

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656006

研究課題名(和文)フェムト秒レーザーによる有機電気・光学結晶の飛躍的高品質化

研究課題名(英文)Development of femtosecond laser techniques for the production of high-quality single crystals of organic materials

研究代表者

吉川 洋史 (YOSHIKAWA, Hiroshi)

埼玉大学・理工学研究科・助教

研究者番号：50551173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、有機材料の高品質結晶作製法の創製を目指し、フェムト秒レーザーを用いた結晶化(核発生および結晶成長)制御法の開発を行った。核発生においては、ゲル-溶液界面近傍でレーザー誘起キャビテーションバブルを発生させることで、低過飽和条件で核発生を誘起できる可能性を見出した。また、フェムト秒レーザーアブレーションによる種結晶作製法を開発し、多結晶や損傷のある結晶から、正常な単結晶を得ることが可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：New techniques for the control of crystal nucleation and crystal growth by using a femtosecond laser has been developed. Nucleation can be efficiently induced by regulating laser-induced cavitation bubbles near gel-solution interfaces. In addition, high-quality single crystal seeds can be produced by femtosecond laser ablation of cracked crystals or polycrystals.

研究分野：結晶工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎、応用物性・結晶工学

キーワード：結晶工学 結晶成長 応用光学・量子光学 表面・界面物性

## 1. 研究開始当初の背景

結晶化は、有機・無機材料を問わず、精製や構造解析など化学・工学分野において非常に重要なプロセスである。近年では有機単結晶そのものをデバイスとして応用する例も報告されている。例えば、有機 $\pi$ 電子系材料の結晶は、共役 $\pi$ 電子に起因する高速応答性や優れた電気光学特性を有することから、次世代電気・光学デバイス素子への応用が期待されている。このようなデバイス応用の場合、結晶品質が電気・光学特性に大きな影響を与えるため、有機材料の高品質結晶の作製技術が求められている。一般的に、高品質な単結晶を溶液から得る場合には、低過飽和の条件で少数の結晶核を発生させ、ゆっくり結晶成長させることが重要である。しかし、低過飽和条件では核発生の確率が低く、高効率に結晶核を得ることが難しい。そこで、能動的に外部から“刺激”を与え、低過飽和溶液から結晶核を得る手法として、フェムト秒レーザーによる結晶核発生活法が、2003年に大阪大学の森(連携研究者)らによって報告されている。彼らはこれまでに水溶性タンパク質をはじめ、結晶化が非常に困難な膜タンパク質のような複雑な分子構造をもつタンパク質においても高品質な結晶作製に成功し、X線による生体分子の立体構造の解明に応用してきた。近年研究代表者らは、これら生体材料におけるフェムト秒レーザー誘起結晶核発生メカニズムを詳細に調べてきた。その結果、集光点で発生するキャビテーションバブルが核発生のメイントリガーの一つとなっていることを明らかにした。キャビテーションバブルの発生は全ての溶液中で誘起できる普遍的な物理現象であり、これは本手法が溶液からの結晶成長に基づく様々な有機材料に応用可能であることを示唆している。しかし、実際にどのようなレーザー照射条件が有機材料の高品質結晶の作製へと繋がるかについては未知な部分が多く、結晶化メカニズムに基づいた技術の更なる向上が必要であった。

## 2. 研究の目的

先に述べたように、有機材料のデバイス応用やX線構造解析では、高品質な単結晶の作製が重要である。そのためにはまず、結晶の高品質化をもたらす低過飽和条件での高効率結晶核発生条件の決定が必要である。また、核発生後には多結晶化や損傷が発生する可能性があるため、結晶成長の制御も必要である。そこで本研究では、①核発生及び②結晶成長の2つの結晶化プロセスにおいて、有機材料の高品質単結晶作製に必要なレーザー照射条件を探求することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 高効率結晶核発生を誘導するフェムト秒レーザー照射条件の探索

既に上記で述べたように、フェムト秒レ

ザーによる結晶核発生活法では、キャビテーションバブルが核発生メカニズムに関わっていることが示唆されている。レーザー照射により発生したキャビテーションバブルは膨張収縮を繰り返しながら崩壊する。この時、溶液と接する固体や気体の界面があると、キャビテーションバブルの膨張収縮挙動は大きく影響を受けることが知られており、核発生に対してどのような影響として現れるかは非常に興味深い。そこで、アガロースを用いて溶液-ゲル界面を作製し、その界面にレーザー照射することで有機分子の核発生の場所や確率などがどのような影響をうけるのかを調べた。

