

平成 23 年 4 月 10 日現在

機関番号：14603  
 研究種目：基盤研究（S）  
 研究期間：2006～2010  
 課題番号：18106002  
 研究課題名（和文） 集光レーザービームの光圧によるタンパク質の結晶化メカニズムと結晶配列制御の研究  
 研究課題名（英文） Photon pressure chemistry of crystallization and molecular arrangement control in crystals  
 研究代表者  
 増原 宏（MASUHARA HIROSHI）  
 奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・特任教授  
 研究者番号：60029551

研究成果の概要（和文）：本研究では、光圧研究の対象を従来のコロイド系からより小さな有機化合物の単一分子・クラスター系へと拡大し研究を進めてきた。その結果、世界で初めて光圧によるアミノ酸の結晶化に成功し、さらには結晶成長、結晶相、相分離を時空間的に制御できることを実験実証した。また、超分子タンパク質の結晶化並びに二次元ディスク形成にも成功し、これらすべての現象が気液界面と光圧とを効果的に統合した場合に誘起されたことから、界面の特性が種々現象の本質であるという重要な知見を得ることに成功した。本研究結果により、全く新しい光圧化学の研究分野が開かれるであろう。

研究成果の概要（英文）：We have developed a research on photon pressure by extending the research objects from microcolloids to single organic molecule or cluster in solution. As a result, we have for the first time succeeded in inducing crystallization of amino acids using photon pressure, and demonstrating the spatiotemporal control of crystal growth, polymorph, and phase separation. Furthermore, crystallization and disk-like assembling of supramolecular protein is also successfully achieved, and these all results provide new incite that features of surface or interface plays an important role for all phenomena. These results will open a new door for novel “Photon Pressure Chemistry” research.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	27,900,000	8,370,000	36,270,000
2007 年度	19,500,000	5,850,000	25,350,000
2008 年度	16,200,000	4,860,000	21,060,000
2009 年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
2010 年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
総計	85,800,000	25,740,000	111,540,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学、工学基礎・応用光学、量子光工学

キーワード：光圧、連続発振レーザー、結晶化、タンパク質、偏光

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに、集光連続発振レーザービームと溶液中の高分子、デンドリマー、コロイド、ナノ結晶など主にマイクロオーダーの対象物との相互作用により生じる光圧を、分子凝

縮系に対する新しい外部摂動ととらえ、その光学的、光物理化学的效果をミクロな単一ナノ粒子レベルで明らかにする研究を行ってきた。例えば、二光子蛍光励起を利用して、時々刻々とナノ粒子が光捕捉される様子

を一粒レベルで検出する手法を開発し、40 nm以下のポリスチレンナノ粒子が選択的に集光点に捕捉される特有の現象を見だし分光解析することに成功した。これら一連の結果は、光圧により捕捉された分子やクラスターが結晶核となり、溶液中で時空間制御的結晶化を誘起できること、さらには結晶成長のダイナミクスを追跡できることを強く示唆している。これらを踏まえ、我々はこれまで化学者が夢見てきた、光による時空間制御された結晶作製及び成長を、単一低分子・ナノ粒子レベルで解明、制御できる時代が到来してきたと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、光圧を種々有機化合物の溶液に作用させ、光圧捕捉結晶化を誘起する化合物を探索し、そのダイナミクスとメカニズムの解明を行うとともに、本技術を一般的な結晶化手法として提案することを目的とする。さらに、光圧による結晶内の分子配列制御、結晶相及びキラリティーの制御の実現を図り、新しい光圧化学の研究分野を切り拓く。

## 3. 研究の方法

光子が物質に散乱あるいは吸収されると、光子の運動量は変化し、物質に光圧という力学的作用を及ぼす。この力を利用すれば、小さな誘電体粒子を捕まえたり、動かしたりすることができる。この技術はこれまで光ピンセット技術として知られ、主にバイオサイエンス分野で細胞の操作技術として使われてきた。最近では目に見えないナノ粒子に適用され、興味深い現象の探索が進んでいるが、ナノ物質にとってはこの光圧捕捉力は大変弱く、有機低分子を完全に捕捉することは出来ない。

一方、タンパク質の構成物質であり $\alpha$ -アミノ酸は、その多くが中性溶液中で双性イオンとして存在し、その静電的相互作用により分子同士が微弱に結合した液状クラスターと呼ばれる大きな会合体を形成していることが知られている。このクラスターを光圧により捕捉することができれば、結晶化を誘起する事が可能ではないかと考えた。

