

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13812

研究課題名(和文)細胞への光閉じ込めと共鳴発光・レーザー発振

研究課題名(英文)Resonant luminescence and lasing by light confinement in a cell

研究代表者

山本 洋平(YAMAMOTO, Yohei)

筑波大学・数理物質系・准教授

研究者番号：40589834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で我々は、これまでの共役ポリマー球体共振器によるWGM発光に関する研究から、生体組織である細胞からWGM発光やレーザー発振に関する研究を進めた。まず、蛍光色素を添加したリン脂質からリポソームの形成について検討し、ジャイアントベシクルの形成を行った。得られたベシクルにレーザーを照射することで発光特性を得たが、WGM発光の観測には至らなかった。また、WGMによるセンシングや蛋白質安定化についても、研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：We reported whispering gallery mode (WGM) photoluminescence (PL) from -conjugated polymer microsphere resonators. In this research, we studied WGM PL and lasing from cells that have well-defined microsphere structures. We investigated preparation of giant vesicles from phospholipid bilayers doped with fluorescent dyes. Upon laser irradiation to the vesicle, we could not observe WGM PL. Now chemical sensing by WGM and stabilization of proteins are undergoing.

研究分野：分子集合体化学

キーワード：発光 細胞 レーザー WGM

1. 研究開始当初の背景

マイクロ球体内部に光を閉じ込め、共鳴・増幅する WGM 発光に関する研究が 1990 年以降活発に行われており、シリカ球体や半導体マイクロディスク、最近では色素を添加したポリスチレンビーズや液晶、液滴などから WGM 発光が観測されている。また、WGM 発光によるレーザー発振素子や微小屈折率変化センサーなどへの応用研究が発表されている。我々のグループでは、 π 共役高分子からマイクロ球体を形成する技術や主鎖構造と球体形成の関連性に関する知見を得ており(JACS 2013)、さらに、 π 共役高分子からなる球体から初めて WGM 発光を観測した (Sci. Rep. 2014)。我々はこれらの球体を発光性マイクロ共振器 (Fluorescent Microresonator) と名づけ、現在、様々な π 共役高分子によるマイクロ球体の構築や電荷注入による WGM 発光・レーザー発振に関する研究を進めている。一方、 π 共役高分子以外でも WGM 発光が起こる材料がないか模索をしている。WGM 発光が起こるための条件として、[1] 形状が非常に整ったマイクロメートルサイズの構造体であり、特に表面がなめらかであること、[2] 発光特性を有すること、[3] 屈折率が高く構造体内部に光を閉じ込めることができること、などが挙げられる。このような条件を満たすマイクロ構造体はないかと考えたときに、生体組織である細胞から WGM 発光やレーザー発振を起こすことができるのではないかとこの着想に至った。細胞にも様々な種類があり、構造が非常に整っているものがある。また、リン脂質の屈折率 (1.45–1.55) は空気や媒体 (水: 1.33) よりも高い点や、蛍光標識や蛍光タンパク質を付与したり蛍光分子を選択的に吸着する部位 (疎水性部位に対する ANS や Nile Red、ペプチド β シートに対する Thioflavin T や Congo Red など) を細胞内に有するものも多い。これらのことから本課題では、細胞を WGM 発光のための共振器としてとらえ、これまでに前例のない細胞からの WGM 発光およびレーザー発振を実現することを目指とする。そのために、まずは扱いが容易で構成要素が単純である単層および多層リポソームを用いて WGM 発光の発現を試みる。さらに、生きた動物・植物細胞による共鳴発光やレーザー発振を最終目標とする。

2. 研究の目的

リポソームや生体細胞が形状の整ったミクロンサイズの球状構造体であり、さらに発光性を付与可能であることを利用し、これらを用いた発光閉じ込めと共鳴発光 (WGM 発光) レーザー発振を実現する。生体細胞として、赤血球やリンパ球、卵細胞などの動物細胞や、藻類 (珪藻など)、酵母を用いる。発光性を持たない細胞に対しては、GFP など

の蛍光タンパク質を導入する。レーザートラップにより細胞を水中で固定化し、光ポンピングにより生じる発光を細胞内部に閉じ込め、共鳴発光、レーザー発振を実現する。細胞による新しい発光機能の実現に向けた極めて斬新な試みであり、細胞表面や細胞内部の高感度センシングとしての応用が期待できる。

