

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K05661

研究課題名(和文) 光の量子性を利用した単一微小液滴顕微分光装置の開発と生体分子ゆらぎへの適用

研究課題名(英文) Development of single-microdroplet microscope using quantum nature of light and its application to biomolecular fluctuation

研究代表者

迫田 憲治 (Sakota, Kenji)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：80346767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：単一微小液滴は微小な光共振器と見なすことができる。光共振器内で生じる光の増幅を利用することによって、液滴内部に溶存した分子の高感度検出が可能となる。本研究では、我々が開発した3次元イオントラップ・顕微分光装置を用いることで、既存の装置に比べて、微小液滴に溶存した分子を約80倍の感度で検出することに成功した。また、液滴に照射した励起光が示す励起光共鳴を幅広いサイズ領域で定量的に計測することに成功した。モデル生体膜研究の1つとして、液滴に気液界面に両親媒性色素を吸着させ、色素分子間のエネルギー移動を観測したところ、微小液滴では、バルク溶液と比べて効率的にエネルギー移動が生じていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、微小液滴のようなマイクロな空間で進行する化学反応は、より大きなスケール(バルク溶液)で進む化学反応とは、本質的な違いがあることが明らかになりつつある。バルク溶液では殆ど進行しない化学反応が、微小液滴では効率的に進行する例も報告されている。本研究によって、微小液滴に溶存した分子を高感度に検出することが可能となった。この方法を応用すれば、バルク溶液と微小液滴での化学反応機構の違いを明らかにできる可能性があり、将来的には、バルク溶液では合成することが困難な薬のような有用物質を微小液滴内で合成することが可能になるなど、創薬分野への波及効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：A single micro droplet can be regarded as a tiny optical resonator. By utilizing the amplification of the light generated in the optical resonator, it becomes possible to detect the molecule dissolved in the droplet with high sensitivity. In this study, we succeeded in the detection of the molecule dissolved in the droplet at about 80 times sensitivity in comparison with the previously-reported equipment by using a home-built three-dimensional ion trap and microscope. In addition, it succeeded in quantitatively measuring the excitation light resonance which the excitation light irradiated to the droplet shows in wide size region. As one of the model biomembrane research, we observed the energy transfer between amphiphilic molecules which were adsorbed on the air-liquid interface in the droplet. It was found that the energy transfer proceeds efficiently in the droplet in comparison with the bulk solution.

研究分野：光物理化学

キーワード：微小液滴 イオントラップ 両親媒性分子

1. 研究開始当初の背景

1905年にアインシュタインが光量子仮説を提出してから今日まで、光の量子性に関する理解とその応用は飛躍的に発展してきた。光の量子性を研究する量子光学はその裾野を大きく広げ、現代では基礎研究だけでなく、光の量子性を積極的に利用した応用研究(量子コンピューティング、量子暗号などの量子情報処理技術)も盛んに行われている。量子光学の発展を決定付けたマイルストーンの1つに挙げられるのがレーザー発振の実現である。レーザーは数々の理想的性質(指向性、単色性、高いエネルギー密度、超短パルス化など)をもつことから、光技術と分光学に革新的進歩をもたらした。

直径が数~数十 $\mu\text{m}$ の微小液滴の界面において、光の全反射条件が満たされると、微小液滴内で発生した蛍光は液滴内部に閉じ込められる。このとき、液滴の外周の長さが光の波長の整数倍に一致すると、液滴界面にwhispering gallery mode (WGM) と呼ばれる定在波が形成される。このように、微小液滴は極めて小さな光共振器としての機能をもっている。また、空間中に捕捉された単一微小液滴は、表面張力の働きによってほぼ完全な球体を形成するため、共振器の光閉じ込め能力を表わす Quality factor (Q 値) が極めて高くなる。よって、微小液滴内に溶存する分子を光ポンピングすると、極めて低いしきい値で、液滴界面近傍からのレーザー発振が観測される。また、バルク溶液に比べ、微小液滴内では分子の自然放出速度が速くなる現象 (Purcell 効果) が実際に観測されている (Arnold, J. Chem. Phys., **106**, 8280 (1997))。自然放出速度が速くなれば、励起確率も大きくなるので、単位時間当たりに観測される光子数も増大するはずである。即ち、微小液滴からの超低しきい値レーザー発振や Purcell 効果を利用することによって、これまでにない感度で液滴内部に溶存した分子を検出できる可能性がある。

