

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26288010

研究課題名(和文) 微小液滴の界面選択的高感度蛍光プローブ装置の開発と生体分子への応用

研究課題名(英文) Development of surface selective high-sensitivity fluorescent probe apparatus for microdroplets and its application to biomolecules

研究代表者

関谷 博 (Sekiya, Hiroshi)

九州大学・理学研究院・名誉教授

研究者番号：90154658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、空間中に捕捉した単一微小液滴の界面を選択的にプローブするための実験装置を開発し、界面で生じる蛍光励起エネルギー移動の高感度観測を試みた。まず、単一微小液滴を安定に空間捕捉するために平行平板型イオントラップを製作した。微小液滴はエレクトロスプレー法を用いて生成した。色素分子が溶存した微小液滴にナノ秒パルスレーザーを照射すると、液滴からのレーザー発振が観測された。これを利用して、液滴の表面に形成した単分子膜と溶存分子との蛍光励起エネルギー移動を高感度で観測することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we developed an experimental apparatus to selectively probe the surface of a single microdroplet levitated in space, and attempted to observe fluorescence excitation energy transfer occurred at the surface. First, a parallel plate ion trap was fabricated to stably levitate a single microdroplet. Microdroplets were generated using an electrospray ionization. Lasing signals from the microdroplet was observed when the droplet in which dye molecules were dissolved were irradiated with a nanosecond pulsed laser. We succeeded in observing the fluorescence excitation energy transfer between the monolayer formed on the surface of the droplet and the dissolved molecule with high sensitivity.

研究分野：Physical chemistry

キーワード：microdroplet ion trap energy transfer

### 1. 研究開始当初の背景

生体のような複雑な系においては、複数の分子が協調的に運動することによって機能が発現する。このメカニズムを解明するには、高度な運動性を示す分子系について分子論的に理解することが極めて重要である。気相クラスターを用いた研究では、複雑な系の一部分を真空中に切り出すことによって、その素過程を詳細に研究することが可能である。

我々のグループは、長年、気相において溶媒和した生体関連分子のクラスター構造と励起状態プロトン・電荷移動、クラスターイオンにおける水和分子の転移などのダイナミクスについて研究を行ってきた。一方、気相においては調査できない複雑な素過程について、新しい切り口で調査できる方法の導入を検討してきた。そこで、マイクロサイズの界面が存在し、界面近傍に非対称な環境が現れる微小液滴に着目した。これまで、分析化学や量子光学の分野において、微小液滴を用いた研究が報告されている。分子科学分野では、タンパク質の荷電状態の分布やラマン散乱スペクトルの研究がなされている。しかしながら、微小液滴環境において生じる化学反応素過程を詳細に調査した研究例は限られていた。

### 2. 研究の目的

生体内における生体分子の様々な機能は生体分子間の相互作用により発現しており、タンパク質や核酸などの分子間相互作用を検出することは生体分子の機能を理解する上で重要である。フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)は、光励起されたドナー分子とアクセプター分子間の双極子-双極子相互作用により無輻射的に励起エネルギーが移動し、ドナー分子からの発光強度が減少(消光)する現象である。FRETはドナー分子とアクセプター分子間の距離の6乗に依存して起こるため、蛍光タンパク質間や1分子内に2種類の発色団を導入した生体分子のFRETを観測することで、タンパク質間の相互作用や生体分子の立体構造変化に関する知見を得ることができる。典型的な色素分子間のFRETは数ナノメートルの分子間距離で観測される。従来よりも高感度にFRETを観測することができれば、より長距離の分子間相互作用を検出することが可能になる。

直径数~数十 $\mu\text{m}$ の微小液滴内部で発生した発光は、液滴界面において全反射されることで液滴内部に閉じ込められる。このとき、液滴の外周の長さや光の波長の整数倍が一致すると、液滴の気液界面近傍において光の定在波が形成される。つまり、微小液滴は微小な光共振器としての機能を持っている。また、空間に捕捉された微小液滴は、自身の表面張力によってほぼ真球となるため、光の閉じ込め能力を表すQuality factor(Q値)が $10^6 \sim 10^{10}$ と非常に大きい理想的な光共振器とみなすことができる。そのため、微小液滴中の

