結合する配列を有したDNAのみが結合領域の先端部でプローブDNAと結合してそこにとどまる。従って、くびれ部の左右で取得したエレクトロフェログラムを比較することにより、標的DNAを同定することができ、その泳動時間からDNAの大きさを知ることができる。

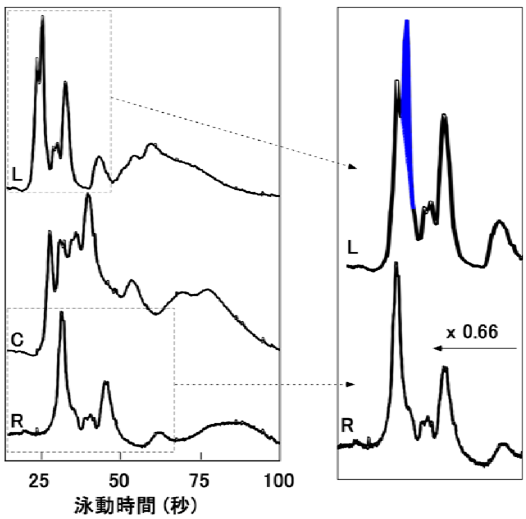


図3 ファージDNA断片の分析結果
φX174のDNAをHaeIIIで断片化したものを試料として、118mer断片に対するプローブで検出した。
右図に青で示したピークは検出点Lのみで検出されたことから、標的DNAのピークであると同定できる。

実際に72merと118merのDNA断片を泳動して実験したところ、図2に示すとおり、標的DNA断片のみがくびれ部の少し下流、検出点Cでゲルに固定化され、その右側の検出点Rには標的DNAは到達しておらず、想定したとおりの結果を得ることができた。また、バクテリオファージ由来DNAの制限酵素消化物断片を同様に分析したところ、サイズ分離を実現しながら標的DNAのピークを同定することに成功した（図3）。本方法ではわずか2分足らずで分離から、相補的結合、検出まで実現しており、従来法に比べて大幅な分析時間の短縮と操作の簡便化を実現することができた。

二段階サザン分析法の開発

前述の連続法では簡便迅速な分析を実現したが、試料中に夾雑物が多く、標的DNAが非常に少ない場合には2つのエレクトロフェログラムの差を見るという方法ではピークの判別が困難になることが考えられる。そこで、標的 DNA 断片のみを検出可能な方法を考案した。この方法は従来法同様、分離と結合を別々に行う2段階法であり、通常の分離流路の他に結合反応も行う幅広流路を有している（図４）。分離流路と幅広流路の上側には分離ポリマー溶液を、幅広流路の下側には結合ポリマー溶液をそれぞれ満たす。まず試料 DNA 断片は分離領域内でサイズ分離され、次に電場の向きを90度変えることにより、そのバンドパターンを維持したまま、結合領域に運ばれる。多くの断片は結合領域に入ってもそのまま出口へと泳動されるが、プローブ DNA と相補結合する配列を有した DNA のみ、結合領域の上部でプローブ DNA と結合してそこにとどまる。これにより、標的 DNA 断片のみが流路内で検出され、その左右方向の位置からサイズが推定できる。

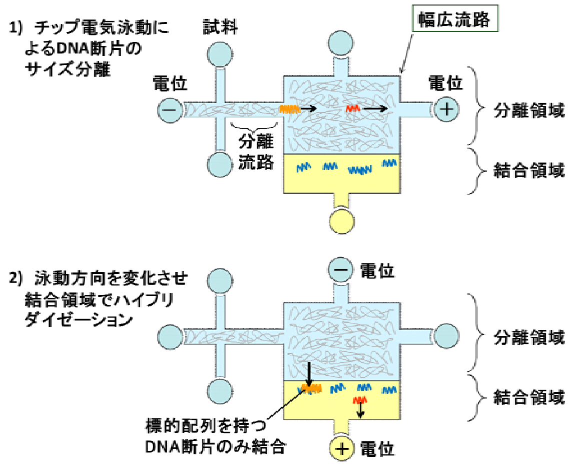


図4　二段階マイクロサザン分析法の原理
水色の部分にはヒドロキシエチルセルロース、黄色の部分にはジメチルアクリルアミド- プローブDNA重合体を満たす。

これを実現するためには、幅広流路内で試料バンドを広げることなく一方方向に泳動することが必要となるため、幅広流路の各辺に多分岐電場制御用流路を作製し、これにより幅広流路内に平行電場を形成することにより良好な分離を実現した。実際にこのチップを用いてバクテリオファージ由来 DNA の制限酵素消化物断片を分析したところ、一段階目の電気泳動分離により、幅広流路内で各バンドの良好な分離を実現した。さらに、下方向に向けて泳動すると、多くのバンドが出口に向かって泳動されていくのに対し、標的DNA断片である118mer断片のみが結合領域の上端付近に固定化され、検出することができた（図5）。本法では分離に2分、結合反応に3分の合計5分で分析することが可能であり、従来法に比べて大幅な時間の短縮と操作の簡便化を実現した。今後、さらなる操作性と再現性の向上、試料としてより大きな DNA 断片の分離を実現することにより、新たなサザン分析法として実用的なものになると期待される。また、本法は試料を RNA に変えることにより、そのままノーザン分析法に応用可能であり、さらに幅広い利用が期待できる。

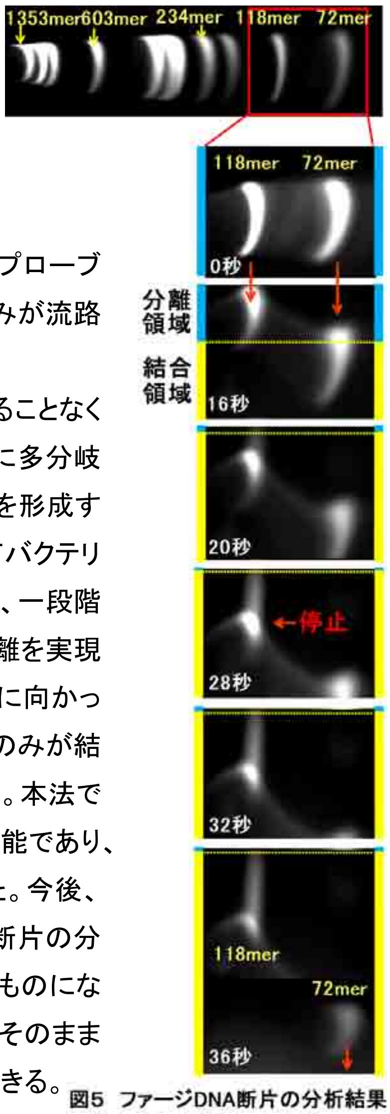


図5　ファージDNA断片の分析結果
試料とプローブは図3と同じ。

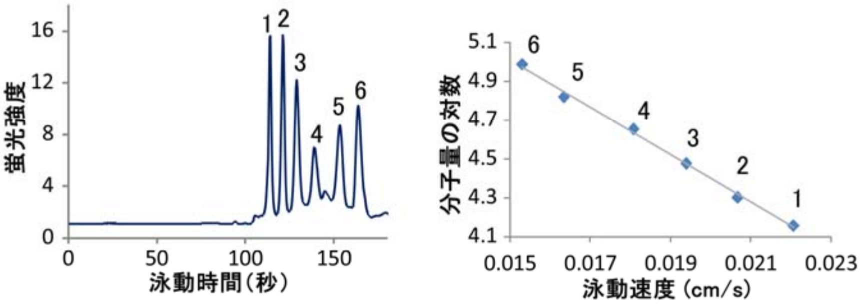


図6 マイクロSDS電気泳動によるタンパク質の分離結果
1: α-lactoalbumin (14.4 kDa), 2: trypsin inhibitor (20.1 kDa), 3: carbonic anhydrase (30.0 kDa), 4: ovalbumin (45.0 kDa), 5 BSA (66.0 kDa), 6 phosphorylase b (97.0 kDa)

ウェスタン分析のためのタンパク質のマイクロチップSDS電気泳動法の開発

前述の分析原理をそのまま用い、プローブ DNA の代わりに抗体を用いればタンパク質のウェスタン分析を実現できると考えられる。しかし、DNA の分離分析とは異なり、SDS で変性したタンパク質をポリマー溶液を用いて PDMS チップでサイズ分離した報告はなく、まず分離法の確立が最初の課題となる。

高分子をポリマー溶液中で電気泳動分離するとき、溶液自体が動くと分離能が損なわれるため、電気浸透流を完全に止める必要がある。また、PDMS 壁面へのタンパク質の吸着を防ぐことも必要である。そこでこれらを解決するために、PDMS 内壁を 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーで修飾した。これによりタンパク質の吸着と、通常の条件での電気浸透流の発生は大幅に低減した。しかしながら、SDS とポリマーの両方を含む泳動液を満たし、電圧を印加すると溶液が流れることを見いだした。これは電気浸透流とは異なる原理による溶液自体の泳動と考えられ、この発生を抑えることはできなかった。