WGM 発光は、表面形状や屈折率などに極めて敏感である。従って、がん細胞のように正常細胞とは表面の形状や荒さが異なる細胞の分光学的手法による識別が期待できる。また、リンパ球の表面を覆うレセプターの分子形状や抗原の種類、細胞ストレスによる細胞表面や内部の変化に対しても敏感にスペクトル変化を示す可能性があり、新しい細胞検出手法としての応用が期待できる。そもそも生体組織からの WGM 発光自体がこれまでに前例のない研究であることから、共鳴発光が観測されることそのものに大きなインパクトがあると考えられる。

3. 研究の方法

【1年目】

(1) リン脂質によるミクロン径のリポソームの形成と蛍光色素添加による発光の閉じ込め効果

リン脂質としてホスファチジルコリン誘導体(DPPC, POPC)を用いる。単純水合法 (パンガム法) あるいは凍結融解法により、直径が 2–20 ミクロン程度のリポソームを形成する。その際、蛍光色素としてカルセイン-AM やローダミン-PE を添加する。形成したリポソームを基板上に固定化し μ -PL 法により 1 粒子に対してレーザーを照射して、1 つのリポソームからの蛍光スペクトルを測定する。脂質の屈折率は 1.4–1.5 程度であり、空気に対しては十分に高く、また水 (~ 1.33) に対しても大きいことから、リン脂質膜付近に発光がとどまると考えられる。また、多層のリン脂質膜からなるリポソームを作製することにより、光の導波路を確立するとともに光照射に対するリポソームの強度を増し、効率的に光がリポソーム内部に閉じ込められるよう工夫する。また、リポソーム内部をエッグ-PC や藻類から産出される油脂 (筑波大学生命環境系 市川創作教授、渡邊信教授より提供) により置換することでリポソーム内部の屈折率を高め、同時にリポソームの強度を増し、光ポンピングや機械的刺激に対する耐久性を付与する。

(2) WGM 発光によるリポソームの温度変化に伴う構造相転移の検出

リポソームは、温度変化に伴い分子膜の集合構造が変化し、構造転移と同時に屈折率が変化する。WGM 発光は媒体の屈折率により敏感に変化することから、脂質分子膜の構造相転移前後で発光スペクトルは大きく変化すると考えられる。そこで、X 線回折の温度

変化と発光スペクトルの温度変化測定を行い、構造変化と発光特性変化の関連性について検討する。

【2年目】

(1) 細胞からの蛍光クエンチャーの除去、および蛍光色素や蛍光蛋白質の導入

リポソームによる WGM 発光を確認した後、対象を細胞系に拡張する。まず始めに、入手が容易で扱いやすく、生命活動をしていない赤血球を対象とする。赤血球には蛍光色素であるポルフィリンが多く含有されるが、ヘムにおいて蛍光はクエンチされる。そこで、低浸透圧下で赤血球の内容成分を取り除く赤血球ゴースト処理を行い、ヘムを取り除いた血球細胞を作る。新たにエオシンなど、赤血球に取り込まれやすい蛍光色素を付与する。また、人工細胞系に蛍光蛋白質である GFP 発現遺伝子を導入し、細胞内において GFP を産生し、強く緑色に光る細胞を作製する。これらの細胞を用い、レーザートラップ μ -PL 法による発光計測を行う。

(2) 藻類や酵母からの共鳴発光

次に、珪藻や円石藻のような筒状あるいは円盤状の構造体や酵母を用い、 μ -PL 法による発光計測を行う。藻類は形状が明瞭で強度が高いことから、扱いやすい材料である。蛍光色素として、元々葉緑体中に含まれる金属ポルフィリンを用い、集合構造を解離することで蛍光のクエンチを防ぐ。蛍光が弱い場合には、ローダミン 6G やシアニン色素などの蛍光色素を添加し、内外壁に吸着させることで発光を誘起する。励起光強度の増大により WGM レーザー発振を実現する。

