博 士(理 学) 東海林 竜 也

学 位 論 文 題 名

Development of Novel Photon-Force-based Manipulation Techniques for Nanoparticles and their Mechanistic Studies by Microspectroscopies

(光圧を用いたナノ粒子の新規捕捉法の開発と顕微分光法による捕捉機構の解明)

学位論文内容の要旨

溶液中で拡散運動する生体分子、高分子や低分子化合物などを捕捉し、自在に操作する分子捕捉法は、今後期待される技術の一つである。その有力なアプローチの一つとして、「光子の力」(光圧、フォトンフォース)を利用した光ピンセット (図 1)があげられる。しかしながら、そのような分子系に光圧を適用した研究例は豊富とはいえず、分子捕捉法に対する明確な指針は未だ確立されていない。本研究では、光圧を用いた分子捕捉法の確立を目指し、その特徴や捕捉機構を分光学的手法により明らかにすることを目的とした。具体的には、(1) 集光レーザービームを用いた従来型の光ピンセットによる分子捕捉 (第 3, 4 章)および (2) 局在表面プラズモンの増強電場を利用したナノ粒子の光捕捉 (第5, 6章)について詳細な検討を行った。

<u>(i) 光ピンセットを用いたタンパク質・アミノ酸の分子捕捉 (第3章)</u>

ナノメートルサイズの粒子に働く光圧は粒径に大きく依存し、従来の光ピンセットを用いて半径 10 nm 以下の分子を捕捉することは困難であると予想される。実際に、単分子のニワトリ卵白リゾチーム (半径 ~ 2 nm)を、光捕捉することはできなかった。しかしながら、高濃度溶液中に光圧を作用させると微粒子が形成された。顕微ラマンスペクトルから、微粒子は光捕捉されたリゾチームの分子集合体であると同定した。これは、高濃度溶液中に自発的に形成したリゾチーム会合体が光捕捉されることで引き起こされると考えられる [1]。また、リゾチームよりもさらに小さなアミノ酸についても、溶液中で形成されたアミノ酸会合体が光捕捉されることを実証した [2]。以上の結果から、これまで捕捉が困難とされていた小さなタンパク質やアミノ酸を、分子会合体として光捕捉できることを初めて示した。さらに、創薬研究において重要なプロセスであるタンパク質の結晶化が分子捕捉によって促進されることを見出した。

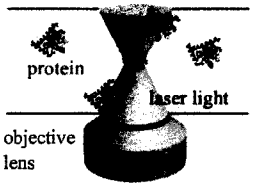

図 1 光ピンセットを用いた分子捕捉のイメージ図

<u>(ii) 共鳴効果によるヘムタンパク質 (シトクロム *c*, ミオグロビン)の分子捕捉 (第4章)</u>

ヘムタンパク質の一種であるシトクロム *c* およびミオグロビンは、リゾチームとほぼ同程度の分子半径であるが、分子会合体が溶液中に存在しなくとも単分子で光捕捉され、レーザー光の集光位置にヘムタンパク質の分子集合体が迅速に形成されることを発見した (図 2)。これは、ヘムタンパク質には極めて強い光圧が働くことを示しており、新規な光捕捉機構が示唆される。この捕捉機構を明らかにするため、ミオグロビン光捕捉の pD 依存性、励起光強度依存

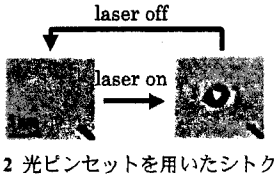

図 2 光ピンセットを用いたシトクロム c 分子捕捉の顕微鏡観察画像

性、およびアポミオグロビンの光捕捉実験等を詳細に行った。その結果、ヘムの存在がヘムタンパク質の分子捕捉に重要な役割を果たすことを見出した。すなわち、光捕捉に使用する近赤外光をヘムが共鳴吸収することにより (共鳴効果)、ヘムタンパク質単分子に効率よく光圧が作用すると考えられる [3,4]。本実験結果は、光共鳴効果を用いた分子捕捉を実験的に明瞭に示した初めての例である。この光捕捉は、従来の光ピンセットよりも効率的な分子捕捉法になると期待される。

(iii) 局在表面プラズモンを用いた量子ドット光捕捉 (第 5 章)