2. 研究の目的

我々の研究グループでは、3次元イオントラップ技術を用いた単一微小液滴の空間捕捉に成功しており、これにレーザー顕微分光を適用することによって、溶存色素が nJ オーダーの超低しきい値でレーザー発振に至ることを確認している(図1)。つまり、微小液滴に分子を溶存させれば、極めて低濃度の溶存分子を高感度に検出できるということである。そこで本研究では、既存の装置を改良し、光検出系の更なる高感度化を達成することによって、微小液滴のようなマイクロな空間に溶存した分子(生体関連分子)の特異性を明らかにする。

3. 研究の方法

図2に本研究で製作した実験装置の概略図を示す。調整した溶液をシリンジに充填し、シリンジポンプ (YMC, YSP-101) にセットした。シリンジポンプを用いて  $0.7\text{--}1.0\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$  の速さで溶液を送液した。溶液は先端を斜めにカットしたゲージ管 (27 G) に送られる。ゲージ管に  $3600\text{--}4000\ \text{V}$  の DC 電圧を印加することでエレクトロスプレーイオン化 (ESI) を行い、帯電微小液滴を生成した。ESIによって生じた帯電微小液滴をケージキューブ内に設置したエンドキャップトラップで空間捕捉した。エンドキャップトラップの外側の電極は接地させた。また、ファンクションジェネレーター (TEXIO, FGX-2005) で生成した正弦波を高速アンプ (Matsusada, HEOPS-5B6) で  $1800\text{--}3600\ \text{Hz}$ ,  $900\text{--}1250\ \text{Vpp}$  に増幅し、中心電極に印可した。トラップの下部に設置している電極に  $1\text{--}4\ \text{V}$  の DC 電圧を印加することで重力による液滴の振動を取り除き、単一微小液滴を長時間にわたり安定に空間捕捉した。励起光源の半導体 CW レーザー (Thorlabs, LDM56 / M+LDC205C+TED200C,  $532\ \text{nm}$ ) はシングルモードファイバーに通して円形ビーム (TEM<sub>00</sub> モード) にした。バンドパスフィルターと ND フィルターを通過後、偏光板と  $1/2\lambda$  波長板を通し、アクロマティックレンズ (Thorlabs, AC254-080-A) を用いて縦偏光の励起光を空間捕捉した液滴全体に集光した。励起光強度は ND フィルターを用いて調節し、フォトダイオードパワーセンサ (Thorlabs, S121C,  $400\text{--}1100\ \text{nm}$ ,  $500\ \text{mW}$ ) に照射して測定した。量子ドットからの蛍光は対物レンズ (渋谷光学, LDJ100X, N.A.  $0.8 < \text{W.D. } 2\ \text{mm}$ ) をもちいて捕集した。捕集した光は偏光無依存性ビームスプリッター (Thorlabs, CCM5-BS016/M) を用いて均等に分割し、片方はロングパスフィルターを通過後、イメージング測定用冷却 CCD カメラ