(3) 細胞ストレスに対する WGM 発光応答、細胞の表面や内部での蛋白質の吸着・凝集状態のセンシング

WGM 発光は、媒質の表面荒さや形状、屈折率変化に対し極めて敏感に変化する。この特徴を活かし、細胞センシングに関して研究を行う。WGM 発光を示す細胞やペプチドなどを含むリポソーム（人工細胞）に対し、過酸化水素添加による酸化ストレスや熱ストレス、圧力や応力などの機械的ストレス等を加え、細胞内部での蛋白質の凝集、細胞表面での構造変化、さらには細胞そのものの形状変化を誘起する。その際の WGM 発光を測定し、WGM 発光ピークのシフトや発光強度の低下から、細胞の表面状態の違いや状態変化を検出する。

4. 研究成果

(1) 「リン脂質によるリポソームの形成と蛍光色素導入」

リポソームの作製。リポソームの調整法として一般的に用いられる方法でパンガム法が挙げられる。単純水和法、ソニケーション（超音波処理）法ともよばれる。調整できるリポソームは多重層リポソーム

（Multilamellar Vesicle : MLV）と小さな一枚膜リポソーム（Small Unilamellar Vesicle : SUV）である。ここで調整されるリポソームは空リポソームといわれるものであり、人工細胞モデルの最も単純化された形態といえる。作製手順は、(a) クロロホルム（200 μ L）にリン脂質（DOPC : 5 mmol）を溶解しバイアルにいれ、(b) ロータリーエバポレータで溶媒を飛ばしバイアル側面に薄い脂質フィルムを作製する。フィルムを作製しリン脂質の親水基を内側に向けることで、リポソーム調整が上手く作製出来るようになる。このとき、溶媒が残留させないために1時間以上真空引きを続ける。その後(c) バイアルの中に140 mM の NaCl、10 mM の PB (PH 7.4) を加える（400 μ L）。この際、リン脂質の相転移温度以上である事が必要なので、バイアルと加える溶液は 50°C に加熱した後加える。最後に(d) ボルテックスミキサーで機械的振動をあてることで水和、分散させ、MLV を作製する。発光性を付与する際には手順(c) でカルセインを添加し内封させた。

ジャイアントベシクルの作製。攪拌乳化による氷滴の作製：連続相には 3 wt% の Span 80 と 0.1 wt.% の stearylamine を溶解した n-hexane、分散層には 50 mM の Tris-HCl buffer (pH 8) を用いた。これら調整した連続相を 2.9 mL、分散相を 0.1 mL バイアルに入れ攪拌乳化（800 rpm、5 min）を行なった。すると界面活性剤である Span 80 により W/O エマルションが出来る。エマルション作製後、液体窒素でピペティングしながら凍結し、-20°C で静置保存することでエマルションは氷滴のみが凍結し、液状の連続相に氷滴が分散した懸濁液となった。この懸濁液を静置して氷滴を沈降させ、上澄みの連続相をピペットで取り出し、その後 n-hexane を添加する洗浄・置換操作を行い、乳化剤 Span 80 の濃度が 1000 分の 1 以下となるまで行った。連続相の洗浄・置換後、ピペティングしてエマルション氷滴を分散させ、W/O エマルションに含まれる水分量をカールフィッシャー水分計で測定した。

脂質と水分の比率の調整。脂質二分子膜を形成する脂質溶液には、egg-PC、cholesterol、stearylamine をモル比で egg-PC : cholesterol : stearylamine = 5 : 5 : 1 の割合で n-hexane に溶解し、egg-PC の濃度を 1 mg/mL に調整したものを使用した。ここで stearylamine を使用した理由は、stearylamine のアミノ基が正に帯電していることにより、調製した GV 同士の合一や凝集を静電的反発によって防ぐことが期待できるからである。また、GV に発光性を付与するために、蛍光脂質 rhodamine-PE をモル比で egg-PC : rhodamine-PE = 2000 : 1、100 : 1 になるよう脂質溶液に添加した。

脂質被覆氷滴の作製と水和。調製した W/O エマルションを水分量 1 mg を含む量だけ分取し、20 mL 容試験管に移しこれに脂質溶液を 1 mL を加えた。これを -10°C のエタ

ノールバスに浸けてエマルション滴の凍結状態を維持したまま、ロータリーエバポレータで連続相溶媒の n-hexane を減圧除去し、水滴が脂質膜で覆われた脂質被覆水滴を得た。これに 4°C の 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8) を添加することで GV 懸濁液を得た。