具体的には捕捉用の連続発振近赤外レーザーを顕微鏡に導入し、サーモプレートを用いて十分に温度管理しながら、対物レンズを用いて目的化合物の溶液に集光する。レーザー照射による光捕捉と同時に誘起される溶液表面の変形が、本研究において大変重要であることを見出したため、EM-CCDカメラによる結晶化の直接観察と同時に、表面変位測定器を用い、液面の上下運動の追尾観測を行った。

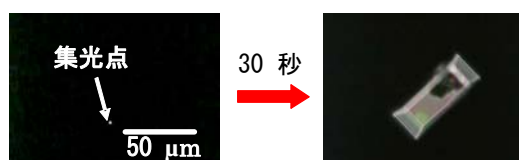
## 4. 研究成果

以下に主な研究結果を示す。

### ○光圧による分子結晶化に初めて成功

上述の研究手法により種々アミノ酸、塩化カリウム溶液を対象とした結晶化を行い、この5年間で多くの化合物において結晶化が可能であることを見出している。ここでは、その代表例であり、また世界最初の光圧による結晶化を実証したグリシンを例に挙げて言及する。

まず、試料としてグリシンの過飽和重水溶液を作製した。その溶液をガラス基板に滴下し溶液薄膜を作製した後、その気液海面にレーザーを集光した。レーザー照射数十秒後集光点より結晶化が誘起され、その結晶が集光点に捕捉されながら成長し、30秒後には50 $\mu$ m程度まで成長する様子が観察された。(下図)本結果は、有機化合物の過飽和溶液に光圧を作用させるだけで結晶化を実現した世界で初めての実証例であり、本現象をレーザー捕捉結晶化と名付けた。

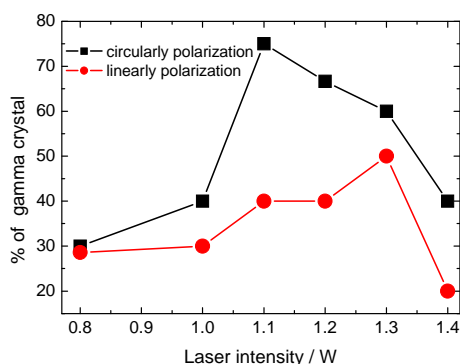


### ○光圧による結晶相制御に初めて成功

上述のように、我々は連続発振の近赤外レーザービームをグリシンの過飽和重水溶液に集光する事により、非接触且つ時空間制御しながらグリシンのレーザー捕捉結晶化に成功した。次に、光強度、偏光などレーザー照射条件または溶液の濃度を調節することにより、生成結晶の多形を制御することが可能であることを見出した。

実験には溶媒として重水、試料としてグリシンを用いた。濃度 3.6, 2.6 (飽和溶液は 2.6 M) の 2 種類のグリシンの重水溶液を調製し、その液滴を自作サンプル瓶に滴下し液膜を作製した。上述と同様、気液界面に連続発振Nd<sup>3+</sup>:YVO<sub>4</sub>(波長 1064 nm)の直線及び円偏光レーザービームをそれぞれ光強度 0.8-1.4 Wの間で調節しながら、開口数 0.90 の対物レンズにより集光した。作製した結晶の多形は赤外吸収スペクトルにより同定した。例として、濃度 2.6 Mグリシン飽和重水溶液を試料として用いた場合の結果について以下に示す。レーザー光強度 0.8 W (本実験での最小光強度) で液膜の気液界面に集光すると商社 30 分の間に 70%の確率で、レーザー光強度 1.0-1.4 Wでは 100%の確率で結晶化が観察された。このとき、すべてのサンプルにおいて集光点付近に 1 つの結晶のみが確認された。結晶化を確認後、僅かにサンプル瓶のキャップを緩め、3 時間室温にて静置し、生成した結晶を自然成長させた。その後結晶を取り出し、ATR法によるFT-IR測定を行った。その結

果、異なる 2 種類の IR スペクトルが得られ、またすべての結晶は必ずいずれかのスペクトルに帰属される事が分かった。この 2 種類の IR スペクトルは、既に報告されているグリシン結晶の  $\alpha$ 、 $\gamma$  形とそれぞれ一致していた。本濃度における  $\gamma$  相の生成確率に対するレーザー光強度、偏光依存性を下図に示す。



グリシンの自然蒸発法による結晶化では、速度論的支配によって進行する事が知られており、速度論的最安定相である  $\alpha$  形結晶のみが生成する。今回表から明らかなように、レーザー照射により自然蒸発では得られない  $\gamma$  相を誘起できることを見出した。さらに、その  $\gamma$  相の生成確率はレーザー光強度、偏光特性、サンプル濃度に強く依存することを見出し、最高 77% の確率で  $\gamma$  結晶を得ることに成功した。