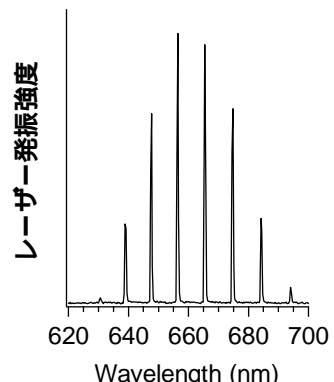


図 1. 微小液滴に溶存した色素分子(ローダミン B)からのレーザー発振スペクトル

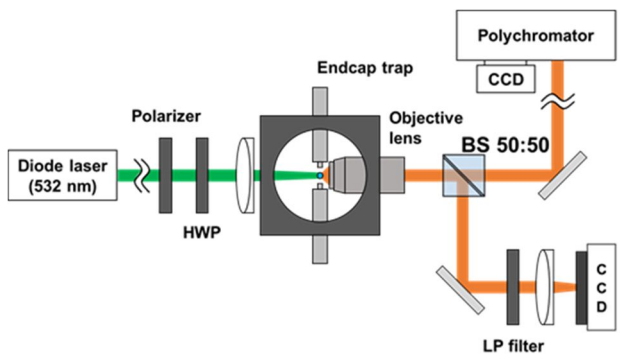


図 2. 本研究で製作した装置の概略図

(BITRAN, BU-61M) に結像した。もう一方は、ダイクロイックミラーとアクロマティックレンズ、およびロングパスフィルターを通過後、冷却 CCD 付分光器（堀場製作所, iHR 550+Symphony）に集光した。分光器のスリットは  $48 \mu\text{m}$ 、回折格子は  $150 \text{ g mm}^{-1}$ 、中心波長は  $650 \text{ nm}$  である。以上の装置により、蛍光画像と蛍光スペクトルを同時に測定した。対物レンズの焦点方向は、蛍光画像において液滴のフチからの蛍光と液滴中心からの蛍光の両方ともにピントが合うように調節した。得られた蛍光スペクトルは Ne ランプの発光線を用いて波長校正を行った。蛍光画像は測定終了直後に撮影したベース画像から引き算することでバックグラウンドの影響を取り除いた。

#### 4. 研究成果

##### 光検出系の高感度化

我々の研究グループでは、帯電した単一微小液滴を空間捕捉するために平行平板型イオントラップを用いてきた。平行平板型イオントラップは、極めてシンプルな電極構造をもちながらも、十分な深さのトラップポテンシャルを形成できる（つまり、液滴を安定に捕捉できる）。しかしながら、平行平板型イオントラップは、電極構造の制約から、液滴から放出される蛍光を捕集するための対物レンズを液滴の近傍に設置できないという弱点を抱えていた。そこで我々は、原子のレーザー冷却や原子時計の構築用に開発された「エンドキャップトラップ」に注目した（図 3）。エンドキャップトラップは、トラップを構成する電極の周りに遮蔽物が存在しないため、液滴のごく近傍に対物レンズを設置することが可能である。自作したエンドキャップトラップを顕微分光系に導入することによって、従来の装置と比べて、約 80 倍の光検出感度の向上に成功した。今回開発した装置を用いると、従来と比較して弱い励起光強度でも十分な S/N 比をもったスペクトルを短時間で測定できるようになった。これにより、同一の微小液滴からのスペクトルを短い時間間隔で長時間にわたり測定できるようになった。

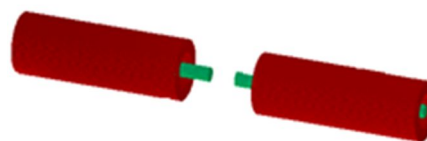


図 3. 自作したエンドキャップトラップの模式図

##### 励起光共鳴の定量計測

ローダミン B (RhB) が溶存した微小液滴からの蛍光スペクトルを連続測定し、各蛍光スペクトルに観測される共鳴発光線（whispering gallery mode: WGM）を解析することによって、各蛍光スペクトルを与える液滴の直径を精密に決定した。また、液滴に溶存した RhB からの蛍光が、ある特定のサイズにおいて著しく増大することを見出した。液滴からの蛍光強度が増大するサイズパラメータの位置と Mie 理論が予測する液滴の共鳴モードのサイズパラメータの位置がよく一致した。このことから、液滴からの蛍光強度の増大は、溶媒の蒸発によって液滴がある特定の直径になったとき、液滴内部に励起光が閉じ込められ、液滴内部の実効的な励起光強度が増大するためであると結論した。励起光共鳴という現象自体は、すでに知られている現象であるが、過去の報告では、装置の感度不足によって、共鳴強度を定量的に評価することは出来ていなかった。本研究で製作した実験装置を用いることで、液滴の幅広いサイズ領域にわたって、共鳴強度を定量的に評価することに成功した。