貴金属ナノ粒子間の"ナノギャップ"に発生する局在表面プラズモン (gap-mode LSP)では入射光の電場が 10^4~10^6 倍に増強される。この gap-mode LSP を用いると、従来の集光ビームを用いた光ピンセットによる光捕捉よりも、はるかに低い光強度でナノ粒子や生体分子を捕捉できると理論的に予想されているが、実証例はほとんどない。そこで、金ナノ粒子間の gap-mode LSP を用いて量子ドット (CdSe/ZnS)の光捕捉を試みた。顕微発光スペクトルで量子ドット捕捉の動的挙動を追跡した結果、量子ドットが従来の光ピンセットよりも遙かに弱い光強度で捕捉されることを実証した。gap-mode LSP 励起による量子ドットの光捕捉は、過去の報告例と比較すると、最小光強度かつ最小粒径の光捕捉に成功した例である (図 3)。さらに、gap-mode LSP を用いた量子ドット会合体の光捕捉から、本手法による量子ドットの捕捉機構を考察した。以上の結果から、gap-mode LSP を用いることにより従来型の光ピンセットでは困難だった低光強度による分子捕捉法の達成が期待される [5]。

(iv) 光共鳴条件下による局在表面プラズモンを用いた色素含有ナノ粒子の光捕捉 (第 6 章)

光共鳴効果 (第 4 章)と gap-mode LSP (第 5 章)を組み合わせることにより、より強い光圧がナノ粒子に作用する「プラズモン光共鳴捕捉」を試みた。具体的には、ポリスチレンナノ粒子に含有させる色素の種類を変えることで、非共鳴および共鳴条件下でのナノ粒子の gap-mode LSP を用いた光捕捉を試みた。まず非共鳴条件下での場合、捕捉されたナノ粒子数に対応する発光強度の増加度は僅かであった。一方、共鳴条件におけるナノ粒子の捕捉を試みた結果、発光強度の著しい増加が見られた。発光強度の励起光強度依存性および理論計算の結果などから、共鳴条件下では非共鳴条件下よりも、ナノ粒子がより効率的に光捕捉されることを見出した。以上の結果より、プラズモン光共鳴捕捉の実証にも初めて成功した。

結論として、高分子ビーズや生細胞などのマイクロメートルスケールの捕捉・操作法に利用されてきた光ピンセットは、タンパク質やさらに小さなアミノ酸分子の捕捉にも適用可能であることを実証した。また 光共鳴効果を利用することにより、タンパク質を効率的に光捕捉できることを明らかにした。さらに gap-mode LSP を利用することにより、従来の光ピンセットでは実現できない効率的なナノ粒子の光捕捉を達成した。以上の知見から、光圧を利用することにより、さらに精緻な分子捕捉法の実現が期待される。

[1] Tsuboi, Y.; Shoji, T.; Kitamura, N. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2007**, *46*, L1234. [2] Tsuboi, Y.; Shoji, T.; Kitamura, N. *J. Phys. Chem. C.* **2010**, *114*, 5589. [3] Tsuboi, Y.; Shoji, T.; Nishino, M.; Masuda, S.; Ishimori, K.; Kitamura, N. *Appl. Surf. Sci.* **2009**, *255*, 9906. [4] Shoji, T.; Kitamura, N.; Kudo, T.; Ishihara, H., Tsuboi, Y. *to be submitted.* [5] Tsuboi, Y.; Shoji, T.; Kitamura, N.; Takase, M.; Murakoshi, K.; Mizumoto, Y.; Ishihara, H. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2327.

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　喜多村　　昇
副　査　教　授　坂　口　和　靖
副　査　教　授　村　越　　敬
副　査　准教授　坪　井　泰　之

学位論文題名

Development of Novel Photon-Force-based Manipulation Techniques for Nanoparticles and their Mechanistic Studies by Microspectroscopies

(光圧を用いたナノ粒子の新規捕捉法の開発と顕微分光法による捕捉機構の解明)

溶液中で拡散運動する生体分子、高分子や低分子化合物などを捕捉し、自在に操作する分子捕捉法は、今後期待される技術の一つである。その有力なアプローチの一つとして光圧を利用した光ピンセット(図 1)があげられる。しかしながら、上記のような分子系に光圧を適用した研究例は豊富とはいえず、分子捕捉法に対する明確な指針は未だ確立されていない。そこで本研究では、光圧を用いた分子捕捉法の確立を目指し、その特徴や捕捉機構を分光学的手法により明らかにすることを目的とした。具体的には、(1) 集光レーザービームを用いた従来型の光ピンセットによる分子捕捉、および (2) 局在表面プラズモンの増強電場を利用したナノ粒子の光捕捉について詳細な研究を行い、成果を得た。

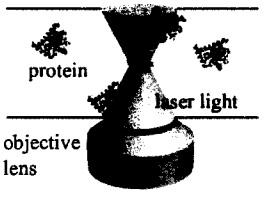

図 1 光ピンセットを用いた分子捕捉

(i) 光ピンセットを用いたタンパク質・アミノ酸の分子捕捉 (第 3 章)