結晶多形即ち結晶内の分子配列が異なると、融点、密度、溶媒への溶解度など様々な物理定数が異なるだけでなく、それらに起因した化学的、生物学的な特性も大きく異なる。よって、これまで有機結晶の多形制御法は、医薬品分野を始めとする種々分野において非常に重要な研究課題とされてきた。しかしながら、多形制御に関するいずれの既存研究も長時間の結晶化工程や時に強酸性条件などの極限条件を要し、もとより結晶化及び結晶多形を時空間的に制御することは不可能であった。本手法によって多形制御された結晶をシードとして使用することにより、求める特性を持つ結晶の大量生産も視野に入る。

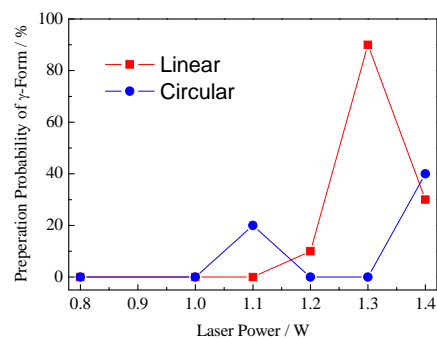
#### ○光圧による不飽和溶液からの結晶化に初めて成功

上述の結果は、溶液中のグリシクラスタを光圧により集光点に集め、分子の高濃度領域を時空間に制御しながら創成することにより実現されたものである。これらの結果から、通常では実現不可能な不飽和溶液からの結晶化誘起も、光圧を用いることにより可能となることを示唆している。そこで、グリシンの不飽和重水溶液に光圧を作用させることにより結晶化を誘起し、その結晶化挙

動を観察すると共に、生成した結晶相を同定した。

上述と同様、溶媒として重水を使用し、試料としてグリシンを用いた。二種類の濃度を有するグリシンの重水溶液 (68, 50%) を調製し、その液滴をサンプル瓶に滴下し液膜を作製した。実験手法は上述と同じである。

例として濃度 68% グリシン不飽和重水溶液の結果について以下に示す。レーザーを光強度 0.8 W-1.4 W で液膜の気液界面に集光すると、上述の過飽和溶液の場合と同様に集光点から結晶化が観察された。このとき、結晶化に要した時間はレーザー光強度に反比例し、また強度が低い場合には 30 分照射を行っても結晶化が見られない場合もあった。結晶化を確認した後、上述と同様に三時間室温にて静置し結晶を自然成長させた。ATR法による FT-IR 測定の結果から、 $\alpha$ 、 $\gamma$  形の異なる 2 種類の IR スペクトルが得られることが分かった。 $\gamma$  形の生成確率に対するレーザー光強度、偏光依存性を下図に示す。図から明らかなように、 $\gamma$  相の生成確率はレーザー光強度、偏光特性に強く依存しており、過飽和の時よりもさらに高い 90% の高い確率で  $\gamma$  形結晶を得られることが分かった。本現象は、結晶作製に必要な試料を低減することができることを示しており、特定の蛋白質など結晶化において非常に重要な意味を持つ。



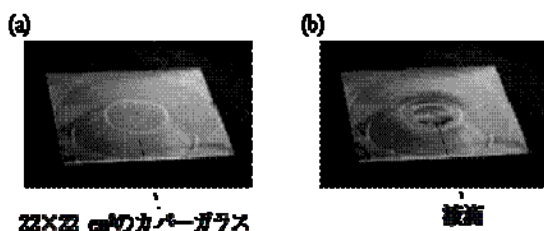
#### ○光圧によるミリメートルサイズの高濃度液滴形成と光圧特有の現象を可能とする界面の重要性

上述の現象は、レーザーを気液海面に集光したときに誘起された。本研究における集光点の位置は非常に重要な因子であり、実際集光点を基板・溶液間の固液界面に調節することにより、結晶化ではなく液-液相分離を経由した集光点よりも遥かに大きなミリメートルサイズの単一高濃度液滴が形成することを見出した。

上述と同様、試料としてグリシン過飽和重水溶液 (濃度: 23 wt%, 3.7 M, 過飽和度: 1.36) を使用した。その溶液を親水化処理したカバーガラスに滴下して液膜 (厚さ 100-160  $\mu\text{m}$ ) を作製し、溶媒の蒸発を抑制するために即座にシャーレを被せた。光源とし

