

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K17922

研究課題名(和文) 光の力で分子を選り分け精製するプラズモニック分子分離・結晶化法の開発

研究課題名(英文) Development of molecular separation and crystallization techniques based on plasmonic optical tweezers

研究代表者

東海林 竜也 (Shoji, Tatsuya)

大阪市立大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：90701699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではプラズモンの電場増強効果による増強光圧を利用した分子分離・精製法の確立を目指し、以下の3つの成果を得た。(1)蛍光性J会合体およびH会合体が混在する水溶液をプラズモン構造体と接触させ、共鳴プラズモン光捕捉を試みたところ、J会合体が優先的に捕捉されることを発見した。(2)プラズモン光ピンセットにより捕捉した水溶性温度応答性高分子を用いることで、水溶液からプラズモン構造体上へと有機分子を分離することに成功した。(3)ナノニードルを有するケイ素結晶板を用いた新しい光マニピュレーション法を開発した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aim to develop novel molecular separation and crystallization techniques based on plasmonic optical tweezers. For the goal, we mainly demonstrated three intriguing results: (1) semi-selective optical trapping of fluorescent dye nano-aggregates, (2) plasmonic molecular extraction and detection based on plasmonic optical trapping of thermoresponsive polymers, and (3) development of nanostructured semiconductor-assisted optical trapping.

研究分野：分析化学

キーワード：光圧分析 光ピンセット 局在表面プラズモン 半導体ナノ構造 温度応答性高分子 分子抽出 顕微分光

### 1. 研究開始当初の背景

貴金属中の自由電子の“さざなみ”であるプラズモンは、入射した共鳴光の電磁場を著しく増強する。この効果を利用した表面増強ラマン散乱法に代表される表面増強分光法は、タンパク質や核酸などの生体分子を高感度に検出・同定し、定量化までも実現する手法として確立されている。そのような中、本研究では、プラズモンを用いた分離・精製法を世界に先駆けて実現する。本申請課題の骨子となる手法が、プラズモン光ピンセットである。

プラズモン光ピンセットは、光の力学作用である光圧をプラズモンの増強電場により増幅したナノ粒子を光捕捉する手法である。申請者らは、これまでにナノ粒子だけでなく合成高分子や生体高分子などのプラズモン光捕捉を実証することで、物理学の範疇に収まっていたプラズモン光ピンセットの化学への応用展開を目指してきた。

さらにこのようなプラズモン光ピンセットにより分子を捕集することで、局所空間での分子濃縮に伴う捕捉分子の結晶核生成をも誘起できることが期待できる。実際に、申請者らはこれまでに集光レーザービーム型光ピンセットによるタンパク質の結晶核誘起生成を実証しており (Y. Tsuboi, T. Shoji *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 46 (2007), L1234.)、プラズモン光ピンセットによる分子結晶化法への下地を整えつつある。

### 2. 研究の目的

以上のような研究背景のもと本申請では、プラズモン光ピンセットにより特定の光物性を有する分子を選択的に捕集し (分離)、貴金属ナノ構造体上で分子濃縮することにより結晶化を促進させる (精製)「プラズモンを用いた分離・精製法」の実現を目指し、以下に挙げる研究計画を立案した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 共鳴プラズモン光ピンセットに基づく選択的分子捕捉の実証

これまでに申請者らは、蛍光色素担持ポリスチレンナノ粒子を用いて共鳴プラズモン光ピンセットの端緒となる結果を得ているが (T. Shoji *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 51 (2012), 092001)、いまだ予備的段階である。本手法をより精緻に検証することで分子系に最適化させ、分子分離法に向けた土台を築き上げる。捕捉メカニズムを、顕微分光法 (蛍光、ラマン散乱、レイリー散乱など) および有限要素法による光圧の理論計算などを駆使し解明する。以上の結果から、混合溶液から特定の光物性を有する分子のみを選択的にプラズモン構造体上に捕集する分子分離を実証する。

