

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：82636

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22750013

研究課題名（和文）蛋白質分子の折り畳み過程解明へ向けた単一分子光子統計・実時間測定法の開発

研究課題名（英文）Development of techniques for single-molecule photon statistics and real-time measurements toward elucidation of folding processes in protein molecules

研究代表者

梶 貴博（KAJI TAKAHIRO）

独立行政法人 情報通信研究機構・未来 ICT 研究所 ナノ ICT 研究室・研究員

研究者番号：40573134

研究成果の概要（和文）：可視光領域における低バックグラウンド発光の 2 次元フォトニック結晶の作製とその上での単一分子の蛍光増強の観測に成功した。また、2 次元フォトニックバンドギャップの利用により、蛍光色素の配向に依存した蛍光寿命の大きな変化を見出した。本研究の結果、単一生体分子の局所的な分光に利用可能なナノ空間を有するフォトニック結晶を用いることで高感度な単一分子蛍光測定が可能になることを示すと同時に、蛍光標識の配向を蛍光寿命の変化から解析する新たな道筋を示した。

研究成果の概要（英文）：We succeeded in preparing two-dimensional photonic crystal slabs that have low background emission in visible light region and observing fluorescence enhancement of single molecules on the photonic crystals. In addition, we found that the fluorescence lifetime varies greatly depending on the orientation of the fluorescent dye using a two-dimensional photonic band gap. From the results, we showed a new way to increase the sensitivity of single-molecule fluorescence spectroscopy as well as to determine the orientation of the fluorescent dye by analyzing change in the fluorescence lifetime using photonic crystals that have nanospaces needed for local spectroscopic measurements of single biomolecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：蛋白質、生物物理、1 分子計測(SMD)、共焦点顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

蛋白質は生命機能の発現において最も重要な役割を果たす分子のひとつであり、その構造変化や折り畳み過程の解明は生命科学における重要な研究課題である。従来、蛋白質の動的過程についての情報を得るため、分

子集団に対する測定が行われてきた。しかし、このような測定で得られる情報は、多数の分子の平均値であり、個々の分子の情報は失われていた。そのような中、近年になって発達してきた高感度な蛍光測定手法を用いることで、蛍光色素でラベルした単一の蛋白質分

子の構造変化の解析が行われるようになってきている。一方、これまでの生体分子を対象とした単一分子蛍光測定では、蛍光イメージングなどによる分子の位置に関する情報の取得が主であった。そのため、単一の蛋白質分子の高感度かつ詳細な構造変化の解析や、平衡・非平衡状態におけるナノ秒からサブミリ秒のかけての広い時間スケールでの動的過程の解析に向けての新しい技術開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

単一の蛋白質分子について、平衡・非平衡状態の解析を行うためには、ナノ構造空間中に単一の蛋白質を取り込ませること、分子を効率よく光励起してかつ蛍光を効率よく取り出すこと、外部からの光などの刺激により折り畳みの開始などを誘導することが重要になる。そのような光の高度制御や高効率な光利用を実現できるナノ空間を有する媒体として、我々は、誘電体の周期的な繰り返し構造であるナノフォトニック構造（フォトニック結晶）に着目した。しかし、従来のナノフォトニック構造はバックグラウンド発光が大きく、微弱な単一分子の蛍光信号がバックグラウンド発光に埋もれてしまうという問題があった。また、蛋白質分子の構造変化を解析するにあたり、従来の蛍光イメージングによる放射ダイポールの方向の解析や偏光を用いた解析では、色素の配向を高い精度で高い時間分解能で知ることが容易でなかった。本研究ではこのような課題の解決のため、研究を進めた。