分子を光励起すると非常に低いしきい値でレーザー発振が観測される。単一微小液滴の表面に両親媒性分子から成る単分子膜構造を形成し、ここからのレーザー発振を観測することで生体膜と溶存分子間のエネルギー移動を高感度に観測できれば、単分子膜と溶存分子との分子間相互作用を従来よりも長距離で検出できることが期待される。

本研究では、単一微小液滴を安定に空間捕捉する技術を確立すること、および空間捕捉された単一微小液滴に顕微分光を適用することを目指した。また、この技術を応用することで、単一微小液滴上に構成された単分子膜構造と溶存分子との間で生じるFRETを高感度に観測することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究で製作した3次元平行平板型イオントラップの模式図(図1)とその電位分布(図2)を示す。

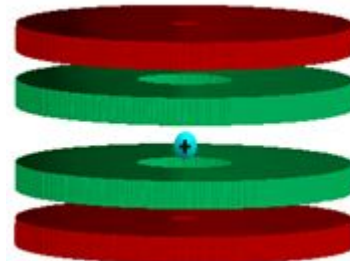


図1. 3次元平行平板型イオントラップの模式図 緑色で示した2枚の電極がリング電極、赤で示した2枚の電極がエンドキャップに対応する。

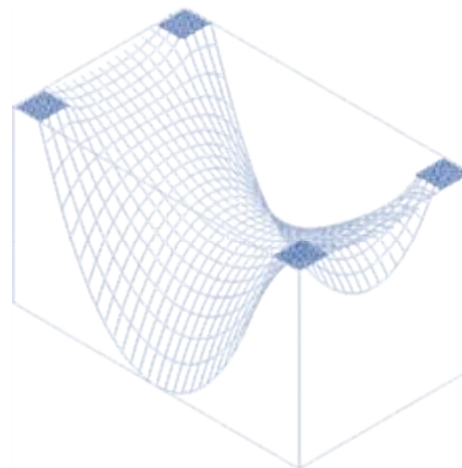


図2. 3次元平行平板型イオントラップのリング電極に500Vを印加し、エンドキャップを地絡させたときの電位分布のシミュレーション結果。

3次元平行平板型イオントラップは4枚のステンレス電極を積層させた構造をしている。内側の2枚の電極が通常の4重極イオン

トラップのリング電極に対応しており、外側の 2 枚の電極がエンドキャップに相当する。高電圧電源と高速パルススイッチによって整形した矩形波を内側の 2 枚の電極に印加することによって、荷電粒子を捕捉するためのトラップ電場を発生させる。図 2 はリング電極に 500 V を印加したときの電位分布である。図 2 を見てみると、イオントラップの中心に電位の鞍点が現われている。この鞍点の安定方向と不安定方向は、電極に印可する電圧を高速で切り替えることによって入れ替えることが可能となる。よって、荷電粒子はイオントラップの中心に安定に空間捕捉される。

微小液滴は自作のエレクトロスプレーイオン化源を用いて生成した。エレクトロスプレーによって生成した荷電微小液滴を平行平板型イオントラップに導入することによって、単一微小液滴を安定に空間捕捉することができる。

微小液滴からの発光およびレーザー発振を観測するための顕微分光系を図 3 に示す。

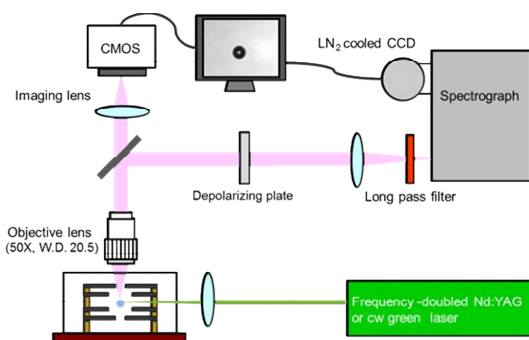


図 3. 単一微小液滴レーザー顕微鏡の模式図

空間捕捉した単一微小液滴に連続発振もしくはナノ秒パルス発振のグリーンレーザー (532 nm) を照射した。液滴からの発光を無限遠補正対物レンズで捕集し、偏光消光板やフィルターなどを通したのち、冷却 CCD 検出器で検出した。