##### 生体膜モデルとしての微小液滴において観測される励起エネルギー移動

本研究では、モデル生体膜研究の第一歩として、両親媒性をもったカルボシアニン分子の 1 つである DiIC を用いて実験を行った。DiIC は、親水性のシアニン色素と疎水性のアルキル鎖からなる両親媒性分子である。実際の実験では、共役鎖長が異なる DiIC 3 と DiIC 5 を用いた。この 2 つは、共役鎖長が異なるが異なるため、吸収波長と蛍光波長がそれぞれ異なる。また、DiIC 3 の蛍光と DiIC 5 の吸収に重なりがあるため、DiIC 3 から DiIC 5 への励起エネルギー移動が起こると考えられる。本研究では、微小液滴の気液界面に吸着した DiIC のエネルギー移動を観測し、バルク溶液中における実験結果と比較した。

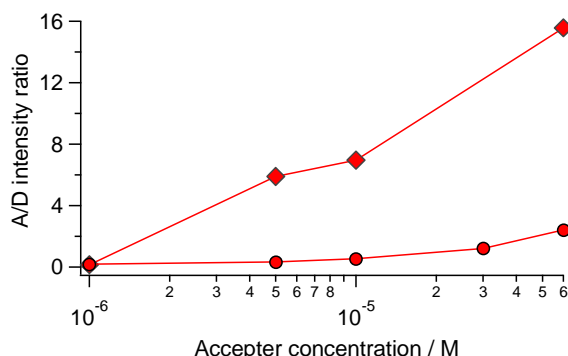


図 4. DiIC 3 から DiIC 5 への励起エネルギー移動効率。四角が微小液滴，丸がバルクの結果。

その結果、バルク溶液中と比べ、微小液滴中では、13 倍ほど効率的に励起エネルギー移動が生じていることを明らかにした（図 4）。この原因として考えられるのが、Leung and Young によって理論的に提唱されている cavity-assisted energy transfer (CAET) である。CAET では、微小液滴がもつ共鳴モードを介して長距離のエネルギー移動が可能となるため、フェルスター機構でエネルギー移動が生じるバルク溶液よりも効率的に励起エネルギーが移動したものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 T. Okamoto, T. Nakamura, R. Kihara, T. Asahi, K. Sakota, T. Yatsunami	4. 巻 19
2. 論文標題 Synthesis of Bare Iron Nanoparticles from Ferrocene Hexane Solution by Femtosecond Laser Pulses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemPhysChem	6. 最初と最後の頁 2480-2485
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cphc.201800436	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitsuhiko Miyazaki, Ayumi Naito, Takamasa Ikeda, Johanna Klyne, Kenji Sakota, Hiroshi Sekiya, Otto Dopfer, Masaaki Fujii	4. 巻 20
2. 論文標題 Real-time observation of the photoionization-induced water rearrangement dynamics in the 5-hydroxyindole-water cluster by time-resolved IR spectroscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Phys. Chem. Chem. Phys.	6. 最初と最後の頁 3079-3091
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C7CP06127G	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takamasa Ikeda, Kenji Sakota, Hiroshi Sekiya	4. 巻 120
2. 論文標題 Elevation of the Energy Threshold for Isomerization of 5-Hydroxyindole-(tert-butyl alcohol)1 Cluster Cations	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Phys. Chem. A	6. 最初と最後の頁 5809-5816
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpca.7b05434	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計24件（うち招待講演 9件/うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Kenji Sakota
2. 発表標題 Fluorescence enhancement caused by the excitation light confinement in a single microdroplet
3. 学会等名 Manchester International Symposium: Highly-excited States and Non-covalent Interactions（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Sakota
2. 発表標題 The cavity mode dependent confinement of excitation light in a single levitated microdroplet
3. 学会等名 The 23th East Asian Workshop on Chemical Dynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Sakota
2. 発表標題 A single droplet microscopy for highly sensitive fluorescence detection
3. 学会等名 WRHI International Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Sakota
2. 発表標題 Microscopy of a single levitated microdroplet for biomolecular applications
3. 学会等名 13th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野元哉, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 単一微小液滴で生じる励起光の閉じ込めに起因した蛍光増強とその液滴径依存性
3. 学会等名 第13回分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口昌起, 佐野元哉, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 平行平板型イオントラップとエンドキャップトラップの性能比較