#### (2) アミノ酸・タンパク質の誘起結晶化法の実証

集光レーザー型光ピンセットによる局所空間的な分子濃縮が、タンパク質の結晶核生成を誘起する可能性を掴んでいる (Y. Tsuboi, T. Shoji *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 46 (2007), L1234.)。本概念をプラズモン光ピンセットにより実証し、プラズモンを用いた分子精製法を確立する。増強光圧がサイズの大きな分子に強く作用する特長を活かし、本手法の適用範囲を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) プラズモン光ピンセットを用いた色素ナノ会合体の選択的光捕捉<sup>2</sup>

光圧は捕捉対象物の分極率、すなわちナノ粒子を構成する分子の配向に大きく依存するため、分子配向の差異によって選択的にナノ粒子を捕捉することが期待できる。そこで本研究では、分子配向の異なる2種類の色素ナノ会合体のプラズモン光捕捉の実証を試みた。

捕捉対象物の色素ナノ会合体として 5,5'-6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarbocyanine (JC-1)を用いた。JC-1は蛍光性のJ会合体を形成するが、ここに tetrakis(4-fluorophenyl)borate (TFPB)を添加すると、TFPBがJ会合体内にスタッキングすることで、会合体中のJC-1の分子配向が変化し、蛍光性のH会合体となる。この分子配向の異なるJ会合体とH会合体が混合する溶液を用いて、プラズモン光ピンセットによる選択的光捕捉を実施した。

プラズモンナノ構造体として、申請者らは金のナノピラミッドがガラス基板上に規則配列した金ナノピラミッドダイマーアレイ (AR-NSL 基板)を用いた。この金ナノ構造体は Angular-Resolved Nanosphere Lithography 法で作製でき、センチメートルオーダーの大面積でナノギャップを高密度に作製できる。共鳴波長は 700 ~ 1000 nm の近赤外域に示し、近赤外光を照射するとピラミッドの底部とナノギャップ間で最大で 10<sup>4</sup> 倍程度の増強電場が局在する。この基板を色素ナノ会合体水溶液と接し、808 nm の連続発振型レーザーによりプラズモンを励起させ、捕捉挙動を共焦点顕微蛍光分光法により追跡した。

図1にプラズモン光ピンセットによる選択的光捕捉の顕微蛍光スペクトルを示す。557 nm の蛍光極大波長がH会合体、600 nm がJ会合体の蛍光に帰属される。近赤外光を照射する前 (黒線) と照射中 (赤線) の蛍光スペクトルを比較すると、プラズモン励起とともに蛍光強度が増加した。なお、プラズモン励起に伴う蛍光増強効果は予備的実験により起こらないことが判明している。したがって、この蛍光強度の増加はプラズモン増強光

圧により溶液中に分散していた色素ナノ会合体がプラズモン構造体上に捕捉されたことを明瞭に示している。

さらに申請者らは、得られた蛍光スペクトルを分析することにより、J会合体とH会合体の捕捉された粒子数の比率を求めることに成功した。その結果、プラズモン光捕捉に伴い、J会合体が優先的に捕捉されることを明らかにした。

選択的J会合体は head-to-tail 型の分子配向 (end-to-end stacking) をとる一方、H会合体は side-by-side 型の分子配向 (plane-to-plane stacking) をとる。このような分子配向を考慮すると、J会合体の分極率はH会合体よりも大きくなると考えられる。同様の分極率の差異は、シアニン系色素会合体でも報告されており、それによるとJ会合体がH会合体よりも分極率はおよそ2倍大きいことが示されている。したがって、分極率のより大きなJ会合体がH会合体よりも強い光圧が作用するため、優先的にJ会合体が捕捉されたと考えられる。

以上のように分子配向の差異を利用することにより、準選択的にナノ粒子を捕捉することを実証した。今後、光共鳴効果を駆使することでより鮮明な選択光捕捉が実現できると期待できる。