## 3. 研究の方法

蛋白質に用いられる蛍光ラベル色素として、可視光領域に発光波長をもつものが主に使用される。そのため、ナノフォトニック構造の材料として、紫外・可視光領域で透明かつ2程度の高い屈折率をもつ五酸化タンタルや可視光領域で透明かつ2.4程度の高い屈折率をもつ二酸化チタンを用いた。電子ビーム蒸着により、ガラスや石英基板、シリコン基板上にこれらの薄膜を形成し、電子ビームリソグラフィやドライエッチングによる微細加工プロセスにより、最小で200 nm程度の繰り返し構造を有するナノフォトニック構造を作製した。その後、酸素雰囲気下で熱アニリングを行った。作製した基板の上に、極低濃度の蛍光色素（ペリレンビスイミド誘導体）とポリマーを含む溶液をスピコートした。488 nmもしくは532 nmのピコ秒レーザーを開口数0.90の顕微鏡対物レンズにより照射し、蛍光を時間相関単一光子計数モジュールに接続した光電子増倍管により検出した。

## 4. 研究成果

図1にカバーガラス上に作製した五酸化タンタルフォトニック結晶の模式図とバックグラウンド発光のレーザー強度依存性を示す。レーザー強度によらず、五酸化タンタルフォトニック結晶基板のバックグラウンド発光強度はカバーガラスと同程度であり、酸素雰囲気下での熱アニリングにより、バックグラウンド発光が大幅に低下することが分かった（〔雑誌論文〕④）。これにより、単一分子の蛍光測定に利用可能な低バックグラウンド発光のフォトニック結晶の作製に成功した。

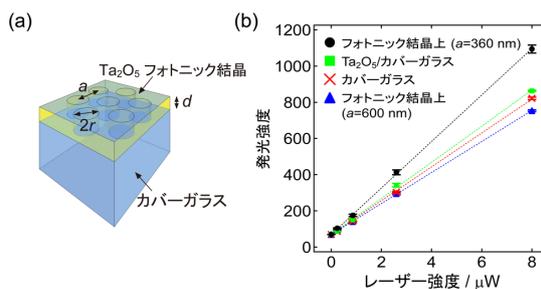


図1 五酸化タンタルフォトニック結晶の模式図(a)と各種基板のバックグラウンド発光のレーザー強度依存性(b)

次にフォトニック結晶基板を用いることで単一分子の高感度な蛍光検出が可能であることを示すための実験を行った。石英基板上の五酸化タンタル薄膜を加工して作製したフォトニック結晶上にペリレンビスイミド誘導体を極低濃度でスピコートした基板を共焦点走査蛍光顕微鏡により測定した。図2(a)はフォトニック結晶なしの領域、図2(c)はフォトニック結晶上の領域を示す。単一分子に対応する蛍光のスポットが複数個観測された。これらの蛍光スポット上で蛍光強度の時間変化を測定した代表的な結果を図2(b, d)に示している。蛍光強度の一段階での低下は単一分子の光退色によるものである。フォトニック結晶上では、単一分子の蛍光強度が平均で3倍以上増加することが明らかになった（〔雑誌論文〕③）。蛍光増加のメカニズムについて考察するため、時間領域差分法による電磁場シミュレーションによりフォトニックバンド構造の計算を行った（図2(e)）。その結果、フォトニック結晶と励起光の共鳴による励起光強度の増加、ならびにフォトニック結晶と蛍光の共鳴による蛍光の取り出し効率の向上という2つの機構により蛍光強度の増加が起こっていると考えられた。この結果は、フォトニック結晶の効果により単一分子の蛍光強度の増加が観測された初めての研究例であるといえ、単一蛋白質分子の高感度蛍光測定の実現のために重要な結果であるといえる。

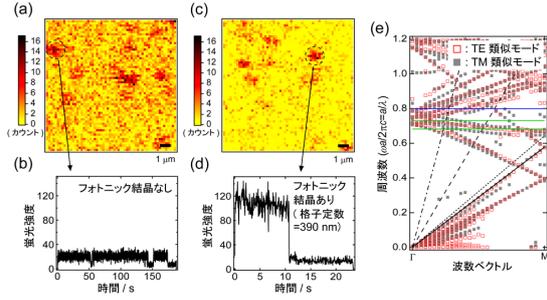


図 2 フォトニック結晶外の領域 (a, b) とフォトニック結晶上の領域 (c, d) における走査蛍光顕微鏡画像 (a, c) と単一分子の蛍光強度の時間変化 (b, d)、フォトニックバンド構造 (e)