て、近赤外連続発振Nd<sup>3+</sup>:YVO<sub>4</sub> レーザ(波長1064 nm)を使用し、60倍の対物レンズを用いて固液界面に集光した。レーザー光強度は、対物レンズ通過後 1.1 Wになるように調節した。液滴形成過程を、購入備品であるレーザー変位計を用いた液面高さ測定と、CCDカメラによるサンプルの直接観察により調べた。レーザー変位計は、市販の装置で非接触かつ高精度に物体の高さ・変位を測定できる装置である。

レーザー固液海面に照射すると、照射後すぐに温度上昇に起因した液面低下が観察された。その後もレーザーを照射し続けると、液面の高さは上昇に転じ、最終的に液滴の形成が観察された。さらにレーザーを照射すると液滴はどんどん成長していき、5分後には幅3.8 mm、高さ110・μmにまで成長した。レーザー照射前後のサンプルのデジタルカメラ写真を下図に示す。レーザー照射前の写真では、透明なグリシン重水溶液を通して、22×22 mm<sup>2</sup>のカバーガラスとその下に対物レンズのみを確認できる(a)。一方、300秒間のレーザー照射後には、カバーガラスの中心に直径5 mm程度の丸い液滴が形成しており(b)、実際目視でもはっきり確認することができる。この形成されたドメインは、溶質濃度が初期の約2倍に達しているにもかかわらず、結晶化が誘起されることなく非常に安定に存在することが分かった。このことから、生成した行動度液滴は液-液相分離によるものであり、グリシンの相分離現象は世界で初めて成功例である。



さらに、そのドメインの表面(気液界面)にレーザーを集光すると瞬時に結晶化が誘起されることを見出したが、これはドメインが結晶核形成の前駆体であることを示すもので、結晶化メカニズム解明への最も有望な鍵になると感じている。さらには、最近得られた超分子タンパク質の結晶化及び二次元ディスク形成の結果から、レーザー誘起の種々現象はすべて溶液の気液界面を光圧と効果的に統合した場合に誘起される現象であり、界面の特性が種々現象の本質であるという重要な知見を得た。以上の結果及び重要な知見を踏まえ、多くの分野の研究者が長年取り組み、未だ詳細に解明されていない有機化合物の結晶化のダイナミクスとメカニズムを、単一結晶を対象に実測しながら解析し考察できる時代が到来したと考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 75 件)

1. T. Sugiyama and H. Masuhara, (Laser-induced crystallization and crystal growth), Chemistry - An Asian Journal, in press (2011). (査読有)
2. H. Masuhara, T. Sugiyama, T. Rungsimanon, K. Yuyama, A. Miura, and J. -R. Tu, (Laser trapping assembling dynamics of molecules and proteins at surface and interface), Pure and Applied Chemistry, Vol. 83, No. 4, pp. 869-883 (2011). (査読有)
3. T. Rungsimanon, K. Yuyama, T. Sugiyama, and H. Masuhara, (Crystallization in unsaturated glycine/D<sub>2</sub>O solution achieved by irradiating a focused continuous wave near infrared laser), Crystal Growth & Design, Vol. 10, No. 11, pp. 4686-4688 (2010). (査読有)
4. K. Yuyama, T. Sugiyama, and H. Masuhara, (Millimeter-scale dense liquid droplet formation and crystallization in glycine solution induced by photon pressure), The Journal of Physical Chemistry Letters, Vol. 1, No. 9, pp. 1321-1325 (2010). (査読有)
5. T. Rungsimanon, K. Yuyama, T. Sugiyama, H. Masuhara, (他 2 名, 4 番目), (Control of crystal polymorph of glycine by photon pressure of a focused continuous wave near-infrared laser beam), The Journal of Physical Chemistry Letters, Vol. 1, No. 3, pp. 599-603 (2010). (査読有)
6. T. Sugiyama, T. Adachi, and H. Masuhara, (Crystal growth of glycine controlled by a focused CW near-infrared laser beam), Chemistry Letters, Vol. 38, No. 5, pp. 482-483 (2009). (査読有)
7. T. Sugiyama, T. Adachi, and H. Masuhara, (Crystallization of glycine by photon pressure of a focused CW laser beam), Chemistry Letters, Vol. 36, No. 12, pp. 1480-1481 (2007). (査読有)
8. Y. Tanaka, H. Yoshikawa, and H. Masuhara, Laser induced self-assembly of pseudoisocyanine J-aggregates, The Journal of Physical Chemistry C, Vol. 111, No. 50, pp.18457-18460 (2007). (査読有)
9. Y. Tanaka, H. Yoshikawa, T. Asahi, and H. Masuhara, (Laser microfixation of highly ordered J aggregates on a glass substrate), Applied Physics Letter, Vol. 91, No. 4, pp.041102\_1-041102\_3 (2007). (査読有)
10. Y. Nabetani, H. Yoshikawa, A. C. Grimsdale, K. Muellen, and H. Masuhara (Effects of

optical trapping and liquid surface deformation on the laser microdeposition of a polymer assembly in solution), Langmuir, Vol. 23, No. 12, pp. 6725-6729 (2007). (査読有)