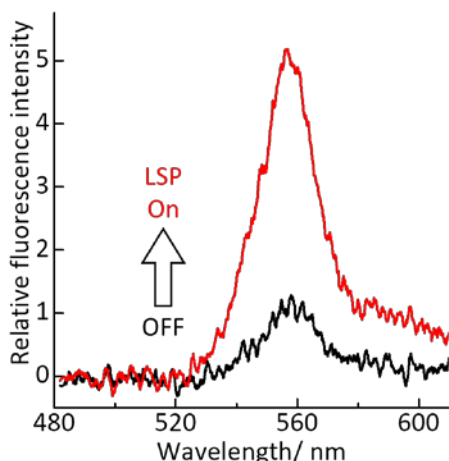


図1 プラズモン光捕捉によるJ会合体およびH会合体の顕微蛍光スペクトル

(2) プラズモン光ピンセットを用いた分子抽出・検出法の確立<sup>3</sup>

温度応答性高分子である poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) は室温付近では水に可溶であるが、ある温度 (曇点) 以上になると不溶となり、曇点以下に冷却すると再び溶解するという可逆的な特徴を有している。この PNIPAM を光捕捉すると、モザイク状の PNIPAM の分子集合体が形成される。さらにプラズモン励起を続けると、表面が均一な膜状の集合体に成長する。このように形成した分子集合体は光励起をやめると即座に溶液中へと溶解し、PNIPAM 分子集合体の形成と溶解は、プラズモン励起に鋭敏に応答する。このとき形成される PNIPAM 分子

集合体は、脱水和し相分離した状態で光捕捉される。申請者らは、この特異的な捕捉挙動を示す PNIPAM のプラズモン光ピンセットを用いることにより、水溶液中に微量に溶解した有機分子を高分子集合体中に抽出し、顕微分光学的手法と組み合わせて検出する新たな分析手法を開発した。

PNIPAM 水溶液に溶解させた rhodamine B ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L) の蛍光検出の結果を図2に示す。横軸に測定時間を、縦軸にプラズモン励起していないときの蛍光強度を1としたときの相対蛍光強度をプロットしている。プラズモン励起時間に伴い、相対蛍光強度は速やかに増加した。蛍光強度が10倍に至るまでに約3秒程度要した。しばらくすると蛍光強度は一定となり、プラズモン光ピンセットにより形成した PNIPAM 分子集合体中に抽出された rhodamine B の濃度が平衡に到達したと示唆される。プラズモン励起を停止すると、PNIPAM 分子集合体が溶解すると同時に、蛍光強度も元の強度まで減少した。このような蛍光挙動は、PNIPAM 分子集合体の有無に鋭敏に応答し、高い再現性を有している。申請者らは、この手法をプラズモニック分子抽出・分光検出法と名付けた。

この手法を最適化し、 $1.0 \times 10^{-9}$  mol/L という希薄濃度での rhodamine B の蛍光検出にも成功した。このような迅速な分子抽出・高感度な蛍光検出は、rhodamine B 以外の蛍光性色素 (acid red 88, crystal violet, pyrene) でも成功している。さらに、申請者らは本手法を顕微ラマン分光法と組み合わせることで海洋汚染物質として重要な *p*-クロロフェノールなどの非蛍光性有機分子の高感度ラマン検出にも成功しており、汎用性の高い手法になることが期待できる。本手法を発展させることで、増強光圧によって捕捉が困難な微小な分子や生体分子でも PNIPAM 分子集合体中で分子濃縮を達成し、誘起結晶核形成が期待できる。