さらに、より高度な光制御を行えるフォトニック結晶の作製を行った。シリコン基板上に形成した二酸化チタンの薄膜を微細加工し、その後下部のシリコン基板をウエットエッチングで除去することでエアブリッジ構造のフォトニック結晶を作製した。計算したフォトニックバンド構造から、特定の方向（横電場方向）の光についてフォトニックバンドギャップ（光が存在できない周波数領域）を有することが分かった。このようなフォトニック結晶上に同様に単一分子を載せて蛍光測定を行った。図 3(a) にエアブリッジ部位の共焦点蛍光顕微鏡画像と模式図を示している。図 3(a-g) にフォトニック結晶なしの領域 (b-d) とフォトニック結晶上の領域 (e-g) で測定した単一分子の蛍光挙動の代表的な結果を示している。蛍光強度の一段階での低下 (図 3(b, e)) とコインシデンスヒストグラムの時間原点での頻度の低下 (図

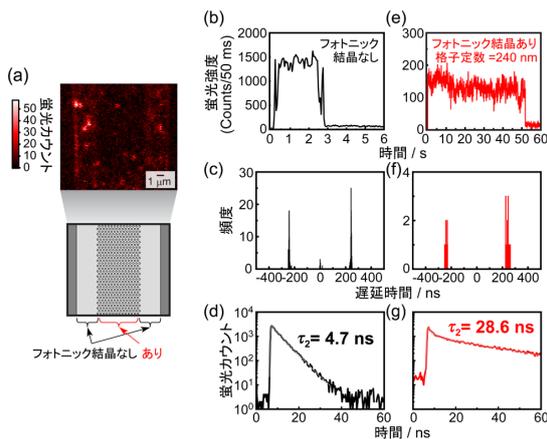


図 3 エアブリッジフォトニック結晶の走査蛍光顕微鏡画像 (a) とフォトニック結晶なしの領域 (b-d) およびフォトニック結晶上の領域 (e-g) で観測された単一分子の蛍光強度の時間変化 (b, e)、コインシデンスヒストグラム (c, f)、蛍光減衰曲線 (d, g) の代表的な結果

3(c, f) は、単一分子からの蛍光信号の検出を裏付けるものである。一方、フォトニック結晶なしの場合の蛍光寿命がペリレンビスイミド誘導体の通常平均寿命に近い 5 ns 程度であったのに対し (図 3(d))、フォトニック結晶上の領域では、最大で 28.6 ns (5.5 倍) まで長寿命化した分子が観測された (図 3(g)) ([雑誌論文] ①)。フォトニックバンドギャップの効果によりこのような単一分子の大幅な長寿命化が観測されたのは世界で初めてのことである。

このような蛍光寿命の長寿命化のメカニズムを考察するため、各方向の放射双極子をフォトニック結晶表面に配置して、発光速度の計算を行った (図 4)。その結果、平面の方向の放射双極子 (x 双極子) が、フォトニック結晶スラブの中心面に配置した場合に輻射速度が大幅に低下することが明らかになった (図 4(b))。一方、垂直方向の放射双極子は、いずれの位置に配置した場合にも輻射速度の大幅な低下が起らないことが分かった。本手法は、蛍光ラベルした単一の蛋白質分子をフォトニック結晶の空孔内部に固定することで、蛍光色素の蛍光寿命の変化から蛋白質の構造変化を高い時間分解能で検出する新しい手法になると期待できる。