各種条件検討の結果、MPC 修飾した PDMS チップにおいて、SDS 及びポリエチレンオキシドを含む泳動液を用いて SDS 変性タンパク質のサイズ分離を実現した(図6)。最もよく利用される分子量領域において泳動速度と分子量に関して良好な検量線を得ることができた。今後、この下流部に抗体を固定化した抗原抗体反応部を接続することによって、ウェスタン分析システムを実現できるものと期待できる。

5. 自己評価

本研究は核酸およびタンパク質を試料とした分析法を開発するものであり、それぞれ電気泳動分離部と選択的結合部からなる。核酸を標的とした分析では新規の分析法を 2 種類開発することに成功したが、タンパク質については分離部のみが実現し、結合部の開発には至らなかった。従って、全体の進捗状況としては 70%程度と考えられる。

しかしながら開発できたシステムは分離性能と再現性の点において当初期待したほどの性能は有していなかった。これは、本技術の最も基幹となるチップ電気泳動が再現よく制御できていないことによると考えられる。従って、2 つの新規分析手法についての原理検証には実現したものの、実用可能な技術開発という観点で考えると、未だ道半ばの状態であるといえるだろう。

6. 研究総括の見解

生化学研究で広く利用されているサザンブロッティング法、ノーザンブロッティング法、及びウェスタンブロッティング法のそれぞれについてマイクロチップ化による迅速分析法の実現を目的としたチャレンジングな提案である。主たる成果は次の 3 点である。

1.試料を電気泳動分離した後に標的DNAを相補的DNAと結合させ 蛍光イメージングする連続型サザン分析法を考案し、従来法に較べて大幅に操作が簡便で高速なマイクロチップ電気泳動法の開発に成功した。

2. DNA をサイズ分離した後に全成分を分離方向とは直角方向に同時に電気泳動させ標的 DNA のみをハイブリダイゼイションで識別する構成の 2 段階マイクロサザン分析法を考案し、夾雑物の多い実用条件でも高精度な分析が可能なマイクロチップ電気泳動法の開発に成功した。

3.SDS 変性タンパク質の PDMS マイクロチップ電気泳動分離法に取り組み、タンパク質の非特異吸着の防止及び電気浸透流の抑制に成功し、ウェスタンブロッティング分析のマイクロチップ化の実現の可能性を示した。

これらの成果は9件の学会で発表された。

三種のブロッディング分析法をマイクロチップ電気泳動を利用して実現するための基盤技術の開発に取り組み、チップ材料や電気泳動液条件の最適化、多分岐電場制御用流路の作成など創意工夫を重ねて、3種のブロッディング法実現の可能性を示したことは高く評価される。汎用性の高い計測分析技術であり、チップ化が実現すれば分析時間の大幅な短縮、操作の簡便化、超微量分析が可能となり、生命科学研究の促進に大いに貢献することが期待できる。分離度の改善による高精度化、実試料を用いて実証実験を重ね更なる検討を行うとともに、現存のゲル電気泳動よりも使いやすく、高効率手法の開発に結びつくように研究を推進して欲しい。

7. 研究成果リスト

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

（1）学会発表

口頭発表（国内）

- 佐藤 記一・青野 圭祐・加地 範匡・馬場 嘉信・吉村 悦郎、2段階マイクロサザンハイブリダイゼーション法の開発、第 70 回分析化学討論会、2009

ポスター発表（国際）

- Kiichi Sato, Hajime Harada, Yasuyuki Sakamoto and Etsuro Yoshimura、"Development of a Microfluidic Southern Hybridization Analysis System"、The 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2008)、2008
- Kiichi Sato, Keisuke Aono, Noritada Kaji, Yoshinobu Baba and Etsuro Yoshimura、"Rapid two-step Southern hybridization analysis using a microchip"、The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2009)、2009
- Kiichi Sato, Keisuke Aono, and Etsuro Yoshimura、"Microchip-based Two-Step Southern Hybridization Analysis"、Pittcon 2010、2010

- Kiichi Sato, Keisuke Aono, and Etsuro Yoshimura、"Development of a Rapid Two-Step Micro Southern Hybridization Analysis System"、25th International Symposium on Microscale Separations (MSB 2010)、2010

研究課題別評価書

1. 研究課題名

価電子をその場観測する顕微軟 X 線発光分光法の開発

2. 氏名

初井　宇記

3. 研究のねらい

　軟X線発光分光法では、軟X線によって励起することで検出過程に電子を介在しない観測が可能となる。これにより電子分光では不可能もしくは極めて困難な観測対象であるバルクの液体、バルク固体、電場・磁場中の物質系について、価電子を観測することができる。しかし測定技術の面で制限が多かった。本研究者らは本研究開始前までに、軟X線利用のさらなる発展に資する技術として、四方八方に広がる発光 X 線の集光の手段として Wolter 鏡を用いた透過型軟 X 線発光分光器の光学デザインを発表し、その分光デザインを適用した軟 X 線発光分光器を開発していた。この分光器の実現のための要素技術として、Wolter 鏡だけでなく SiN メンブレンと露光技術を利用した透過型回折格子、電荷雲の重心計測による高空間分解能電荷増倍型 CCD 検出器の3つの新規技術の開発を行った。

　本研究では、この透過型軟 X 線分光器とそこで開発した新規 X 線分光・検出技術を発展させ、これまで不可能であった分析を可能にすることを目標とした。特に、機能性物質の機能が発現する源となる価電子を、機能が発現するその場で観測できる技術を実現することを目指した。

4. 研究成果

（1） 軟 X 線発光分光器の顕微機能の実現

　本研究で用いる軟X線発光分光器の光学デザインを図1に示す。この分光器では、Wolter 鏡に

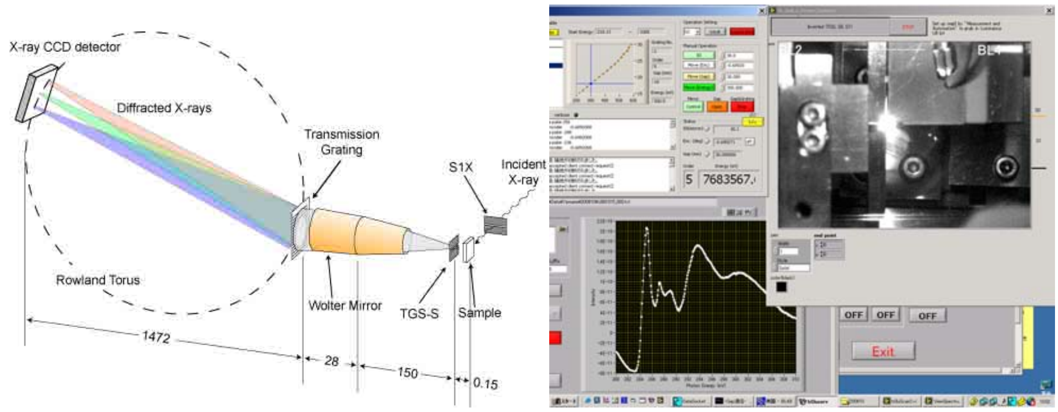


図1. 透過型発光分光器の光学デザイン（左）と改良されたコントロールソフトウェア。

よって発光軟 X 線を、従来法に比べ 20 倍の効率で集めることが可能になっている。本研究では、この分光器に顕微機能を付与することを試みた。この分光器の光学デザインの特徴は、試料上の像を 10 倍に拡大して検出器上に結像する構成となっている点にある。従って、分光器の分散面と垂直方向（図中では水平方向）に関して原理的には顕微機能を持たせることが可能である。しかし実際には、水平（顕微用）と垂直（分光用）両方向で良い結像性能が得られる条件を見出すことは困難であった。そこで本研究によって調整方法の自動化などを行い、容易に最適化を実現できるように分光器の制御方法を改善した。その結果、水平方向 5μm の空間分解能を特段の調整を必要とせず利用できるようになった。垂直方向については、発光分光器の入射スリット TGS-S を固定し、試料を高精度マニピュレーターによってスキャンすることにより、入射スリットの開口程度（通常 5μm 程度）の空間分解能を実現することが可能になった。なお、現在稼働している軟 X 線発光分光器のなかでこのような顕微機能を有しているのは、今回開発した分光器のみである。

（2） 有機材料の軟 X 線発光分光

（2-1） ZnPc 系の励起子

軟X線発光分光の測定時は通常、試料に 10^{12}～10^{14} photons/sを 10μm以下の領域に照射する。軟X線は物質との相互作用が強いため、照射した軟X線は数μmオーダーで吸収され、電子ホール対を大量に生成する。このため、有機材料などを測定すると、入射X線による損傷が問題となる。本研究で用いる分光器では、10^{11} photons/s程度でも十分に測定が可能であるので、有機材料への適用が可能である。そこで最初に、これまで有機材料の軟X線発光スペクトルとして報告されている唯一の例であるフタロシアニン系の測定に取り組んだ。既報告では、低エネルギー励起のピ