#### 4. 研究成果

図 4 にオクタデシルローダミン B (ODRB) を含んだ単一微小液滴から発光スペクトルを示す。ODRB は、ローダミン B 骨格にアルキル鎖が結合した両親媒性分子である。図 4 を見ると、励起光源であるナノ秒パルスレーザーの強度が弱いときには発光が観測されていないが、励起光の強度があるしきい値を越えると極めてシャープな発光線が観測され始める。この発光線は、単一微小液滴のレーザー発振に帰属できる。図 4 の場合、レーザー発振のしきい値は、63 nJ/pulse と決定された (図 5)。

図 4 に観測されている発振線は、微小液滴が形成する共振モードと対応付けることができる。この共振モードは、液滴の界面近傍に集中しているため、界面に単分子膜を形成する ODRB と強く相互作用することが可能

である。

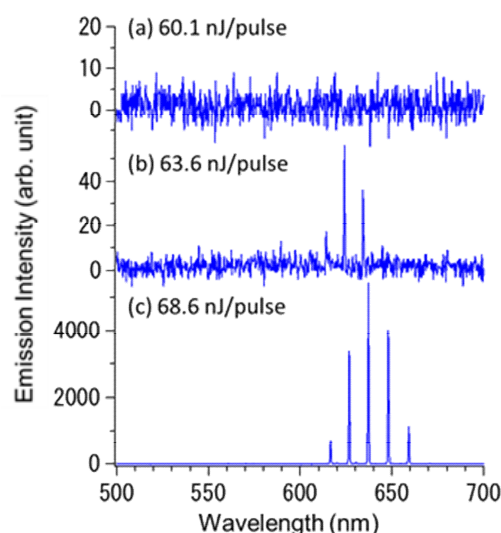


図 4. ODRB を含む単一微小液滴からの発光スペクトル

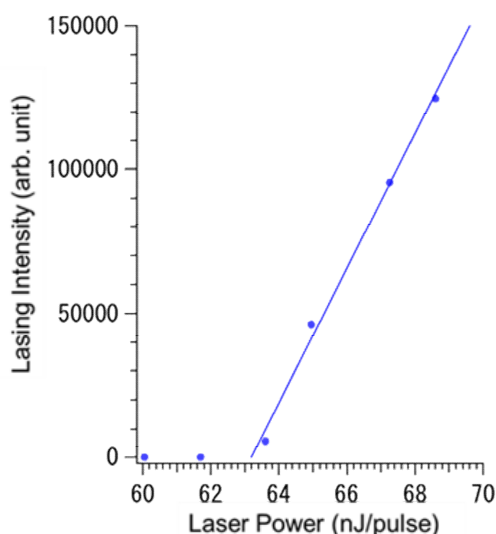


図 5. ODRB からのレーザー発振の励起光強度依存性

微小液滴の界面に形成された単分子膜と溶存分子との間で生じる FRET を調査するため、ODRB とローダミン 700 を含む微小液滴の発光スペクトルを測定した (図 6)。それぞれの色素分子の吸収および発光波長から、ODRB がドナー分子、ローダミン 700 がアクセプター分子となる。図 6 を見ると、650 nm 付近と 800 nm 付近にシャープな発光が観測されており、それぞれ、ODRB およびローダミン 700 からのレーザー発振に帰属できる。

図 7 は ODRB ( $10^{-4}$  M) とローダミン 700 を含んだ微小液滴からの発光スペクトルのうち、ODRB からのレーザー発振の強度を励起光の強度に対してプロットしたものである。図 7 を見ると、ODRB からのレーザー発振は、63

~ 64 nJ/pulse 付近をしきい値として、急激に立ち上がっていることが分かる。また、等しい励起光強度で比較すると、ローダミン 700 の濃度が増加するにつれて、ODRB からのレーザー発光の強度が減少していることが分かる。このことは、ODRB のレーザー発振の上準位からローダミン 700 へエネルギー移動が起こったため、ODRB からのレーザー発振が消光されたと考えられる。