(2) フェムト秒レーザーアブレーションによる単結晶種作製法の開発

種結晶法は、結晶の大型化や高品質化を目的としてよく行われる手法の一つである。しかし、脆く不安定な有機結晶の場合には、切削機械によるダイシングやスクライビングなどの硬材の一般的な加工手段を用いることができないことが多い。一方で、シリコンなど無機結晶のようなインチレベルの大型単結晶とは異なり、マイクロメートルサイズの結晶しか得られないケースも多々あるため、高い加工精度が必要である。そこで本研究では、フェムト秒レーザーアブレーションを用いた有機結晶の種結晶作製法の開発を行った。サンプルとしては、有機結晶の中でも特に加工が難しいタンパク質結晶を選択し、高品質単結晶作製に必要なレーザー照射条件(光強度、パルス数など)の検討やX線による結晶品質評価を行った。

## 4. 研究成果

(1) 高効率結晶核発生を誘導するフェムト秒レーザー照射条件の探索

図1に有機低分子としてパラセタモールを用いた時の結果について示す。パラセタモール125 mg/mlの過飽和水溶液と1.0 wt%アガロースゲルによるゲル-溶液界面近傍に、フェムト秒レーザー(波長800 nm, パルス時間幅200 fs, エネルギー20  $\mu$ J, 1 kHz)を集光照射し、EMCCD(PhotonMax 512, Roper)で観察した。その結果、レーザー集光点近傍から結晶化が誘起された。結晶は、レーザー集光点近傍の界面を中心として、溶液側及びゲル側に放射状に成長した。興味深いことに、ゲル界面から十分に遠い( $\sim$ 1 cm)溶液中に集光照射した場合は、結晶化が誘起できなかった。これはゲル-溶液界面へのレーザー照射が、従来までの溶液中照射に比べて、より高い核発生促進効果を保持していることを示唆している。実際他の有機材料を用いた場合でも、溶液中照射よりも高効率で核発生が誘起できる条件が存在することを発見した。

ゲル-溶液界面で起こる結晶化現象のメカニズムを探るため、高速度カメラ(1 $\times$ 10<sup>6</sup> frame/s, HPV-1, Shimadzu)を用いてゲル-

溶液界面でのキャビテーションバブルを系統的に観察した。その結果、核発生が促進されたレーザー照射条件では、キャビテーションバブルが界面から溶液側へと遠ざかりながら崩壊することがわかった。キャビテーションバブルが崩壊する際その中心で局所的に高温状態が生成することが知られている。一般に熱の発生は核発生を抑制する方向に働くが、ゲル-溶液界面の場合には、キャビテーションが崩壊時に界面から遠ざかることで、膨張・収縮に伴う力学的な刺激が効率的に核発生に作用したのではないかと考えられる。一方、溶液中の場合は、キャビテーションバブルの膨張・収縮・崩壊が集光点を中心として同じ場所で起こるため、ゲル-溶液界面が存在する場合に比べて核発生の効果が弱まったのではないかと考えられる。

以上の結果より、ゲル-溶液界面を用いてキャビテーションバブルの挙動を制御することで、より高効率に核発生を誘起できる可能性を見出した。このようなゲルを溶液との界面に使う手法は、水だけでなく様々な有機溶媒を溶媒として使うことも可能であるため、種々の有機材料の結晶化促進に応用できると考えられる。現在我々は、様々なゲルや溶媒を用いて、より効率的に有機材料の結晶核発生を誘起できる条件を探索している。

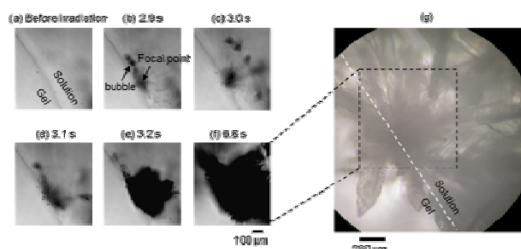


図1:ゲル-溶液界面からの有機材料のフェムト秒レーザー誘起結晶化。発表論文[3]から許可を得て転載。Copyright (2013) American Chemical Society.