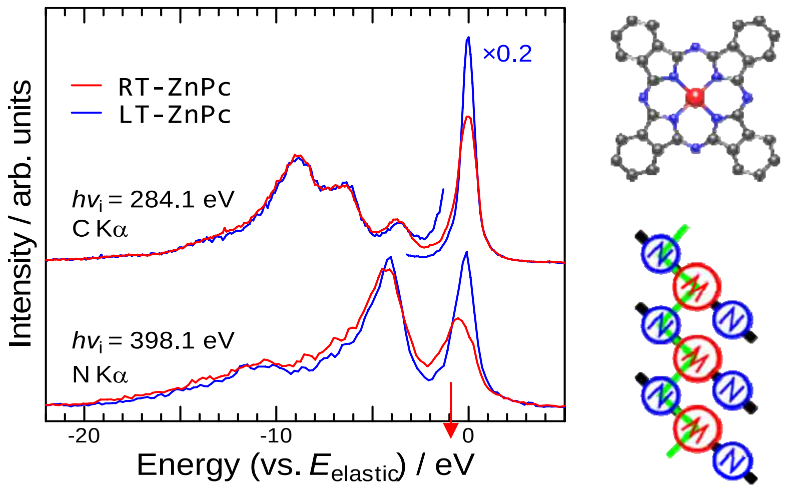


図2. 亜鉛フタロシアニン（ZnPC）の X 線発光スペクトル（左）。C Kα領域（左上）とN Kα領域（左下）を弾性散乱ピークに対するシフトとして示した。室温で製膜した結晶性の試料（—）と低温で製膜したアモルファス相の試料（—）で顕著な違いがみられた。N Kα領域では-0.7 eV 近傍にピークが観測された（↓）。これは結晶状態で隣接する亜鉛原子と窒素原子を介した分子間の相互作用に由来することが分かった（右下）。参考のためにフタロシアニンの分子構造を示す（右上）。赤が亜鉛、青が窒素原子を示す。

ークが報告されていたが、損傷由来である可能性も高く、そのピークの存在も含めてよくわかっていなかった。今回の測定では、発光分光器の顕微機能を利用し、測定時の損傷をモニターしながら、損傷しきい値を超えないよう試料を走査しながら測定した。その結果、典型的な有機半導体である亜鉛フタロシアニン(ZnPc)について極めて良質なスペクトルを取得することに成功した。図2にその結果を記す。結晶構造依存性についても今回初めて検出することに成功した。弾性散乱ピークの形状に注目すると、結晶膜のN Kα発光のみに共鳴非弾性散乱構造(RIXS)が現れることがわかった。RIXS構造のエネルギーは約 0.6eVであり、この値はエネルギーギャップ、誘電率、分子間距離から定性的に見積もることができる励起子束縛エネルギーの大きさ(0.6–0.8eV)とよく一致することがわかった。このことから今回観測したRIXS構造はラマン活性な窒素サイトを介した分子間相互作用を初めて観測した例であると考えられる(論文準備中)。

(2-2) DNA の電子状態観測

これまで DNA 分子の電子状態は、理論的研究が先行していたが、実験的に精度の高い電子構造を得ることは困難であった。今回高効率の軟 X 線発光分光器によって初めてスペクトルの取得に成功した(論文投稿中)。

(3) 水溶液の軟 X 線吸収スペクトル測定用透過型軟 X 線セルの開発

軟X線は物質との相互作用が大きいため、透過法による吸収スペクトル測定は通常行うことができない。しかし水溶液のバルクの電子構造などを観測するには、透過法は精度が高く精密な議論をするうえで望ましい。筆者は発光分光器の透過型回折格子を開発する段階で、SiNxメンブレンの応力特性が 100 nm以下の窓材料をもつ極薄の液体セルに利用できるとの着想を得ていた。そこで本研究において、市販のSiNxメンブレン(厚み 100 nm)の応力特性を測定した(図3左)。その結果、7 kPa以下の圧力差範囲ではメンブレンは弾性限界を超えず可逆的な応答をすることを確認した。次に、図3右のように軟X線が輸送される超高真空と液体セルの間の 1 気圧の圧力差に耐えるための 200 x 200 μm^2のSiNxメンブレンと、液体セルの窓材用の 2x2mm^2の大型SiNxメ

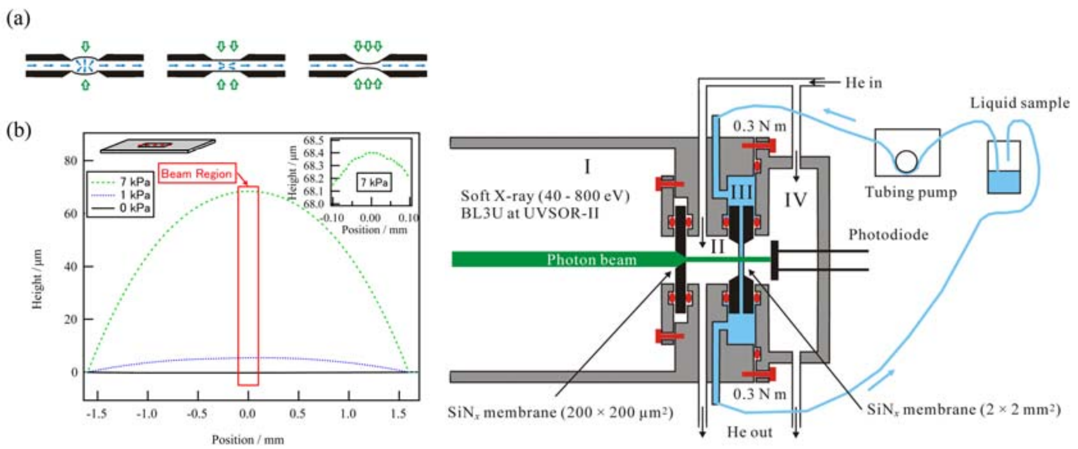


図3. SiNx メンブレンの圧力差応答(左)と開発した液体セル(右)。SiNx メンブレンは弾性変形範囲内であれば圧力差によりメンブレンの厚みをコントロールすることができる。

ンブレンを組み合わせた液体セルを考案した。これにより、高次光の混入を含めて実験的に精度の高い軟 X 線吸収スペクトルが測定可能であることを明らかにした。

⑷軟 X 線発光収量軟 X 線吸収分光法による電極下有機材料の電子構造の研究
これまで電極下の有機材料の電子構造を調べる手段は破壊的であった。今回、金電極下の有機材料の電子構造を軟 X 線発光収量法を用いた軟 X 線吸収分光法によって初めて測定することに成功した。

(5) インテリジェント X 線 2 次元検出器の開発
シリコン半導体検出器では、光子を電子ホール対に変換し、電子もしくはホールを信号として取り出すことで動作する。X 線を検出する場合は、1 光子が多数の電子ホール対（以下電荷雲と呼ぶ）を発生させるので、電荷雲の広がりが大きいと隣接するピクセルにも電荷が漏れ出してしまう。通常の利用方法ではこの漏れ出しが検出器の空間分解能を悪くさせる。

本研究のために開発した電荷雲の広がりを積極的に利用した高空間分解能 CCD 検出器の原理は、イギリス The Open University のグループが次世代 X 線天文衛星用として提案している。

また、この知見を発展させた X 線自由電子レーザー用高ダイナミクスレンジ X 線 2 次元検出器の開発を進めている。このアプリケーションでは読み出しノイズを 200 e-以下に抑えて 1 光子検出能を実現しつつ、同時に最大検出可能光子数（Full Well Capacity）をどこまで改善できるかがカギとなっているが、試作センサーでは、最大検出可能光子数（Full Well Capacity）が 10 倍改善される（Full Well 50 Me- 80 μm pixel）ことを明らかにした（アメリカで開発中の最先端センサーと比較した値）。

また、この検出方法を利用すれば、マンモグラフィー用センサーの空間分解能を、放射線被ばく量を増やさず飛躍的に改善できると期待される。実際の臨床レベルでの実質的な画像を評価するための指標である Detective Quantum Efficiency で比較すると、単一ウェハー構成でも現状の最先端市販機にくらべ 3 倍改善されるほか、診療現場での要望の強い高空間分解能化も達成できることがわかった。現在、協力企業と実用化に向けて取り組んでいる。

5. 自己評価
機能性物質の機能を解析・設計する上で、電子分光法はきわめて強力な手法となっている。電子分光法は、物質に光を入射し、光電効果によって放出される電子の運動量を測定するので、放出電子が曲げられてしまう電場・磁場下や、電子が放出されない液体や電極などに覆われた物質の測定は困難である。一方、放出される蛍光軟 X 線やラマン散乱を検出すれば、上記制限を取り除くことができる。そこで、機能性物質を解析する新しいツールとして放出軟 X 線を検出する分光法、特に軟 X 線発光分光法の測定技術を発展させ適用範囲を拡大させたいという動機をもって研究を開始した。

研究開始時点では、研究者が開発した透過型回折格子を採用した軟 X 線発光分光器の機能強化が研究計画の柱であった。本研究期間内に、スイスライトソース放射光施設においてきわめ

て高エネルギー分解能のスペクトルが報告されるようになり注目を集めている。本分光器の特徴の一つに高効率性があるので、彼らのグループの実験手法よりも入射 X 線量を大幅に少ない条件でスペクトル取得が可能である。そこで、本研究方向を高エネルギー分解能の顕微スペクトル取得から、入射 X 線による損傷のために測定が不可能であった有機物系への適用に集中して研究を進めることとした。その結果、上記で述べるような系の測定が可能になった。これにより軟 X 線発光分光法の適用範囲を拡大できたと考えている。また同時に地道な作業であるが、ソフトウェアの改良を行い、開発者でない研究者でも容易に測定できるシステムに進化させることができた。