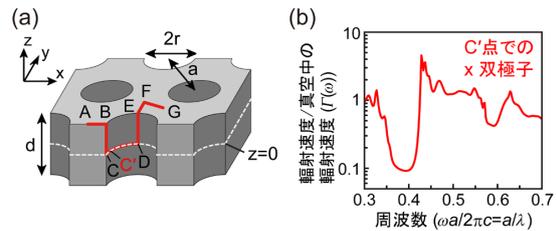


図 4 発光速度の計算において放射双極子を配置した位置 A-G (a) と C' 位置における x 放射双極子の発光速度の計算結果 (b)

## 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 5 件)

- ① Takahiro Kaji, Toshiki Yamada, Syoji Ito, Hiroshi Miyasaka, Rieko Ueda, Shin-ichiro Inoue, Akira Otomo, Controlled spontaneous emission of single molecules in a two-dimensional photonic band gap, Journal of the American Chemical Society, 査読有、Vol. 135, 2013, pp. 106-109, DOI: 10.1021/ja3115357
- ② Toshiki Yamada, Yoshihiro Haruyama, Katsuyuki Kasai, Toshifumi Terui, Shukichi Tanaka, Takahiro Kaji, Hiroshi Kikuchi, Akira Otomo,

Orientation of a bacteriorhodopsin thin film deposited by dip coating technique and its chiral SHG as studied by SHG interference technique, Chemical Physics Letters, 査読有、Vol.530、2012、pp.113-119、DOI: 10.1016/j.cplett.2012.01.063

- ③ Takahiro Kaji, Toshiki Yamada, Rieko Ueda, Akira Otomo, Enhanced fluorescence emission from single molecules on a two-dimensional photonic crystal slab with low background emission, The Journal of Physical Chemistry Letters, 査読有、Vol.2、2011、pp. 1651-1656、DOI: 10.1021/jz2006989
- ④ Takahiro Kaji, Toshiki Yamada, Rieko Ueda, Xingsheng Xu, Akira Otomo, Fabrication of two-dimensional Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> photonic crystal slabs with ultra-low background emission toward highly sensitive fluorescence spectroscopy, Optics Express, 査読有、Vol. 19、2011、pp. 1422-1428、DOI: 10.1364/OE.19.001422
- ⑤ 山田俊樹、梶 貴博、上田里永子、大友 明、新規な顕微鏡集光ユニット及び時間相関単一光子計数系の開発と応用—様々な周囲環境下及び電磁場環境下における単一分子分光—、信学技報(社団法人電子情報通信学会)、査読無、Vol.111、No.4、2011、pp.31-36、<http://iss.ndl.go.jp/books/R000000004-I11069494-00>

[学会発表] (計 14 件)

- ① 梶 貴博、山田俊樹、伊都将司、宮坂 博、上田里永子、井上振一郎、大友 明、単一分子の発光制御を実現する2次元フォトニック結晶プラットフォームの開発、2013年第60回応用物理学会春季学術講演会、神奈川工科大学、神奈川県、2013年3月27日～30日
- ② 梶 貴博、山田俊樹、上田里永子、井上振一郎、大友 明、2次元フォトニックバンドギャップ中の単一分子蛍光挙動の統計的解析、日本化学会第93春季年会(2013)、立命館大学 びわこ・くさつキャンパス、滋賀県、2013年3月22日～25日
- ③ Takahiro Kaji, Toshiki Yamada, Syoji Ito, Hiroshi Miyasaka, Rieko Ueda, Shin-ichiro Inoue, Akira Otomo, Control of spontaneous emission from single molecules in a photonic band gap of a two-dimensional photonic

crystal slab, Seventh International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE7)、Fukuoka International Congress Center、Fukuoka, Japan、(March 17-19, 2013)