## (2) フェムト秒レーザーアブレーションによる種結晶作製法の開発

図2に試料としてニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) を用いた場合の結果について示す。自発的核発生が起きない過飽和度の溶液中にある HEWL 結晶に対してフェムト秒レーザーを単発集光照射したところ、照射数時間後に液中に新たな結晶が観察された。レーザー照射によって発生する結晶数はレーザーエネルギーやパルス数にともない増加した。生成した結晶の結晶性を評価するために、X線回折を測定したところ、単結晶由来の明確なX線回折パターンを示した。また、同一溶液条件で育成した単結晶と比較しても、分解能、モザイシティなどで同等のクオリティを示し、レーザーによる結晶品質の劣化は検出されなかった。さらに、このような新たな結晶は、結晶のレーザーアブレーションしきい値以上でのレーザー照射によってのみ出現することがわかった。

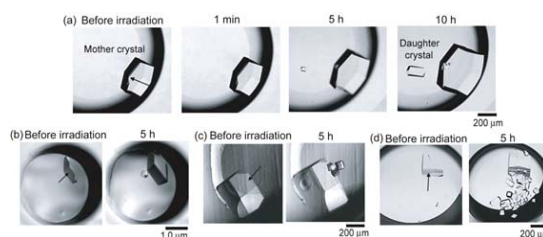


図2:フェムト秒レーザーアブレーションによる種結晶作製。(a)(b)は異なる結晶面をアブレーションしきい値でレーザー照射、(c)(d)はそれぞれ高強度でレーザー照射した。発表論文[4]から許可を得て転載。Copyright (2012) American Chemical Society.

研究代表者である吉川は、これまでに有機非線形光学結晶である尿素結晶に対しても同様の現象を発見しており、フェムト秒レーザーアブレーションにより液中に飛散した結晶片が種結晶となり成長することを見出している (Yoshikawa et al., Cryst. Growth Des., 2006)。一般に、しきい値近傍でのフェムト秒レーザーアブレーションでは、光力学的メカニズムが支配的になることが知られている。光力学的アブレーションでは、物質は力学的に破断されるため、噴出物が熱の影響により分子状に分解することなく大きな塊のまま飛び出さる。もし噴出物の結晶性が保持されている場合、過飽和溶液中では種結晶として働く。実際、フェムト秒レーザーを照射した HEWL 結晶表面を原子間力顕微鏡にて液中観察したところ、アブレーションしきい値強度でのレーザー照射により、回折限界程度の2ミクロンの微小穴が生成していることが明らかとなった (図3 a)。また高強度照射時には、結晶表面にクラックも観察された (図3 b)。これは HEWL 結晶が力学的な衝撃を受けたことを示しており、タンパク質結晶のフェムト秒レーザーアブレーションにおいても光力学的メカニズムが支配的であることを示唆している。また、HEWLの熱変性温度が約60°Cであることから、フェムト秒レーザーにより熱の影響を抑えたアブレーションが実現されていることがわかる。このような非熱的なアブレーションにより、微小タンパク質結晶片にダメージを与えることなく単離することで、損傷結晶から単結晶成長へと誘導することができる。

本種結晶手法の特徴としては、まず育成溶液を開封せず密閉環境で行えることがある。我々は、HEWLだけでなく、膜タンパク質であるAcrBの多結晶にフェムト秒レーザーを照射し、新たな単結晶成長を誘起することにも成功した。膜タンパク質は含水率が高く非常に脆いばかりか、タンパク質分子が界面活性剤との混合ミセル状態で存在するため、環境変化に対して極めて繊細であることが知られている。しかし、フェムト秒レーザーを用いることで、不安定かつ非常に脆いタンパク質結晶においても、成長段階で正常な単結晶成長

を促すことが可能である。また、本手法は、加工精度が高いため、結晶の微小部分からの結晶片の切り出しが出来る。レーザー照射により加工された穴のサイズは数ミクロンであり、この程度のサイズの単結晶領域があればフェムト秒レーザーアブレーションにより結晶片を切りだせることになる。もちろん、レンズ光学系によりビーム径を調節することで、より大きいサイズでの結晶の切り出しが可能である。レーザーをスキャンしての切断加工によっても、結晶を切り離すことも可能ではあるが、大量の噴出片により多量の結晶が析出してしまふ。よって、単結晶成長を誘導する場合には、単発照射によるアブレーション加工が有用であると考えられる。