研究期間の途中で所属機関の異動があり、軟 X 線発光分光器の設置場所に頻繁に出かけることができなくなったので、新たに着想した液体試料の軟 X 線透過法による吸収スペクトル測定技術の開発についても研究を行い、方法論の確立まで実現することができた。

また本研究は分子科学研究所（元所属）・長坂将成、山根宏之、堀米利夫、小杉信博、理化学研究所・加藤浩之、川合眞紀、スウェーデン KTH・Yi Luo, Hans Agren、理化学研究所X線自由電子レーザー計画推進本部・工藤統吾、亀島敬、広野等子、矢橋牧名、石川哲也、高エネルギー加速器研究機構・新井康夫、各先生との共同研究による成果です。感謝申し上げます。

6. 研究総括の見解

透過型回折格子分光器を、独自の光学設計に基づき高い空間分解能を有する顕微軟 X 線発光分光器に発展させる有用な研究である。電磁場存在下、電解質中など特殊環境下にある機能性材料の動的挙動を、高エネルギー分解能で「その場」測定することを狙った意欲的研究である。主たる成果は次の3点である。

1. 分光器の最適化の自動化をおこない 5 μm の空間分解能の顕微機能を有している軟 X 線発光分光器の開発に成功した。

2. 上記軟 X 線発光分光器により、有機半導体である亜鉛フタロシアニン(ZnPc)について極めて良質なスペクトルを取得する等の計測に成功し、結晶膜の N Kα 発光のみに共鳴非弾性散乱構造が現れることを明らかにした。また、DNA の軟 X 線発光スペクトルの測定にも成功している。

3. 水溶液の軟 X 線吸収スペクトル測定用透過型セルの開発にも取り組み、SiNx メンブレンが窓材適していることを実証した。

高感度顕微軟 X 線発光分光器の開発に成功し、有機化合物の電子状態測定に初めて成功していることは高く評価される。

これらの成果は 3 篇の原著論文にまとめられ、3 件の招待講演で発表された。

本法は、光電子分光法とは異なる情報を得ることのできる方法であり、高エネルギー分解能で「その場」測定するため、FET などの半導体デバイス、電池など電気化学デバイスのみならず、有機材料あるいはDNAの電子状態の観測も可能とするため、その波及効果は極めて大きい。今後は、本計測法の応用展開に期待したい。

7. 研究成果リスト

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

（1）論文（原著論文）発表

論文(国際)

- M. Nagasaka, T. Hatsui, T. Horigome, Y. Hamamura, N. Kosugi, "Development of a liquid flow cell to measure soft X-ray absorption in transmission mode: A test for liquid water", *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.*, in press.
- H.S. Kato, R. Hirakawa, Y. Yamauchi, T. Minato, M. Kawai, T. Hatsui, N. Kosugi, "Electronic state observation of inner organic thin films beneath electrodes: Fluorescence-yield X-ray absorption spectra of pentacene derivative films", *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **2009**, 174(1-3), 93-99.

（2）著書

- 初井宇記, 佐藤仁, 高田恭孝, "軟 X 線発光分光", in "内殻分光", 太田俊明, 横山利彦編 アイ・ピー・シー出版, 東京, 2007

（3）学会発表

ポスター発表（国際）

- T. Hatsui, T Horigome, Nobuhiro Kosugi Takaki Hatsui, Kazumasa Okamoto, Yoshinori Matsui, Takahiro Kozawa, Shu Seki, Seiichi Tagawa, Yutaka Hamamura, Nobuhiro Kosugi: 、Development and Performance of Quasi-Free Standing Transmission-Grating or Soft X-ray Emission Spectrometer、The 15th International Conference on Vacuum Ultraviolet Radiation Physics, VUV XV（2007）
- Takaki Hatsui, Nobuhiro Kosugi, Andrew Holland , Richard Ingley, Karen Holland、Development and Performance of Electron-Multiplying CCD Soft-X-Ray Detector with Sub-Pixel Spatial Resolution、The 15th International Conference on Vacuum Ultraviolet Radiation Physics, VUV XV（2007）
- Kazutoshi Fukui, Tomohide Sakai,Takaki Hatsui, Nobuhiro Kosugi, Yutaka Hamamura, Kazumasa Okamoto Yoshinori Matsui, Takahiro Kozawa, Shu Seki, Seiichi Tagawa、High Precision Measurement of Higher Diffraction-Order Contamination in Monochromatized Soft X-ray by using a Compact Transmission-Grating Spectrometer、The 15th International Conference on Vacuum Ultraviolet Radiation Physics, VUV XV（2007）

（4）招待講演

招待講演（国際）

- T. Hatsui, T Horigome, Nobuhiro Kosugi、First High-Resolution Soft X-ray Emission Spectra Measured by Using a Newly Developed Transmission-Grating Spectrometer、The 15th International Conference on Vacuum Ultraviolet Radiation Physics, VUV XV（2007）

- Takaki Hatsui、X-ray emission shaking Neighboring Atom 、International Workshop on Resonant Inelastic Soft X-Ray Scattering (RIXS08)(2008)

招待講演(国内)

- 初井宇記、透過型軟 X 線発光分光器による元素ペアに固有な特性 X 線の発見と X 線自由電子レーザーの可能性、第 11 回 XAFS 討論会(2008)

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

- M. Furukawa, H. S. Kato, M. Taniguchi, T. Kawai, T. Hatsui, N. Kosugi, T. Yoshida, M. Aida, "Electronic states of the DNA polynucleotides poly(dG)-poly(dC) in the presence of iodine", *Phys. Rev. B* **2007**, 75, 045119.

研究課題別評価書

1. 研究課題名
時間分解 X 線磁気円二色性分光法の開発

2. 氏名
松田　康弘

3. 研究のねらい
　X 線磁気円二色性(XMCD)分光は元素選択的に電子・磁気状態を調べることができる優れた計測手法であるが、強磁場環境の導入が技術的に困難であったため、従来、その適用はほとんどが強磁性体の研究に限られてきた。本研究の目的は、これまでにない強磁場領域での XMCD 計測をパルス磁場技術により実現し、常磁性体や反強磁性体も含めた広範囲な物質に適用可能な"スピン偏極電子のミクロな計測手法"を確立させることにある。さらにパルス磁場と放射光 X 線の時間構造を利用して時間分解計測へと展開し、磁気的励起状態の時間発展を電子状態から解明できる時間分解 XMCD 分光技術の開発を行う。この技術により、基底状態が非磁性の物質についても励起状態における磁気特性を調べることが可能となり、広範囲な磁性物質について電子状態とそのダイナミクスの解明が大きく進展すると期待される。

4. 研究成果
2-1. 40 T 強磁場中における X 線磁気円二色性分光技術の開発
　X 線磁気円二色性(XMCD)分光の実験は放射光 X 線を用いて、従来、最高 10 T、通常は 2 T 程度の磁場中で行われてきた。この磁場の上限を大幅に引き上げることができれば、測定対象物質を画期的に拡張できる。特に、軌道混成や結晶場などの効果で低磁場領域では非磁性である物質において、励起状態にある磁気的状態を調べることが可能となり、従来の XMCD 計測の枠を超えた新たな研究領域を切り開く可能性がある。本研究では、その実現のため、世界的にもユニークな超小型のパルスマグネットを開発し、従来の磁場上限を一挙に4倍の 40 T まで引き上げ、その下での XMCD 測定技術を確立した。図1は本研究で開発した超小型パルスマグネットの写真である。 磁場発生空間を直径 3-5mm、長さ 16mm と大幅に制限したため、装置全体のコンパクト化に成功し、放射光施設への強磁場環境の導入を画期的に容易にした。実際に、この超小型パルス磁場装置を、円偏光制御された放射光 X 線と組み合わせ、SPring-8 において、世界最高磁場での XMCD 計測に成功した。

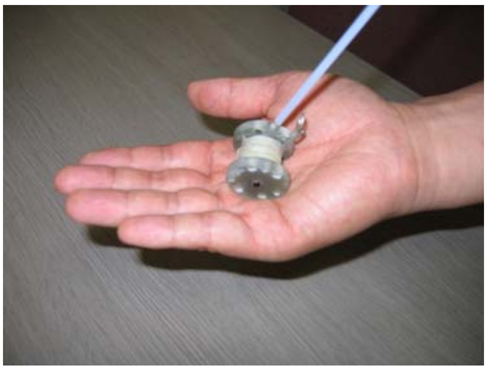


図1. 開発した超小型のパルスマグネット。可能な発生磁場の上限は約 50 T であるが、放射光施設では安全上の問題から、通常 40 T までで実験を行っている。

2-2. 希土類磁性体の価数揺動状態の解明

開発した計測技術の応用として、希土類元素である、ユウロピウム(Eu)、イッテルビウム(Yb)、セリウム(Ce)を含む、$EuNi_2(Si_{1-x}Ge_x)_2$(x=0.82, 0.85)、$EuNi_2P_2$、$YbInCu_4$、$CeRh_2Si_2$等の磁性体についてXMCD測定を行った。これらは、4f電子と伝導電子の局在−遍歴相関が強く、価数揺動または重い電子系として知られる物質群である。得られた結果の中から最も興味深いものを図2、3に示す。