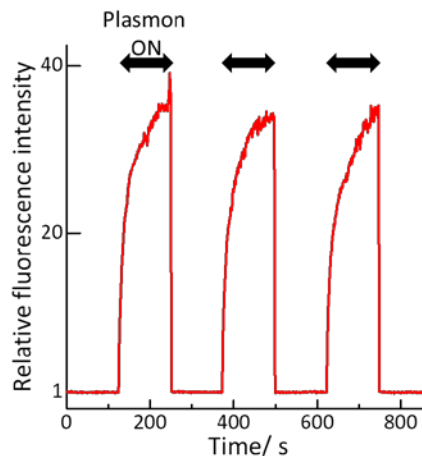


図2 プラズモン光ピンセットにより形成した PNIPAM 分子集合体へ抽出したローダミン B の蛍光強度の経時変化

(3) 半導体ナノ構造を用いた新奇光ピンセット法の開発<sup>3</sup>

(1)および(2)で示したように光捕捉は、分析化学に大きく貢献する手法であることがわかる。理想的には分子や生体分子も捕捉できれば新たな分析化学の応用展開も拓けると期待されるが、従来の集光レーザー型やプラズモン光ピンセットでも達成することは困難であることが明らかになりつつある。申請者らはこれまでの一連の研究から、集光レーザー型では光圧が足りなく、プラズモン光ピンセットでは光熱効果による光捕捉が阻害されることを明らかにした。そこで申請者は、このような熱により阻害されない新しい光ピンセットの開発に成功した。

新奇光ピンセットの開発に向けて、表面に無数のナノニードルを有する結晶性シリコン基板(ブラックシリコン)に注目した。ブラックシリコンは、太陽電池パネルの反射防止材として研究が進められており、光ピンセット機能はないと考えられてきた。このような中で申請者は、ブラックシリコン基板をポリスチレンナノ粒子分散水溶液に接し、近赤外光を照射すると、ナノ粒子が次々と光捕捉され、二次元的に粒子が基板上に配列することを明らかにした。温度に依存して蛍光強度が変化する色素分子を用いて、近赤外光照射に伴うブラックシリコンの温度上昇度を計測したところ、熱発生が無視できるほど小さいことも明らかにした。さらに照射面積を制御することにより、二次元粒子配列から一次元粒子配列への捕捉挙動のスイッチングも見出し、電磁場解析による電場増強効果も明らかにした。さらに捕捉粒子の運動解析から捕捉力を精密計測すると、プラズモン光ピンセットよりも10倍以上強い捕捉力を発揮することを明らかにした。現在、申請者らはこの次世代の光ピンセットを「Nano-Structured Semiconductor Assisted (NASSCA) 光ピンセット」と名付け、分子濃縮による結晶化作製法や、抽出・検出法など分析化学への応用展開を進めている。

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 9 件)

学術論文

1. "Optical tweezing and binding at high irradiation powers on black-Si"  
Tatsuya Shoji, Ayaka Mototsuji, Armandas Bal?ytis, Denver Linklater, Saulius Juodkazis, Yasuyuki Tsuboi,  
*Sci. Rep.*, Vol. 7, p. 12298 (9 ページ), 2017.  
2017 年 9 月 29 日付の化学工業日報(朝刊 4 面)、10 月 19 日付の日刊工業新聞にて紹介。  
2017 年 *Sci. Rep.* 誌の年間アクセスラン

キング Top100 (物理分野) に選出。

2. "Plasmonic optical trapping of nanometer-sized J- /H- dye aggregates as explored by fluorescence microscopy."  
Ayaka Mototsuji, Tatsuya Shoji, Yumi Wakisaka, Kei Murakoshi, Hiroshi Yao, Yasuyuki Tsuboi,  
*Opt. Exp.*, Vol. 25, p. 13617 - 13625, 2017.
3. "Highly Sensitive Detection of Organic Molecules on the Basis of a Poly(N-isopropylacrylamide) Microassembly Formed by Plasmonic Optical Trapping."  
Tatsuya Shoji, Daiki Sugo, Fumika Nagasawa, Kei Murakoshi, Noboru Kitamura, Yasuyuki Tsuboi  
*Anal. Chem.*, Vol. 89, p. 532 - 537, 2017.  
2017 年 日本光学会「2016 年 日本の光学研究」に選出。  
2017 年 日本分析化学会 第 77 回分析化学討論会「展望とトピックス」選出