- ④ Takahiro Kaji, Toshiki Yamada, Rieko Ueda, Shin-ichiro Inoue, Akira Otomo, Photonic crystals for enhancing fluorescence from single molecules, 10th International Conference on Nano-Molecular Electronics (ICNME)、Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Hyogo, Japan、(December 12-14, 2012)
- ⑤ 梶 貴博、山田俊樹、伊都将司、宮坂 博、上田里永子、井上振一郎、大友 明、2次元フォトニックバンドギャップによる単一分子の自然放出抑制、2012年光化学討論会、東京工業大学 大岡山キャンパス、東京都、2012年9月12～14日
- ⑥ 梶 貴博、山田俊樹、井上振一郎、上田里永子、大友 明、2次元フォトニック結晶スラブ上の単一分子の発光挙動、日本化学会第92春季年会(2012)、慶應義塾大学 日吉キャンパス・矢上キャンパス、神奈川県、2012年3月25日～28日
- ⑦ 梶 貴博、山田俊樹、井上振一郎、上田里永子、大友 明、2次元フォトニック結晶スラブを用いた高感度な単一分子蛍光測定、2012年春季第59回応用物理学関係連合講演会、早稲田大学 早稲田キャンパス、東京都、2012年3月15日～18日
- ⑧ 梶 貴博、山田俊樹、井上振一郎、上田里永子、大友 明、低バックグラウンド発光の2次元フォトニック結晶スラブを用いた単一分子の発光制御、2011年光化学討論会、宮崎市河畔コンベンションエリア、宮崎県、2011年9月6日～8日
- ⑨ Takahiro Kaji, Toshiki Yamada, Rieko Ueda, Akira Otomo, Fabrication and characterization of a two-dimensional photonic crystal slab with low background emission for enhancing fluorescence emission from single molecules, XXV International Conference on Photochemistry (ICP2011)、Beijing Friendship Hotel、Beijing, China、(August 7-12, 2011)
- ⑩ 梶 貴博、山田俊樹、上田里永子、大友 明、超低バックグラウンド発光の2次元フォトニック結晶を用いたペリレンビスイミドの蛍光増強、日本化学会第91春季年会(2011)、神奈川大学、神奈川県、2011年3月26日～29日
- ⑪ 梶 貴博、山田俊樹、上田里永子、大友 明、高感度蛍光顕微鏡法実現に向けた2次元

Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> フォトニック結晶の作製、2011年  
春季第 58 回応用物理学関係連合講演会、  
神奈川工科大学、神奈川県、2011 年 3  
月 24 日～27 日

- ⑫ Takahiro Kaji、Toshiki Yamada、Rieko  
Ueda、Akira Otomo、Enhancement of dye  
fluorescence using two-dimensional  
Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> photonic crystal slabs with  
ultra-low background emission、Sixth  
International Conference on Molecular  
Electronics and Bioelectronics  
(M&BE6)、Sendai International Center、  
Miyagi、Japan、(March 16-18, 2011)
- ⑬ Takahiro Kaji、Toshiki Yamada、Rieko  
Ueda、Akira Otomo、Fabrication of low  
background two-dimensional Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>  
photonic crystals for observing  
fluorescence enhancement of organic  
dyes、9th International Conference on  
Nano-Molecular Electronics、  
International Conference Center Kobe、  
Kobe、hyogo、Japan、(December 14-16,  
2010)
- ⑭ 梶 貴博、上田里永子、山田俊樹、大友 明、  
2次元フォトニック結晶上に吸着した色  
素分子の発光挙動、2010年光化学討論会、  
千葉大学、千葉県、2010年9月8日～10  
日

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：フォトニック結晶

発明者：梶 貴博、山田俊樹、大友 明

権利者：同上

種類：特許

番号：特許 2 0 1 1 - 0 4 6 5 8 6

出願年月日：2 0 1 1 年 3 月 3 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

[http://www2.nict.go.jp/advanced\\_ict/nano/103/index.html](http://www2.nict.go.jp/advanced_ict/nano/103/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梶 貴博 (KAJI TAKAHIRO)

独立行政法人 情報通信研究機構・未来 ICT  
研究所 ナノ ICT 研究室・研究員

研究者番号：40573134

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：