ナノメートルサイズの粒子に働く光圧は粒径に大きく依存し、従来の光ピンセットを用いて半径 10 nm 以下の分子を捕捉することは困難であると予想される。実際に、単分子のニワトリ卵白リゾチーム (半径 ~ 2 nm)を光捕捉することはできなかった。しかしながら、リゾチームの高濃度溶液中に光圧を作用させると微粒子が形成された。顕微ラマンスペクトル測定から、微粒子は光捕捉されたリゾチームの分子集合体であると同定するとともに、溶液中に自発的に形成したリゾチーム会合体が光捕捉されることで微粒子形成が引き起こされることを結論した。また、アミノ酸類についても、溶液中で形成された会合体が光捕捉されることを明らかにした。さらに、リゾチーム集合体の光捕捉にともなって、その結晶化を促進できることも併せて実験的に明らかにした。

(ii) 共鳴効果によるヘムタンパク質の分子捕捉 (第4章)

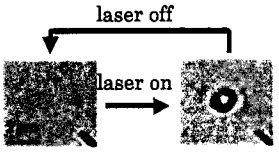

図2 光ピンセットを用いたシトクロム c 分子捕捉の顕微鏡観察画像

ヘムタンパク質の一種であるシトクロム c およびミオグロビンはリゾチームとほぼ同程度の分子半径を持つが、分子会合体が溶液中に存在しなくとも単分子で光捕捉され、レーザー光の集光位置にヘムタンパク質の分子集合体が迅速に形成されることを見出した(図 2)。この捕捉機構を明らかにするため、ミオグロビン光捕捉の pD 依存性、励起光強度依存性、およびアポミオグロビンの光捕捉実験等を詳細に行った。その結果、ヘムの存在がヘムタンパク質の分子捕捉に重要な役割を果たすことを明らかにした。すなわち、光捕捉に使用する近赤外光をヘムが共鳴吸収することにより(共鳴効果)、ヘムタンパク質単分子に効率よく光圧が作用することを実験的に示すことができた。本実験結果は、光共鳴効果を用いた分子捕捉を実験的に明瞭に示した初めての例である。

(iii) 局在表面プラズモンを用いた量子ドットの光捕捉 (第5章)

貴金属ナノ粒子間のナノギャップに発生する局在表面プラズモン(gap-mode LSP)では入射光の電場が 10^4~10^6 倍に増強される。この gap-mode LSP を用いることにより、従来の集光ビームを用いた光ピンセットによる光捕捉よりも、はるかに低い光強度でナノ粒子を捕捉できることを実験的に明らかにした。具体的には、金ナノ粒子間の gap-mode LSP を用いて 5 nm x 11 nm サイズの量子ドット(CdSe/ZnS)の光捕捉の動的挙動を顕微蛍光スペクトル測定により追跡した結果、量子ドットが従来の光ピンセットよりも遙かに弱い光強度で捕捉されることを見出した。さらに、gap-mode LSP を用いた量子ドット会合体の光捕捉に伴う蛍光強度変化の詳細な検討と解析に基づき、本手法による量子ドットの捕捉機構を解明した。

(iv) 光共鳴条件下による局在表面プラズモンを用いた色素含有ナノ粒子の光捕捉 (第6章)

光共鳴効果と gap-mode LSP を組み合わせることにより、より強い光圧がナノ粒子に作用する「プラズモン光共鳴捕捉」を試みた。その結果、試料のナノ高分子微粒子が励起光を吸収しない非共鳴条件の場合、捕捉されたナノ粒子数に対応する発光強度の増加度は僅かであったが、励起光を吸収する共鳴条件におけるナノ粒子の捕捉では発光強度の著しい増加が見られた。発光強度の励起光強度依存性および理論計算の結果などから、共鳴条件下では非共鳴条件下よりも、ナノ粒子がより効率的に光捕捉されることを明らかにし、プラズモン光共鳴捕捉法の開発に初めて成功した。

以上を要するに、光ピンセットはタンパク質やさらに小さなアミノ酸分子の捕捉にも適用可能であることを実験的に明らかにした。また 光共鳴効果を利用することにより、タンパク質を効率的に光捕捉できることを明らかにした。さらに gap-mode LSP を利用することにより、従来の光ピンセットでは実現できない効率的なナノ粒子の光捕捉を達成した。このように、本研究は様々なモードで光圧を利用することにより、精緻な分子捕捉法の実現へ大きな貢献を果たした。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。