総説・解説等

4. "プラズモン光ピンセットを用いた DNA マイクロパターニング.", 東海林 竜也, 坪井 泰之, オプトロニクス, Vol. 37, p. 132-137, 2018.
5. "ナノ物質を操作できるプラズモン光ピンセット.", 坪井 泰之, 東海林 竜也, 現代化学, Vol. 555, p. 50 - 54, 2017.
6. "プラズモン光ピンセットによる有機分子の濃縮・顕微分光分析法の開発.", 東海林 竜也, 坪井 泰之, 光学, Vol. 46, p. 224, 2017.
7. "プラズモンで駆動する光ピンセット: 分子マニピュレーションを目指して." 坪井 泰之, 東海林 竜也, 化学工業, Vol. 68, p. 18 - 25, 2017.
8. "プラズモン光ピンセットによるソフトマターの捕捉." 東海林 竜也, 坪井 泰之, 応用物理, Vol. 86, p. 45 - 49, 2017.
9. "温度応答性高分子のプラズモン光捕捉に基づく微量有機分子の抽出・分光検出の開発.", 東海林 竜也, 須郷 大毅, 坪井 泰之, 電気学会研究会資料. OQD, 光・量子デバイス研究会, Vol. 1, p. 25 - 30, 2016.

[学会発表] (計 19 件)

1. 東海林 竜也ら, 日本化学会 第 98 春季年会(2018) (平成 30 年 3 月 20-23 日) 於 日本大学 船橋キャンパス (千葉県船橋市), "液-液界面における量子ドット・金ナノ結晶の光捕捉の実証"
2. 東海林 竜也ら, 第 65 回応用物理学会春季学術講演会 (平成 30 年 3 月 17-20 日) 於 早稲田大学 西早稲田キャンパス (東京都新宿区), "油水界面における金ナノ