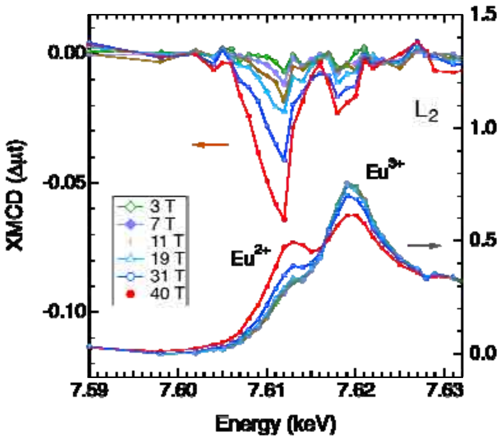


図２． 最高 40 Tの強磁場中での$EuNi_2(Si_{1-x}Ge_x)_2$(x=0.82)のX線磁気円二色（XMCD）、X線吸収（XAS）スペクトル。測定温度は 5 K。

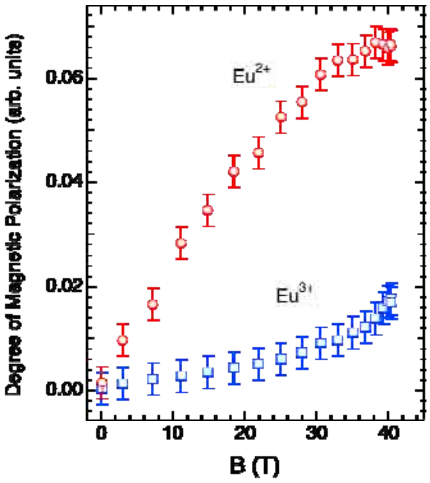


図３． XMCDスペクトルから算出した$EuNi_2(Si_{1-x}Ge_x)_2$(x=0.82)のEu 5d電子の 2 価、3 価状態それぞれにおける磁気偏極度の磁場依存性。

図2は$EuNi_2(Si_{1-x}Ge_x)_2$(x=0.82)の最高 40 T強磁場中のXMCDスペクトル、及びX線吸収スペクトル（XAS）である。実験は 5 Kの低温下で行った。XMCD、XAS両スペクトル共にEuの 2 価と 3 価の成分それぞれからの信号が明瞭に分離して観測されている。XASの 2 つのピーク強度は 2 価、3 価の状態混成度合いを直接的に反映し、スペクトルの磁場依存性から磁場中で価数状態が大きく変化していることがわかる。XMCDスペクトルにも 2 本のピークが観測されるが、2 価状態が全角運動量J=7/2 の磁気状態であるのに対して、3 価はJ=0 の非磁性状態であるため、2 本のピーク構造の起源は自明ではない。図3はスペクトルから見積もったEu 5d電子の磁気偏極度の磁場依存性である。ここで、XMCDピーク強度を吸収スペクトルのピーク強度で規格化した値を磁気偏極度として定義した。注目すべき点は、磁性状態（2 価）と非磁性状態（3 価）で磁場依存性が定性的に異なっていることである。この試料の磁化の磁場依存性はむしろ非磁性状態の 3 価の振る舞いに似ており、3 価の信号はもともと局所的な磁気モーメントが無いところに、波動関数の混成を介して試料全体の磁気特性が反映していると考えられる。すなわち、3 価状態では伝導電子を介した広がった状態における磁気状態をみている可能性がある。一方、2 価状態では局所磁気モーメントの示す磁気応答を強く反映していると考えられる。図3から、2 価の信号は磁場に対して上凸の変化を示し、40 T付近で飽和している。これは、同じ化合物でGe組成を少し増加させたx=0.95 の試料で現れる反強磁性状態での磁化曲線と類似性がある。反強磁性状態では局所磁気モーメ

ントが試料全体の磁気特性を決定している。ここで示したx=0.82 の試料では、低温で価数揺動状態となり非磁性であるため、試料全体の磁化曲線は揺動状態の磁場による抑制と局在磁気モーメントの磁化過程を同時に反映する。そのため、仮に全てのEuイオンが 2 価の磁性状態であった場合の仮想的なx=0.82 の試料の磁化を測定することができたら、図3で示した 2 価の信号の磁場依存性の様になると期待できる。これらの結果は価数選別した強磁場XMCD計測でなければ得ることは不可能であり、従来の低磁場XMCDで得られるものとは質的に異なる情報である。

2-3. 波長分散 X 線吸収分光法によるパルス強磁場中時分解計測手法の開発

上記で述べた計測手法をさらに発展させ、パルス強磁場により励起された磁気状態の時間発展を XMCD によりプローブできれば、これまでにないミクロな磁気ダイナミクス計測手法となる。その実現のため、最短 500ns のゲート幅でエネルギー分散スペクトルが測定可能な分散型 X 線吸収分光装置(DXAFS 装置)とパルス強磁場技術の組み合わせ技術開発を行った。DXAFS 装置及び高速のマルチチャンネル X 線検出器は高エネルギー加速器研究機構(KEK)の Photon Factory AR-NW2A ビームラインに整備されているものを用いた。検出器へのゲート信号とパルス磁場のタイミングを図4に示す。この測定では 100 μs の時間幅でスペクトル計測しており、14.4 μs の不感時間を伴うが、連続してスペクトルを計測できる。この例では ms 程度のダイナミクス計測が可能である。放射光 X 線の ps のパルス構造を用いた実験を行うには、サブマイクロ秒程度の超高速パルス磁場の開発が必要で

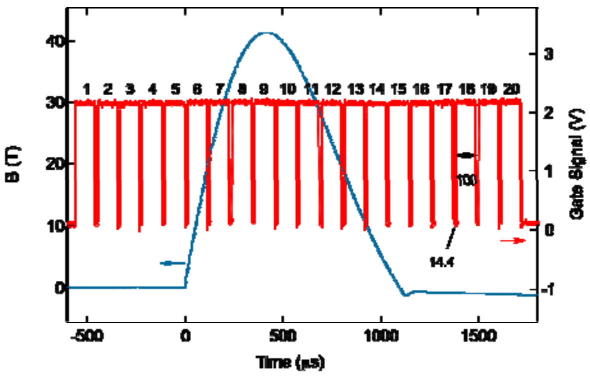


図4. 波長分散方式でのパルス強磁場下での X 線スペクトル測定における、検出器ゲートタイミングとパルス磁場。

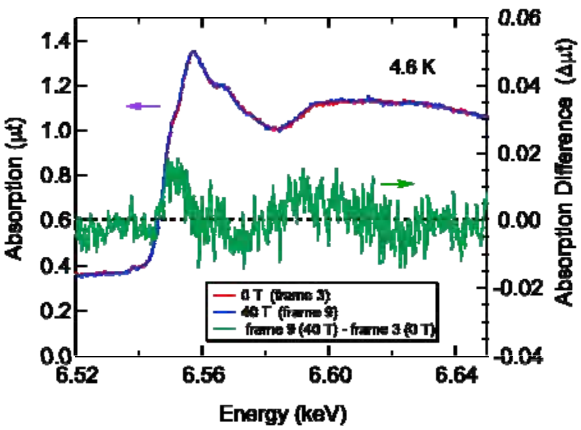


図5. 40 T とゼロ磁場での Mn(taa)の 4.6 K での Mn の K 端吸収スペクトルと、その差分スペクトル。

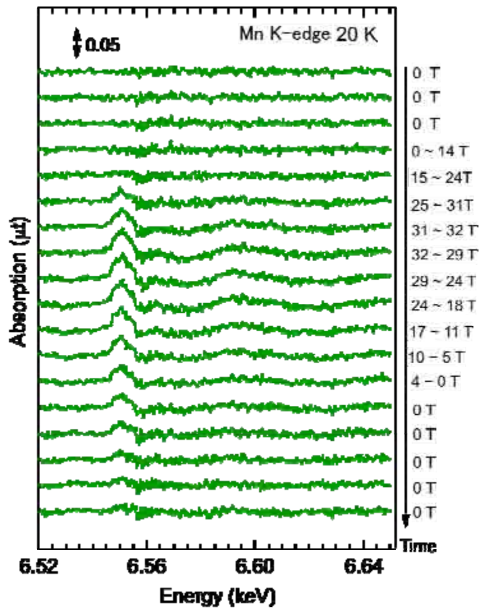


図6. Mn(taa)の 20 K での差分吸収スペクトルのパルス磁場印加による応答。

あり、これは将来的な課題である。

この計測技術を用いて、スピンクロスオーバー物質 Mn(taa)の磁場中 XAS の研究を行った。図5は 4.6 K における Mn の K 端近傍での 40 T とゼロ磁場における XAS スペクトルである。スペクトルの磁場依存性は図のスケールではほとんど見られないが、スペクトル差分をとると磁場効果が明瞭に現れる。このような微小な磁場変化が観測できたのは、DXAFS 方式により高精度測定が可能になったためである。また、20 K におけるスペクトル差分信号のパルス磁場の印加にともなう応答を図6に示した。この結果から、磁場中でスピンクロスオーバーが誘起され、局所的な格子変形が起こったことが強く示唆される。また、興味深いことに、磁場誘起信号は磁場印加直後、磁場がゼロになったあともしばらく有限に残り、その度合いは温度に強く依存することがわかった。このことから、スピンクロスオーバー転移におけるダイナミクスに関する情報が得られ、特性緩和時間を 34 μ s、ポテンシャルバリアを 49 K と見積もることに初めて成功した。