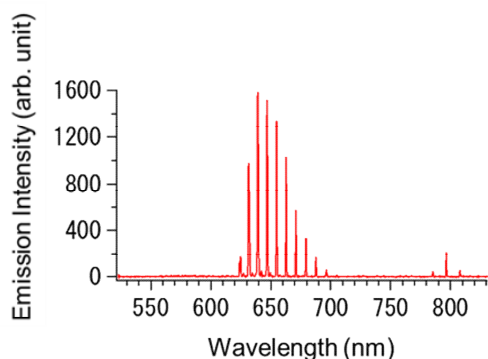


図 6. ODRB とローダミン 700 を含んだ微小液滴からの発光スペクトル

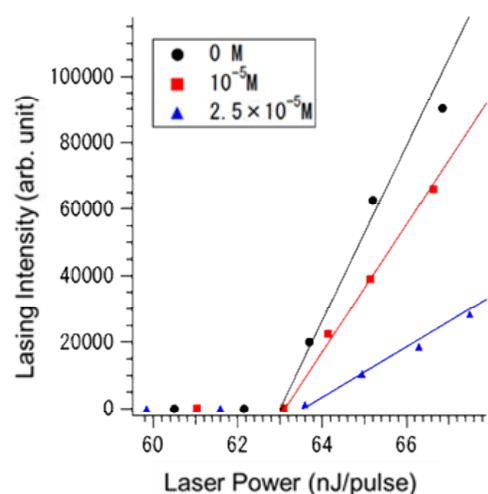


図 7. ODRB からのレーザー発振の励起光強度依存性

ODRB からのレーザー発振が 4 準位系で記述できると仮定し、レーザー発振に関するレート方程式を解析すると、ODRB とローダミン 700 との間の FRET 効率を算出できる。図 8 に通常の光学セルを用いて測定した ODRB とローダミン 700 との間の FRET 効率と、微小液滴中における FRET 効率をプロットした。図 8 から明らかなように、バルク溶液中と微小液滴中では、FRET 効率が 50% になるドナー-アクセプター間距離、すなわち FRET 距離が異なっていることが分かる。通常のセルを用いたバルク中の実験では ODRB からの自然放出を観測している一方で、微小液滴中ではレーザー発振（誘導放出）を観測してい

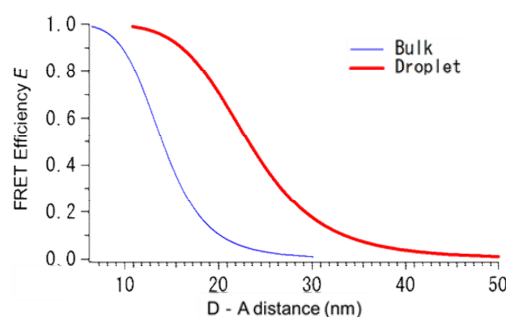


図 8. FRET 効率のドナー分子-アクセプター分子間距離依存性

る。また、バルク中では自然放出に対するエネルギー移動の効率が計算される。一方、レート方程式を解析した結果、微小液滴中ではレーザー発振準位の無輻射緩和速度に対するエネルギー移動効率が FRET 効率となることが分かった。今回実験に用いた色素分子の場合、自然放出に比べて無輻射緩和速度が非常に遅いため、微小液滴ではレーザー発振準位の無輻射緩和速度に対するエネルギー移動の速度が相対的に速くなり、エネルギー移動を高感度に観測できたと考えられる。

## 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 6 件)

Mitsuhiro Miyazaki, Ayumi Naito, Takamasa Ikeda, Johanna Klyne, Kenji Sakota, Hiroshi Sekiya, Otto Dopfer, Masaaki Fujii, “Real-time observation of the photoionization-induced water rearrangement dynamics in the 5-hydroxyindole-water cluster by time-resolved IR spectroscopy”, Phys. Chem. Chem. Phys., 査読有, 20, 2018, 3079-3091  
DOI: 10.1039/C7CP06127G

Takamasa Ikeda, Kenji Sakota, Hiroshi Sekiya, “Elevation of the Energy Threshold for Isomerization of 5-Hydroxyindole-(*tert*-butyl alcohol)<sub>1</sub> Cluster Cations”, J. Phys. Chem. A, 査読有, 121, 2017, 5809-5816  
DOI: 10.1021/acs.jpca.7b05434

Kazuki Furukawa, Norifumi Yamamoto, Kazuyuki Hino, Hiroshi Sekiya, “Temperature dependent fluorescence spectra arise from change in excited-state intramolecular proton transfer potential of 4'-N, N-dimethylamino-3-hydroxyflavone-doped acetonitrile crystals”, Chem. Phys. Lett., 査読有, 643, 2016, 109-113  
DOI: 10.1016/j.cplett.2015.11.012

Kazuki Furukawa, Norifumi Yamamoto, Kazuyuki Hino, Hiroshi Sekiya, “Excited-state intramolecular proton transfer and



conformational relaxation in 4'-N,N-dimethylamino-3-hydroxyflavone doped in acetonitrile crystals", Phys. Chem. Chem. Phys., 査読有 18, 2016, 8564-28575  
DOI: 10.1039/c6cp04322d