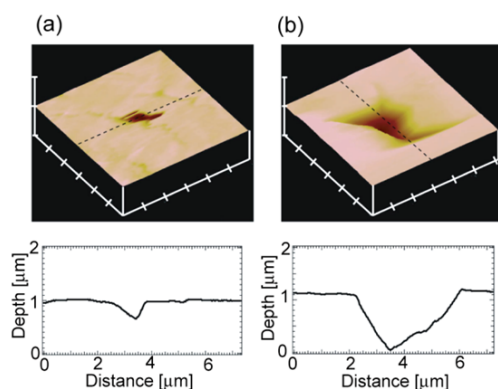


図3:フェムト秒レーザー照射によってアブレーションされた HEWL 結晶表面の原子間力顕微鏡像。(a)はアブレーションしきい値、(b)は高強度でレーザーを単発照射した。発表論文[4]から許可を得て転載。Copyright (2012) American Chemical Society.

#### 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 6 件)

- ① H. Y. Yoshikawa, R. Murai, H. Adachi, S. Sugiyama, M. Maruyama, Y. Takahashi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, H. Masuhara, and Y. Mori, Laser Ablation for Protein Crystal Nucleation and Seeding, *Chemical Society Reviews*, 査読有, Vol. 43, 2014, pp. 2147-58.  
DOI:10.1039/c3cs60226e
- ② Y. Aoki, M. Maruyama, Y. Takahashi, M. Yoshimura, H. Y. Yoshikawa, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, H. Matsumura, T. Inoue, and Y. Mori, A New Practical Technique for High Quality Protein Crystallization with the Solution Stirring Technique at the Interface between High-Concentrated Hydrogel and Solution, *Japanese Journal of Applied Physics*, 査読有, 印刷中, 2014.

<http://dx.doi.org/10.7567/JJAP.53.065502>

- ③ S. Nakayama, H. Y. Yoshikawa, R. Murai, M. Kurata, H. Maruyama, S. Sugiyama, Y. Aoki, Y. Takahashi, M. Yoshimura, S. Nakabayashi, H. Adachi, H. Matsumura, T. Inoue, K. Takano, S. Murakami, Y. Mori, Effects of Gel-Solution Interfaces on Femtosecond Laser-Induced Nucleation of Protein, *Crystal Growth & Design*, 査読有, Vol. 13, 2013, pp. 1491-1496.  
DOI:10.1021/cg301618h
  - ④ H. Y. Yoshikawa, Y. Hosokawa, R. Murai, G. Sasaki, T. Kitatani, H. Adachi, T. Inoue, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, S. Nakabayashi, Y. Mori, and H. Masuhara, Spatially Precise, Soft Microseeding of Single Protein Crystals by Femtosecond Laser Ablation, *Crystal Growth & Design*, 査読有, Vol. 12, 2012, pp. 4334-4339.  
DOI:10.1021/cg300018t
  - ⑤ M. Maruyama, H. Kawahara, G. Sasaki, S. Maki, Y. Takahashi, H. Y. Yoshikawa, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, and Y. Mori, Effects of a Forced Solution Flow on the Step Advancement on {110} Faces of Tetragonal Lysozyme Crystals: Direct Visualization of Individual Steps under a Forced Solution Flow, *Crystal Growth & Design*, 査読有, Vol. 12, 2012, pp. 2856-2863.  
DOI:10.1021/cg300025b
- [学会発表] (計 25 件)
- ① 富永勇佑、林佑紀、中山智詞、丸山美帆子、高橋義典、吉川洋史、吉村政志、杉山成、安達宏昭、高野和文、村上聡、松村浩由、井上豪、森勇介、フェムト秒レーザーを用いたタンパク質結晶の成長制御、第 61 回応用物理学学会春季学術講演会、2014. 3. 20、青山学院大学相模原キャンパス、神奈川
  - ② 中山智詞、吉川洋史、倉田将輝、丸山美帆子、村井良多、高橋義典、吉村政志、杉山成、松村浩由、安達宏昭、高野和文、村上聡、井上豪、森勇介、フェムト秒レーザーを用いたタンパク質の結晶核発生技術～キャビテーションバブル挙動制御による技術の高度化～、レーザー学会学術講演会第 34 回年次大会、2014. 1. 20、北九州国際会議場、福岡
  - ③ K. Ikeda, T. Yamada, Y. Mori, Y. Takahashi, M. Maruyama, H. Y. Yoshikawa, S. Okada, H. Adachi, S. Sugiyama, K.