5. 自己評価

未踏強磁場領域での XMCD をパルス磁場技術を用いて実現するという、当初の目的は基本的に達成された。40 T という磁場はこれまでの定常磁場の上限の 4 倍程度であり、従来は XMCD の研究対象とならなかった多くの反強磁性体、常磁性体を研究可能にした点は評価できる。さらに、実際に、価数揺動現象を示す Eu イオンの XMCD が強磁場領域で価数依存となることを発見し、XMCD メカニズムが価数によって異なることを見出した。これは、従来の XMCD 計測の範疇を超える新たな XMCD 計測の応用であり、強磁場 XMCD が単なる磁場範囲の拡張以上の意味があることを証明した点で重要である。以上のことから、本研究前半部分における当初目標の基本的な要素は達成されたと評価できる。

磁場強度を大幅に拡張できたため、磁場により励起状態を誘起することが可能となった。瞬間的なパルス磁場での励起がどのような緩和過程となるかを XMCD によって電子状態からみることが、本研究の後半の目的であった。このダイナミクス計測の実現に向けて、サブマイクロ秒の 40 T 超高速パルス磁場と波長分散 X 線分光（DXAFS）の組み合わせ技術の開発を行った。超高速パルス磁場は、新しい電源の製作により試験的なパルス磁場発生を行い、従来の 1 ms パルスに比べて 2 桁程度短い 6 μs の短パルス化に成功した。しかしながらサブマイクロ秒はまだ達成しておらず、磁場値も 1 T 程度の弱磁場であるため、今後のマグネット部分の開発が必要である。一方で、DXAFS 装置と 1ms の 40 T パルス磁場の組み合わせ技術は確立でき、ダイヤモンド移相子を組み合わせれば XMCD 測定が可能な段階まで到達できた。研究の後半部分については、達成度は当初の 30%程度であると評価できる。

以上から、本研究の全体についての達成度は当初の目標の 70～75%程度と自己評価できる。

6. 研究総括の見解

元素選択的に電子・磁気状態を計測できる XMCD にパルス磁場技術を導入し未踏強磁場を発生させ、強磁性体のみならず、常磁性体や反強磁性体も測定可能とすること及びパルス磁場励起における緩和過程ダイナミックス計測も目的とする意欲的な研究である。主たる成果は次の3

点である。

1. ユニークな超小型パルス磁場装置の開発に取り組み、XMCD計測の磁場上限を 40 T まで引き上げることに成功した。SPring-8 において、この超小型パルス磁場装置を円偏光制御された放射光 X 線と組み合わせ、世界最高の強磁場XMCDの計測に成功した。

2. この計測で、価数揺動現象を示す Eu イオンの XMCD が強磁場領域で価数依存となることを発見し、XMCD メカニズムが価数によって異なることを見出した。

3. 磁場による励起の緩和過程ダイナミックス計測用に 40 T 超高速パルス磁場と波長分散 X 線分光を組み合わせた技術を開発した。

40 T の XMCD を世界に先駆けて開発し、従来は XMCD の研究対象とならなかった多くの反強磁性体、常磁性体を研究可能にした点は高く評価できる。

これらの成果は 6 篇の原著論文にまとめられ、4 件の招待講演で発表された。また平成 19 年に日本物理学会学術誌 Papers of Editors' Choice、平成 21 年に第 30 回本多記念研究奨励賞を受賞している。

材料やデバイスのスピン偏極または磁気的励起状態ダイナミクスを電子状態から理解することは新機能材料の開発に繋がる研究であり、波及効果は極めて大きい。今後の研究には、更なる強磁場及び超高速パルス磁場の開発、XMCD 開発者メリットを生かして、この方法の有用性を示し新たなサイエンスを展開することを望む。

7. 研究成果リスト

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

（1）論文（原著論文）発表

論文（国際）

- Y. H. Matsuda, T. Inami, K. Ohwada, Y. Murata, H. Nojiri, Y. Murakami, H. Ohta, W. Zhang, K. Yoshimura, "High-Magnetic-Field X-ray Absorption Spectroscopy of Field-Induced Valence Transition in $YbInCu_4$", *J. Phys. Soc. Jpn.* **2007**, 76 , 034702 1-6.
- Y. H. Matsuda, T. Inami, K. Ohwada, Y. Murata, H. Nojiri, Y. Murakami, A. Mitsuda, H. Wada, H. Miyazaki, I. Harada, "High-Magnetic-Field X-ray Absorption Spectroscopy of Field-Induced Valence Transition in $EuNi_2(Si_{1-x}Ge_x)_2$", *J. Phys. Soc. Jpn.* **2008**, 77, 054713 1-7.
- Z. W. Ouyang, Y. H. Matsuda, H. Nojiri, Y. Inada, Y. Niwa, T. Arima, "Insulator-metal phase transition of $Pr_{0.6}Ca_{0.4}MnO_3$ studied by x-ray absorption spectroscopy in pulsed magnetic fields", *J. Phys. :Condens. Matter* **2008**, 21, 016006 (5pp).
- Y. H. Matsuda, Z.W. Ouyang, H. Nojiri, T. Inami, K. Ohwada, M. Suzuki, N. Kawamura, A. Mitsuda, H. Wada, "X-Ray Magnetic Circular Dichroism of a Valence Fluctuating State in Eu at High Magnetic Fields", *Phys. Rev. Lett.* **2009**, 103, 046402.

論文（国内）

- 松田康弘、"X-Ray Magnetic Circular Dichroism Spectroscopy in Pulsed High Magnetic Fields"、 *X 線分析の進歩* **2009**、 40、 51-59.

（2）受賞

- 2009 年 3 月　第 30 回本多記念研究奨励賞、「強磁場 X 線分光法の開発と磁性研究への応用」

（3）著書

- 松田康弘、稲見俊哉、大和田謙二、野尻浩之、超小型パルスマグネットを用いた放射光 X 線分光：強磁場中の電子状態をみる新手法、固体物理，2008，vol42，　881-889.
- 松田康弘、パルス強磁場における X 線磁気円二色性分光、固体物理, 2009, Vol. 44, 577-586.

（4）学会発表

口頭発表（国際）

- Y. H. Matsuda , J. L. Her, T Inami, K. Ohwada, Z. W. Ouyang, K. Okada, H. Nojiri, A. Mitsuda, H. Wada , K. Yoshimura , H. Amitsuka, N. Kawamura, A. Kotani, XMCD spectroscopy on valence fluctuating and heavy fermion compounds in very high magnetic fields up to 40 T, The 14th International Conference on X-ray Absorption Fine Structure (XAFS14), 2009.

口頭発表（国内）

- 松田康弘、Ouyang Zhongwen、野尻浩之、稲見俊哉、大和田謙二、鈴木基寛、河村直巳、光田暁弘、和田裕文、Eu 価数揺動物質のパルス強磁場 XMCD、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）.
- 松田康弘、Ouyang Zhongwen、野尻浩之、稲見俊哉、大和田謙二、鈴木基寛、河村直巳、光田暁弘、和田裕文、EuNi2(Si1-xGex)2 のパルス強磁場 XMCD、日本物理学会（第63回年次大会）（2008）.
- 松田康弘，オーヤン ゾンヴェン，岡田郷子，野尻浩之，稲見俊哉，大和田謙二，河村直己，鈴木基寛，吉村一良、価数転移物質$YbInCu_4$のパルス強磁場XMCD、日本物理学会 2009 年春季大会（2009）.
- 松田康弘、何 金龍、中野元裕、丹羽尉博、稲田康宏、強磁場DXAFSでみるMn錯体の磁場誘起スピンクロスオーバー、第23回日本放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム（2010）.

（5）招待講演

招待講演（国際）

- Y. H. Matsuda, High Magnetic Field X-ray Magnetic Circular Dichroism in Valence Fluctuating Compounds、Energy Dispersive X-ray Absorption Spectroscopy: Scientific Opportunities and Technical Challenges （2009）.
- Y. H. Matsuda 、X-ray absorption and magnetic circular dichroism spectroscopy in pulsed high magnetic fields、The 2009 Gordon Research Conference (GRC) on X-ray Science（2009）.

招待講演（国内）

・ 松田康弘、パルス強磁場中での X 線内殻磁気分光、日本物理学会（第62回年次大会）（2007）.
・ 松田康弘、強磁場 XMCD でみる希土類価数揺動物質の電子・磁気状態、第 44 回 X 線分析討論会（2008）.