- 粒子および量子ドットの高効率光捕捉の実証”
3. (国内会議 招待講演)東海林 竜也, 電気学会 平成 28 年電子・情報・システム部門 技術委員会奨励賞 記念講演 (平成 29 年 9 月 29 日) 於 東京理科大学森戸記念館 (東京都新宿区), “温度応答性高分子のプラズモン光捕捉に基づく微量有機分子の抽出・分光検出法の開発”
  4. (国内会議 招待講演)東海林 竜也, 第 11 回平成夏季セミナー「～ぶんせき秘帖 巻ノ拾巻～」(平成 29 年 8 月 7-8 日) 於 東浦サンパーク (兵庫県淡路市), “光の『ちから』とその魅力”
  5. Tatsuya Shoji et al., The 28th International Conference on Photochemistry (ICP 2017) (July 16–21, 2017), Strasbourg (France), “Molecular Condensation and Highly Sensitive Detection of Organic Molecules based on a Thermo-responsive Polymer Micro-assembly formed by Plasmonic Optical Trapping”
  6. Tatsuya Shoji et al., 2017 Hsinchu Summer Course and Workshop (July 3-5, 2017) 新竹市 (台湾), “Plasmonic optical trapping of thermo-responsive polymer chains toward a molecular extraction and detection technique”
  7. 東海林 竜也ら, 第 77 回分析化学討論会 (平成 29 年 5 月 27-28 日) 於 龍谷大学深草キャンパス (京都府京都市), “温度応答性高分子のプラズモン光捕捉を利用した微量有機分子の高感度顕微分光分析”. (展望とトピックス選出)
  8. Tatsuya Shoji et al., 日本化学会第 97 春季年会(2017) (平成 29 年 3 月 16-19 日) 於 慶應義塾大学 日吉キャンパス (神奈川県横浜市), “Solid-Phase Extraction of Organic Molecules based on Plasmonic Optical Trapping of Poly(*N,N*-Diethylacrylamide)”
  9. Tatsuya Shoji et al., 9th Asian Photochemistry Conference (APC 2016) (December 4-8, 2016), Singapore (Singapore), "A Highly Sensitive Fluorescence Detection of Organic Molecules in a Micro-assembly of Thermo-responsive Polymers formed by Plasmonic Optical Tweezers."
  10. 東海林 竜也ら, 第 19 回高分子ミクロスフェア討論会 (平成 28 年 11 月 7-9 日) 於 千葉大学 西千葉キャンパス (千葉県), “プラズモン光ピンセットによるソフトナノマテリアルのマイクロパターンニング形成”
  11. (国際学会 招待講演) Tatsuya Shoji, The 12th Japan-Korea Symposium on Materials and Interfaces (November 2-5, 2016), 御殿場高原リゾート (静岡県), “Microspectroscopic detections of organic molecules extracted in a poly(*N*-isopropylacrylamide) micro-assembly formed by plasmonic optical tweezers”
  12. Tatsuya Shoji et al., OSJ - OSA Joint Symposia on Plasmonics and Digital Optics (October 30-31, 2016), 筑波大学 東京キャンパス文京校舎 (東京都), "An Alternative Technique for High-sensitive Molecular Detection based on Plasmonic Optical Trapping of Thermo-responsive Polymer Chains."
  13. 東海林 竜也ら, 第 77 回応用物理学会秋季学術講演会 (平成 28 年 9 月 13-16 日) 於 朱鷺メッセ (新潟県), “プラズモン光ピンセットを用いた蛍光性色素会合体の選択的捕捉の実現”
  14. Tatsuya Shoji et al., 2016 年光化学討論会 (平成 28 年 9 月 6-8 日) 於 東京大学 駒場第一キャンパス (東京都), "Fluorescence Lifetime Measurements of Cyanine Aggregates on Plasmonic Nanostructures by means of Fluorescence-lifetime Imaging Microscopy".
  15. Tatsuya Shoji et al., 12th International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments (SNCPPI6) (June 17-19, 2016), 立命館大学 びわこくさつキャンパス (滋賀県), "Raman Microspectroscopy for determining Polymer Concentration in an Optically Trapped Poly(*N*-isopropylacrylamide)."
  16. Tatsuya Shoji et al., 3rd Optical Manipulation Conference (May 18-20, 2016), パシフィコ横浜 (神奈川県), "Optical trapping of poly(*N*-isopropylacrylamide) with a near-infrared laser tweezing: Determination of polymer concentration in a polymer-rich domain."
  17. (国際学会 招待講演)Tatsuya Shoji, The 10th Asia-Pacific Laser Symposium (May 10-14, 2016), Jeju island (Korea), "Application of Plasmonic Optical Trapping of Thermo-responsive Polymer Chains for Molecular Extraction and Detection Techniques".
  18. 東海林 竜也ら, 第 76 回分析化学討論会 (平成 28 年 5 月 28-29 日) 於 岐阜大学 (岐阜県), “光捕捉した立体規則性ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)の顕微ラマン分光法による評価”, (展望とトピックス選出)
  19. 東海林 竜也ら, 平成 28 年度 日本分光学会年次講演会 (平成 28 年 5 月 24-26 日) 於 大阪大学 豊中キャンパス (大阪府), “光ピンセット共焦点顕微ラマン分光法を用いたポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)ポリマーリッチドメイン

## の高分子濃度の測定"

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：微小物の捕捉方法および微小物の捕捉装置

発明者：坪井 泰之・東海林 竜也

権利者：公立大学法人 大阪市立大学

種類：特願

番号：2017-179496

出願年月日：2017 年 9 月 19 日

国内外の別： 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/chem/advanachem/>

<http://tshoji.com/>

受賞

1. 東海林 竜也, 電気学会, 平成 28 年度  
電子・情報・システム部門研究会 技術  
委員会奨励賞, “温度応答性高分子のプ  
ラズモン光捕捉に基づく微量有機分子  
の抽出・分光検出法の開発”, 2017 年 9 月

6. 研究組織

(1)研究代表者

東海林 竜也 (TATSUYA, Shoji)

大阪市立大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：90701699