Takano, S. Murakami, Y. Matsumura, T. Inoue, M. Yoshimura, and Y. Mori, Laser-induced Crystallization of Metastable Form of Pharmaceutical Compound Indomethacin, International Symposium on Nanophotonics and Nanomaterials 2014 (ISONP2014), 2014. 1. 15, Beijing, China.

- ④ 池田憲治, 山田利彦, 森陽一朗, 高橋義典, 丸山美帆子, 吉川洋史, 岡田詩乃, 安達宏昭, 杉山成, 高野和文, 村上聡, 松村浩由, 井上豪, 吉村政志, 森勇介, レーザー誘起結晶化技術を用いた医薬化合物の準安定相晶出、第 43 回結晶成長国内会議、2013. 11. 8、長野市生涯学習センター、長野
- ⑤ 西村晋平, 杜静如, 吉川洋史, 中林誠一郎, 柚山健一, 杉山輝樹, 増原宏, 放射圧により形成・時間発展する高濃度領域に伴う蛍光リゾチームの結晶成長挙動第 74 回応用物理学会秋季学術講演会、2013. 9. 19、同志社大学、京都
- ⑥ 池田憲治, 山田利彦, 森陽一朗, 高橋義典, 丸山美帆子, 吉川洋史, 岡田詩乃, 安達宏昭, 杉山成, 高野和文, 村上聡, 松村浩由, 井上豪, 吉村政志, 森勇介, フェムト秒レーザー誘起結晶化による医薬化合物インドメタシンの結晶多形制御、第 74 回応用物理学会秋季学術講演会、2013. 9. 16、同志社大学、京都
- ⑦ 池田憲治, 山田利彦, 森陽一朗, 西村健, 高橋義典, 丸山美帆子, 吉川洋史, 岡田詩乃, 安達宏昭, 杉山成, 高野和文, 村上聡, 松村浩由, 井上豪, 吉村政志, 森勇介, フェムト秒レーザー誘起結晶化によるインドメタシンの結晶多形制御、日本薬剤学会第 28 年会、2013. 5. 23、ウインクあいち、愛知
- ⑧ 西村晋平, 杜静如, 吉川洋史, 中林誠一郎, 柚山健一, 杉山輝樹, 増原宏, 集光レーザービームの放射圧による蛍光ラベル化リゾチームの結晶成長制御、第 60 回応用物理学会春季学術講演会、2013. 3. 29、神奈川工科大学、神奈川
- ⑨ 中山智詞, 吉川洋史, 青木裕介, 倉田将輝, 丸山美帆子, 村井良多, 高橋義典, 吉村政志, 杉山成, 松村浩由, 安達宏昭, 高野和文, 村上聡, 井上豪, 森勇介, 超短パルスレーザーを用いた有機結晶核発生～固相ゲル界面効果の検証～、第 42 回結晶成長国内会議 (NCCG-42)、2012. 11. 11、九州大学、福岡
- ⑩ 吉川洋史, 集光短パルスレーザーを駆使

したタンパク質結晶化・細胞接着力測定法の開発、第 8 回鴨叡会・生命分子化学科セミナー、2012. 10. 5、京都府立大学、京都

- ⑪ 中山智詞, 吉川洋史, 青木裕介, 倉田将輝, 丸山美帆子, 村井良多, 高橋義典, 吉村政志, 杉山成, 安達宏昭, 高野和文, 村上聡, 松村浩由, 井上豪, 森勇介, 超短パルスレーザーによる膜タンパク質の結晶核発生～界面活性剤のキャビテーションバブルへの影響～、第 73 回応用物理学会学術講演会、2012. 9. 11、愛媛大学・松山大学、愛媛
- ⑫ 吉川洋史, Bio-applications of ultrafast laser pulses to protein crystallization and cell adhesion strength measurement, エクストリームフォトニクスセミナー、2012. 5. 31、理化学研究所、埼玉

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 吉川洋史, 微小体積タンパク質溶液の高圧下での結晶化、CMC 出版、タンパク質結晶の最前線第 II 編 第 2 章 (杉山成 監修)、2013 年、6 ページ (pp. 70-75) .

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉川 洋史 (YOSHIKAWA, Hiroshi)  
埼玉大学・理工学研究科・助教  
研究者番号：5 0 5 5 1 1 7 3

### (2) 連携研究者

森 勇介 (MORI, Yusuke)  
大阪大学・工学研究科・教授  
研究者番号：9 0 2 5 2 6 1 8