研　究　報　告　書

「タンパク質の新規電気化学定量法の開発」

研究期間：平成18年10月～平成23年3月 （平成20年　ライフイベントで中断）
研 究 者：吉田　裕美

1．研究のねらい

検量線を用いずに物質量を決定する、すなわち絶対定量法は、あらゆる化学物質の分析法の根幹となっている。その基本となる測定法が、重量測定である。SI単位系に基づいて物質量を求める場合、純物質の重量からモル数を決定する。しかし、タンパク質やペプチドなどの微量生体試料では、高純度で重量測定が可能な量の標準試料を得ることができないため、物質量を決定することができない。

重量測定を必要としない簡便で高感度な絶対定量法としては、電量測定、すなわちクーロメトリーがある。クーロメトリーは、Faraday の法則に基づいて物質の酸化還元によって生じる電流から直接、物質量を決定する方法である。同法は、検量線の不要な絶対定量法として広く用いられているが、測定対象が酸化還元するものに限られていた。そこで、本研究では、物質の酸化還元の代わりに、イオン性物質の水相および有機相間の電解抽出を利用して絶対定量を行うことを試みた。外部電源によって水相｜有機相界面に電位差を印加し、それによって生じるイオン性物質の界面移動を電流として測定するもので、従来のクーロメトリーのように物質が酸化還元する必要がない。したがって、難酸化還元性のイオン性物質の絶対定量に有効であると考えた。

2．研究成果

測定原理を図 1 に示す。タンパク質やペプチドなどの生体試料は、分子内に大なり小なり電荷を有する。そこで、電荷を有するイオン性物質を、試料水溶液から有機相に移動させ、そのときの電荷移動量を測定することによって生体試料の定量を行う。具体的には、試料を含む水溶液を有機相と接触させ、外部電源と各相に挿入した二つの電極を用いて水相｜有機相界面に電位差 E を印加する。界面電位差がイオン性物質の水相｜有機相界面移動エネルギー（疎水性・親水性の指標）に相当したときに、イオン性物質は界面移動するので、その電荷の移動量を移動電流 I として測定し、積分によって得られたクーロン数 Q からイオン性物質のモル数 n を見積もる。

絶対定量で不可欠な点は、試料水溶液中のイオン性物質が短時間に全て界面移動することである。イオン性物質の界面移動は界面近傍の拡散層で生じるため、短時間で全てのイオン性物質を界面移動させるためには、各相の厚みを拡散層に近い厚みまで薄層しなければならない。そこで、水相と有機相を薄層にした薄層電解セルの開発を行った。薄層電解セルでは、各相に挿入

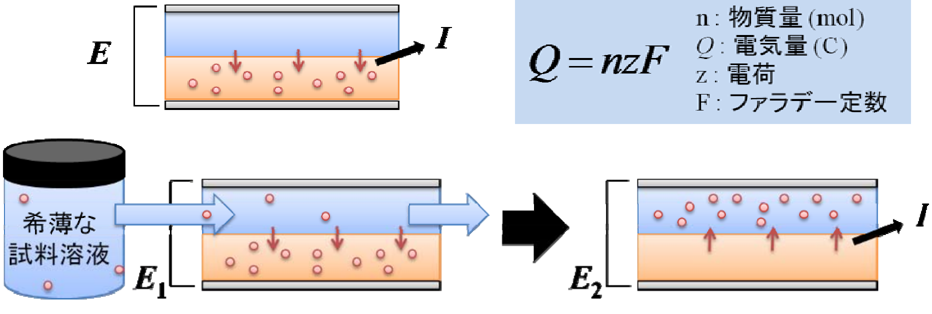


図 1　測定原理

する電極として、正確な界面電位差を印加でき、且つ電極反応物質が水相と有機相を汚染しないような電極を用いる必要がある。本研究では、（1）各相に挿入する電極の開発、（2）薄層電解セルの作製、（3）薄層電解セルによるイオン性物質の絶対定量を行った。

（1）電極の開発

水相と有機相を薄層化する場合、各相に挿入する電極は次の条件を満たす必要がある。一つは、電極反応生成物が水相や有機相を汚染しないことである。電極反応生成物の多くはイオン性化学種であるが、これらは界面移動の測定の際、水相｜有機相界面を移動し、測定を妨害する。これを避けるためには、電極反応生成物が各相に溶解しないことが望ましい。もう一つは、電極系が単純で参照電極 RE および対極 CE としての機能を満たすことである。通常の液液界面電解セルでは、電位を規制するための RE と電流を流すための CE の計 2 本を水相と 有機相にそれぞれ挿入した 4 電極式電解セルが用いられる。それに対し、一つの電極が RE および CE として機能するならば、水相と有機相を 2 本の電極ではさんだ単純な電解セルを構築できる。これが実現すると、電解セルの小型化のみならず、マイクロ流路への展開も期待できる。これらの条件を満たす電極として、水相では銀｜塩化銀電極が広く用いられているが、有機相の場合、これらの機能を有する電極は報告されていなかった。そこで、有機相用の電極として、導電性高分子で被覆したガラス電極を開発し、その電極機能の評価を行った。

図 2 は導電性高分子被覆電極の電極反応を模式的に示したものである。導電性高分子は、それ自体が酸化還元すると同時に、電気的中性を保つように高分子内へイオンをドープする。そこで、有機相中の支持電解質アニオンを導電性高分子内にドープした電極を作製した。導電性高分子は、有機相に不溶であるため、電極反応が生じた場合、有機相に対して支持電解質がドープ・脱ドープされる。この時、電極電位は式（1）で表わされる。

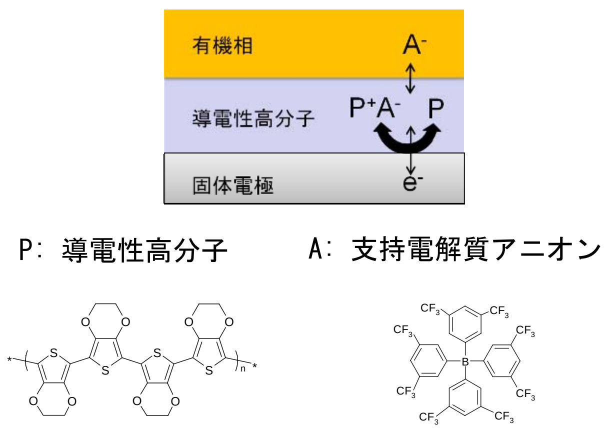


図２　導電性高分子被覆電極

$$E = E^0 + \frac{RT}{F}\ln\frac{a_{\mathrm{P^+A^-(Poly)}}}{a_{\mathrm{P(Poly)}}} - \frac{RT}{F}\ln a_{\mathrm{A^-(Org)}} \qquad (1)$$

ここで、右辺第１項は、導電性高分子の標準酸化還元電位、第二項は、導電性高分子の酸化体 $a_{P+A-(Poly)}$ と還元体 $a_{P(Poly)}$ の比、第三項は、有機相中の支持電解質アニオンの活量 $a_{A-(Org)}$ を示している。図 3 は、作製した電極電位の安定性を示したものである。電極電位の安定性を確保するために導電性高分子の酸化体と還元体の比を 1:1 に調整した。得られた結果は、長時間電極電位が安定であることを示した。一方、支持電解質の濃度を変化させて電極電位を測定したものが図 4 である。式（1）のとおり、支持電解質に対してネルンスト応答した。低濃度から高濃度まで測定したのち、有機溶媒で洗浄し再び測定したものも示しているが、電極電位の再現性も良好であった。導電性高分子被覆電極において、このような良好な電位安定性と電極電位の再現性が得られたのは、世界初である。

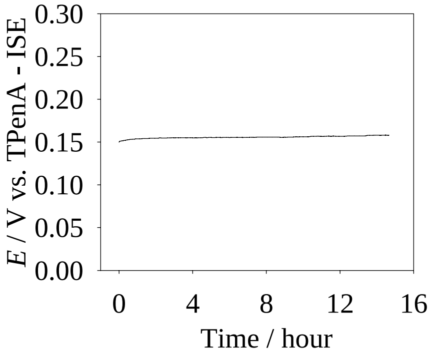


図３　電極電位安定性

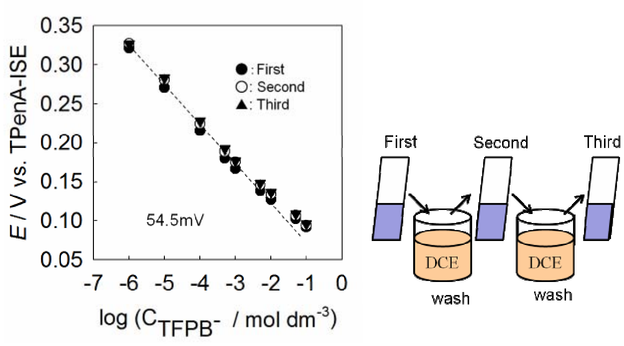


図４　電極電位の応答性・再現性

(2) 液液界面薄層電解セルの作製

図５に示すように水相と有機相を薄層にした薄層電解セルを作製した。有機相は dichloroethane DCE である。水相の電極として銀｜塩化銀電極、有機相の電極として導電性高分子被覆電極を用いた。同セルは 2 電極式であり、それぞれの相に挿入した電極は RE および CE として機能する。導電性高分子被覆電極と銀｜塩化銀電極の間に、薄層の水相と有機相を形成した。薄層の水相は、PTFE 製のスペーサーによって厚さ 50 μm に調整した。一方、薄層の有機相は、厚さ 50 μm の PTFE 多孔質膜に有機相を含浸させることによって形成した。