Yuki Fujimoto, Norifumi Yamamoto, Kazuki Furukawa, Hiroshi Sekiya, "Two isomers of a Cyanostilbene Derivative in Viscous Solution Observed by Fluorescence Spectroscopy" Chem. Lett., 査読有, 45, 2016, 637-639  
DOI: 10.1246/cl.160143

Kazuki Furukawa, Kazuyuki Hino, Norifumi Yamamoto, Kamlesh Awasthi, Takakazu Nakabayashi, Nobuhiro Ohta, Hiroshi Sekiya, "External electric field effects on excited-state intramolecular proton transfer in 4'-N,N-dimethylamino-3-hydroxyflavone in poly(methyl methacrylate) films", 査読有, J. Phys. Chem. A, 119, 2015, 9599-9608  
DOI: 10.1021/acs.jpca.5b03672

[学会発表](計 11 件)

Hiroshi Sekiya, "Remarkable enhancement of fluorescence quantum yield of the closed-ring form of a diarylethene derivative due to the presence of phenyl rings", WRHI Symposium, 2017. 10. 5. Tokyo Inst. Tech. (Tokyo)

Hiroshi Sekiya, "External Electric Field Effects on Excited-State Intramolecular Proton Transfer in 4'-N,N-Dimethylamino-3-hydroxyflavone", XXII Horizons in Hydrogen Bond Research 2017.9.12, University of Jyväskylä (Finland)

Kenji Sakota, "Laser spectroscopy of a single levitated microdroplet ~Lasing and resonance energy transfer~" International Symposium on "Diversity of Chemical Reaction Dynamics", 2017.7.15, イーグレ姫路(兵庫県)

Tomoya Nakagawara, Kiichi Amimoto, Norifumi Yamamoto, Hiroshi Sekiya, "Polymorphs-selected fluorescence spectroscopy of salicylideneaniline derivatives: Effects of intermolecular interaction on intramolecular proton transfer and cis-trans isomerization", KAKENHI International Symposium on "Studying the Function of Soft Molecular Systems", 2017. 6. 27, Royton Sapporo (Sapporo)

Kenji Sakota, Takamasa Ikeda, Hiroshi Sekiya, "Dynamics of rearrangement of hydrogen-bonds in monohydrated 5-hydroxyindole cluster cations", Stereodynamics, 2016.11.8, IMS (Taipei)

Hiroshi Sekiya, "Isomerization of flexible molecules in solid state", WRHI International Workshop on "Advanced Laser Spectroscopy for Soft Molecular Systems", 2016.9.6, Tokyo Inst. Tech. (Yokohama)

Shota Yasutomi, Kenji Sakota, Hiroshi Sekiya, "The influence of molecular-weight specific adsorption of polyethylene glycol on two-state transition of myoglobin" International Symposium: Recent progress in Molecular Spectroscopy and Dynamics, 2016.7.8, 九州大学(福岡)

Hiroshi Sekiya, "Excited-state dynamics of flexible molecules in solid state International Symposium: Recent Progress in Molecular Spectroscopy and Dynamics", 2016,7.8, Kyushu Univ. (Fukuoka)

Kazuki, Furukawa, Norifumi Yamamoto, Kazuhiko Hino, Hiroshi Sekiya, "Change in excited-state intramolecular proton transfer potential surfaces of 4'-N,N-dimethyl-3-hydroxyflavone doped in acetonitrile crystal accompanying with solid/solid phase transition", International Symposium: Recent Progress in Molecular Spectroscopy and Dynamics, 2016,7.8, Kyushu Univ. (Fukuoka)

Hiroshi Sekiya, "Cooperative effects on hydrogen-bonded networks in molecular clusters and crystals studied by vibrational spectroscopy and quantum chemical calculations", Pacificchem 2015, 2015,12,17 Honolulu (Hawaii)

迫田憲治, 関谷博, "超高感度バイオセンシングを目指した単一微小液滴顕微分光装置の開発", 第9回分子科学討論会, 2015.9.18, 東京工業大学(東京)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

関谷 博 (Sekiya, Hiroshi)  
九州大学・理学研究院・名誉教授  
研究者番号：90154658

### (2) 研究分担者

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