(他 65 件)

[学会発表] (計 245 件)

1. H. Masuhara, T. Sugiyama, T. Rungsimanon, K. Yuyama, T. Uwada, and A. Miura, (Laser Trapping Crystallization Dynamics at Surface and Interface: Glycine and Nanoparticle Solutions) XXIII IUPAC Symposium on Photochemistry, July 14, 2010, Ferrara, Italy.
2. H. Masuhara and T. Sugiyama (Laser is Opening a New Horizon in Molecular Crystallization Studies) Third Asia Pacific Symposium on Radiation Chemistry (APSRC 2010) and DAE-BRNS Tenth Biennial Trombay Symposium on Radiation & Photochemistry (TSRP 2010), Sep. 16, 2010, Lonavala, India.
3. H. Masuhara, T. Sugiyama, K. Yuyama, T. Rungsimanon, T. Uwada, A. Miura (Spectroscopic and Imaging Study on Laser Trapping Dynamics and Crystallization of Amino Acids and Proteins in Solution) International Conference on Organic Nonlinear Optics, Beijing, China, Sep 24, 2009.
4. H. Masuhara, T. Sugiyama, K. Yuyama, T. Rungsimanon (Crystallization and Crystal Growth of Amino Acids in Solution by Photon Pressure of a Focused CW Near Infrared Laser Beam) ICP2009; XXIV International Conference on Photochemistry, Toledo, Spain, July 21, 2009.
5. H. Masuhara, T. Sugiyama, K. Yuyama, T. Rungsimanon (Novel Phenomena of Crystallization and Crystal Growth by Photon Pressure of a Focused CW Laser Beam) 237th ACS National Meeting, Salt Lake City, USA, Mar. 25, 2009.
6. T. Sugiyama and H. Masuhara (Crystallization and Crystal Growth of Glycine by Laser Trapping) The 5th Asian Photochemistry Conference, Peking, P. R. China, Nov. 4, 2008.
7. H. Masuhara, T. Sugiyama, H. Yoshikawa, Y. Nabetani, T. Adachi (Molecular Assembling and Crystallization in Solution by Photon Pressure of a Focused CW Laser Beam) SPIE Optics+Photonics, San Diego Convention Center, San Diego, California, USA, Aug. 11, 2008.
8. T. Sugiyama, T. Adachi, and H. Masuhara (A new crystallization phenomenon induced

by photon pressure of a focused CW laser beam) The 4th Asian Conference on Crystal Growth and Crystal Technology (CGCT-4), Sendai, Japan, May 23, 2008.

(他 237 件)

[図書] (計 6 件)

1. Nano Biophotonics, H. Masuhara, Y. Hosokawa, H. Y. Yoshikawa, K. Nakamura, Y. Sora, Y. Mori, Y. Jiang, I. Oh, T. Kaji, H. Mori, Y. Hiraki, A. Yamaguchi, and T. Asahi, Chapter 15, pp. 275-288, Elsevier (2007).
2. 光化学の驚異, 増原宏、伊都将司(編著), 講談社 (2006).
3. レーザープロセッシング応用便覧, 増原宏(編著), pp. 549-553, (有)エヌジーディー (2006).

(他 3 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 結晶生成方法および結晶成長制御方法

発明者: 杉山輝樹、増原宏

権利者: 杉山輝樹

種類: 特許

番号: 特願 2007-268993

出願年月日: 2007年 10月 16日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://mswebs.naist.jp/LABs/masuhara/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増原 宏 (MASUHARA HIROSHI)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・特任教授

研究者番号: 60029551

(2) 研究分担者

吉川 裕之 (YOSHIKAWA HIROYUKI) (H. 18)

大阪大学・大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻・助教

研究者番号: 00314378

杉山 輝樹 (SUGIYAMA TERUKI) (H. 20-22)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・特任准教授

研究者番号: 80397687

(3) 連携研究者

なし