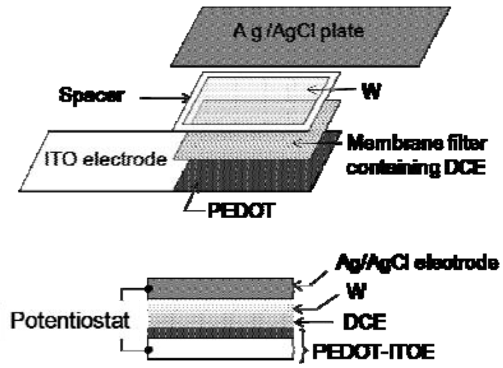


図５　薄層電解セル

図６は、目的イオンとしてtetraethylammonium ion TEA^+ を水相に添加したのち測定された界面電位−イオン移動電流曲線（イオン移動ボルタモグラム）を示している。界面電位を正電位側に掃引すると、TEA^+ の水相から有機相への移動を示す正電流ピークが、界面電位を逆に負電位側に掃引すると、有機相へ移動したTEA^+ が水相へと逆抽出される負電流ピークが観察された。界面電位差を変化させる速度（掃印速度）を 50 mV/sから 5 mV/sまで変化させると、正電流ピークと負

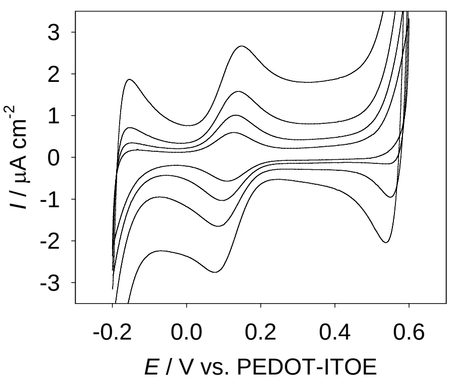


図６　掃印速度依存性（5, 10, 20, 50 mV s^{-1}）

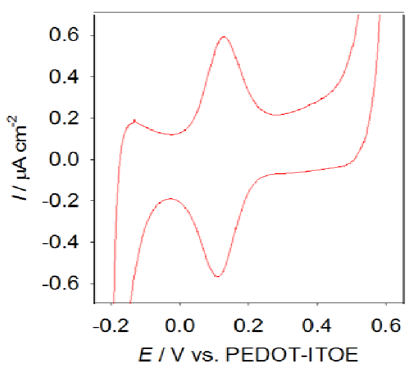


図７　5 mV s^{-1} で測定したボルタモグラム

電流ピークのピーク間電位差が 65 mVから 10 mVまで減少した。これは、50 mV/s のように掃引速度が速いときの拡散層は薄く、TEA^+ の界面移動はTEA^+ のバルクからの拡散によって律速されているが、掃引速度が低下するにつれて拡散層は次第に厚くなり、水相の厚さと同じになったことを示している。この時、水相中に存在する TEA^+ のほとんどが 有機相へ界面移動する。したがって、5 mV/s で測定したボルタモグラムは、ピーク間電位差が小さく、ゼロ電流軸に対して対称なベル型になる。

図 7 は、 5 mV/s のボルタモグラムを拡大したものである。電流ピークの面積からクーロン数を解析した結果、正電流ピークでは 91 pmol 、負電流ピークでは 95 pmol のTEA^+ が界面移動していた。 水相に含まれる TEA^+ の物質量を水相の体積と濃度から計算すると 110 pmol であるので、 TEA^+ の界面移動の電解効率は、水相から有機相への移動では 83 %、有機相から水相への移動では 86 % であった。つまり、0 V ～0.25 Vまで電位を掃引している間（約 50 秒）に、水相に存在するTEA^+の約 80％ が有機相に電解抽出され、再び有機相から水相に逆抽出されていることが分かった。これは、薄層液液界面電解セルを用いれば、水相中の目的イオンの全量を有機相に濃縮した後、再び水相に逆抽出することにより、イオン移動電流のクーロン数に基づく、高感度な絶対定量が可能であることを示唆している。

3. 今後の展開

本研究では、安定な電位を示す導電性高分子被覆電極を作成し、水相と有機相を薄層にした電解セルを開発することによって、ペプチドの絶対定量法を実現した。これらの成果をふまえて、様々な構造を有するペプチドについて適用し、その適用範囲を確定したい。また、開発した方法は、ペプチドの一分子あたりの電荷を基準として定量するものであるが、ペプチドがリン酸化したり、イオンと会合する場合、一分子あたりの電荷数が変化すると考えられる。逆にこれを利用すれば、ペプチドの状態を簡便に評価できると考えられる。これらの研究に対しても、同法の応用を検討する。一方、開発した電解セルは、バッチ式のセルであるが、フローセルへの改良が必須である。これによって、連続分析、超微量分析、他の分析法との複合化が可能となるだけでなく、新たな電気化学的分離法に発展できると考えている。

4. 自己評価

本研究課題では、電気化学的な手法を利用して、タンパク質の絶対定量を実現することを最終目標としてきた。研究期間中では、このための電極の開発、薄層電解セルの製作を行い、絶対定量が実現可能であることを確認した。また、短いペプチドとはいえ、タンパク質の絶対定量を行うことができたことから、当初の目標には到達したと考えている。ただし、生物系の分野の研究者に汎用的に使用してもらうには、様々なタンパク質への実用、測定精度の向上、電解セルの耐久性の確認など、実際の使用に対する課題が多く残されている。これらに対して、さらに研究・改良を重ね、簡便且つ汎用的に使用される測定法へと確立していきたい。

5. 研究総括の見解

超微量タンパク質を電気化学的方法により絶対定量をする方法の開発を目的とした独創的な研究である。絶対定量法は一般には用いられる機会が少ないが、計測分析の基本であり、とくにタンパク質のように絶対定量が困難な物質に対して本計測法の開発は意義がある。

測定原理は水相｜有機相間をイオン性物質（タンパク質）を電気的に定量的移動させ、移動する電気量を測定する方法で、原理は単純であるが初めての装置であり各構成要素の開発が重要であった。本研究者は研究開始１年半後にライフイベントにより１年間の研究中断をしたので、装置開発に時間がかかったが、四級アンモニウムイオンをモデル化合物に選び測定原理の確認には成功している。ペンタペプチドを用いた絶対定量についても予備実験な

がら成功しており、本研究の方法がタンパク質の絶対定量法として利用できる可能性が示されたことは高く評価できる。現段階では試料量としては 100 pmol 必要であるが、さらに微量化も可能である。定量精度を上げるためには装置の構成要素の更なる改善が必要であり、今後の進展に期待したい。

6．主要な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

	1. Y.Yoshida, S. Yamaguchi, K. Maeda, Conducting Polymer-coated Electrode as a Reference/Counter Electrode in an Organic Phase and Its Application to a Two-electrode Type Thin-layer Cell for Voltammetry at the Liquid | Liquid Interface, *Anal. Sci.*, **26**, pp.137-139 (2010)

（2）特許出願

研究期間累積件数：1件 （出願中：非公開）

（3）その他（主要な学会発表、受賞、著作物等）

主要な学会発表

（国際）

- Y. YOSHIDA, S. YAMAGUCHI, and K. MAEDA, Conducting a polymer-coated electrode as a reference/counter electrode in an organic phase and its application to a two-electrode type thin-layer cell for voltammetry at the liquid | liquid interface, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Dec. 2010

- Y. YOSHIDA, Poly(3,4-Ethylenedioxithiophene)-ITO-Electrode as a Reference-Counter Electrode of Organic Phase in Voltammetry for the Ion Transfer at the Liquid/Liquid Interface, 42nd Heyrovský Discussion, Jun. 2009

（国内）

・中村祥太郎、吉田裕美、山口聡士、森田恭朗、前田耕治、水相と有機相を薄層にした 2 電極式液系界面電解セルの開発と絶対定量への応用、日本分析化学会第 59 年会、2010 年 9 月

・吉田裕美、山口聡士、中村祥太郎、前田耕治、導電性高分子被覆電極の参照電極および対極としての機能および薄層液液界面電解セルへの応用、第 71 回分析化学討論会、2010 年 9 月

・山口聡士、吉田裕美、中村祥太郎、前田耕治、水相と有機相を薄層にした液液界面電気化学セルの開発、日本分析化学会第 58 年会、2009 年 9 月

・吉田裕美、山口聡士、前田耕治、導電性高分子被覆電極の作製と薄層有機相｜水相界面イオン移動ボルタンメトリーへの応用、山口聡士、吉田裕美、前田耕治、2009 年 5 月

・吉田裕美、山口聡士、前田耕治、有機相中の参照電極および対極として適用可能な導電性高分子被覆電極の作成—薄層有機相｜水相界面イオン移動ボルタンメトリーへの応用—、電気化学会第 76 回大会、2009 年 3 月

（招待講演）

・吉田裕美、山口聡士、中村祥太郎、前田耕治、有機相中で参照電極および対極として機能する導電性高分子被覆電極、第 56 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会、2010 年 11 月

受賞

・Analytical Sciences　　Hot Article Award （2010 年 2 月）