3. 学会等名 第13回分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Noguchi, Motoya Sano, Tomoyuki Yatsunami, Kenji Sakota
2. 発表標題 Performance comparison with a parallel plate iontrap and an endcap iontrap
3. 学会等名 International Workshop on Quantum Sensing & Biophotonics 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunsuke Yamamoto, Hiroyuki Miyake, Tomoyuki Yatsunami, Kenji Sakota
2. 発表標題 J-aggregate formation of amphiphilic cyanine dyes in alcohol-water mixed solutions
3. 学会等名 34th Symposium on Chemical Kinetics and Dynamics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本駿介, 三宅弘之, 津田明彦, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 メタノール/水混合溶液中における両親媒性シアニン色素のファイバー状J会合体形成
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本駿介, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 両親媒性シアニン色素の繊維状J会合体形成に関する分光学的研究
3. 学会等名 第99回日本化学会春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Sakota
2. 発表標題 Laser spectroscopy of a single levitated microdroplet ~Lasing and resonance energy transfer~
3. 学会等名 International Symposium on "Diversity of Chemical Reaction Dynamics" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 迫田憲治
2. 発表標題 単一微小液滴の顕微分光とバルク溶液中におけるキラルJ会合体の研究
3. 学会等名 第40回溶液化学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安富翔太, 佐野元哉, 山本駿介, 大谷拓也, 関谷博, ハッ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 空間捕捉した単一微小液滴のレーザー顕微分光
3. 学会等名 第11回分子科学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大谷拓也, 三宅弘之, ハツ橋知幸, 迫田憲治
2. 発表標題 両親媒性シアニン色素のキラルJ会合体形成における混合溶媒の組成比依存性
3. 学会等名 第40回溶液化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nobuaki Nakashima, Tomoyuki Yatsunami, Kenji Sakota, Izumi Iwakura, Keiichi Yokoyama
2. 発表標題 Laser chemistry for Eu recovery
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 迫田憲治
2. 発表標題 生体膜研究への応用を目指した単一微小液滴のレーザー顕微分光
3. 学会等名 研究会「分子を使った寄木細工」～自己組織化したソフトマテリアルが織りなす「かたち」と機能～（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kenji Sakota
2. 発表標題 Laser Microscopy on Biomolecules Dissolved in a Levitated Single Microdroplet
3. 学会等名 20th East Asia Workshop on Chemical Dynamics（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2016年



1. 発表者名 安富翔太, 迫田憲治
2. 発表標題 空間捕捉した単一微小液滴表面に構築した生体膜のレーザー顕微分光
3. 学会等名 第10回分子科学討論会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 米山可凜, 関谷博, 迫田憲治
2. 発表標題 ヒドロキシプロピルセルロースの構造転移に対するホフマイスターアニオンおよびポリエチレングリコールの複合効果
3. 学会等名 第10回分子科学討論会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大内仁, 関谷博, 迫田憲治
2. 発表標題 リボスクレアゼAの安定性に対する電解質と分子混み合いの複合効果
3. 学会等名 第10回分子科学討論会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 安富翔太, 迫田憲治
2. 発表標題 空間捕捉した単一微小液滴の表面に構築した単分子膜のレーザー顕微分光
3. 学会等名 第39回溶液化学シンポジウム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 迫田憲治
2. 発表標題 分光測定から見た分子科学 - 真空中から細胞模倣環境まで -
3. 学会等名 第17回大つくば物理化学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Shota Yasutomi, Kenji Sakota, Hiroshi Sekiya
2. 発表標題 The Influence of Molecular-weight Specific Adsorption of Polyethylene Glycol on Two-state Transition of Myoglobin
3. 学会等名 Recent Progress in Molecular Spectroscopy and Dynamics (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大谷拓也, 迫田憲治
2. 発表標題 空間捕捉した単一微小液滴表面におけるシアニン色素のレーザー顕微分光
3. 学会等名 日本化学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----