(2)「脂質球体の確認と顕微蛍光分光、化学・バイオセンシングの検討」

作製したリポソームが球状構造を確認するため光学顕微鏡で確認した。結果、球状構造体を形成している事が分かった。サイズとしては、2 μm 以下が多く観察された。

通常の WGM 測定では、球体を基板にスピンコートし分散状態に固定することで $\mu\text{-PL}$ 測定を行なう。しかしながら、今回作製した人工細胞モデルは球体内外が水相であるため、基板に固定し乾燥させることができない。そこで石英ガラス (0.12 mm) で挟み、溶媒中で測定出来るようにサンプル調製し $\mu\text{-PL}$ 測定を行なった。その結果、 $\mu\text{-PL}$ 装置の光学顕微鏡だと落射光の影響で球体が観測できないことが明らかとなった。光学顕微鏡で観察できないことに対しての解決法として、脂質二重膜を厚くする、球体のサイズを大きくする、ということが挙げられる。

そこで次に厚い脂質二重膜をもつ大きな人工細胞モデルとして、生命環境科の市川先生のもとで、ジャイアントベシクル (GV) の作製を試みた。作製したベシクルの球状構造を確認するため光学顕微鏡で観察した結果、球直径 20 μm を超える GV を確認した。また、同時に分厚い脂質二重膜を観測することができた。さらに、基板に滴下し固定化出来ないかと考え、GV を大気下で乾燥させたところ、球形を保たずにつぶれてしまうことが明らかとなった。

この分厚い脂質二重膜構造は、本研究の目標である WGM 発光発現において大きな利点と考えられる。先に述べた π 共役系高分子球体の WGM 発光では、反射した光の中には球体中心に向かう光も存在するが、共振発光に寄与する共振可能な光は球体の最大円周を伝播する光のみである。一方、内水相、脂質、外水相からなる GV の場合、光が伝播する脂質の内外で屈折率差が生じているので、反射して球体の中心方に向かう光も全反射ができ高効率な光の閉じ込めが可能になる。

作製した GV が特異な発光特性を発現するかについて、 $\mu\text{-PL}$ 測定を行なった。まず始めに、 $\mu\text{-PL}$ 測定を行なうために光学顕微鏡で GV を観察した結果、大きい GV (11~13 μm) と小さい GV (~3 μm) が観測できた。それぞれについて $\mu\text{-PL}$ 測定を行なった。その結果、GV からローダミンの発光を観測することに成功した。また、色素を多く添加したためか、GV の無い部位からも微小な発光が観測された。これは、外水相にも色素が多く残っていることが考えられ、そのためベシクルが存在しない部位でも発光がみられたと考えられ

る。また、GV から WGM 発光が観測できなかった理由として、内外の屈折率の差が小さいことが考えられる。WGM 発光の重要なファクターは屈折率差であるため GV 内部ではせいぜい発光が全反射できず、キャビティ内部に閉じ込めが起こらなかった可能性がある。また、石英基板で挟み込んで測定しているため、球体に変形してしまっていることが挙げられる。WGM 発現の際には球形を保っている必要がある。扁平率は 0.18 となりきれいな球体を保っていないことが分かる。比較のために、WGM 発光を発現した、ポリマー球体の真球率を計算すると、0.04 と真球に近い事が分かる。このように、WGM 発光発現には「屈折率差」と「球形保持」が課題と考えられる。

本研究では、人工細胞モデルとしてカルセインを内封させたりポソームと、脂質二重膜に発光部位を組み込んだ Rhodamine-PE 含有 GV を作製した。結果としては、これら人工細胞モデルから特異な発光 (WGM 発光、レーザー発振) は得られず、色素元来の発光スペクトルのみ得られた。原因としては 屈折率差が小さい、球形を維持出来ていないという 2 点が考えられる。これらの課題を克服するために、GV 内部の水層を 1.4-1.5 の屈折率を持つ油層に置換したり、GV 表面を水溶性高分子ポリエチレングリコール (PEG) で被覆することで強度をもたせることを試みる。

(3)「タンパク質の安定化と酵素の活性化」

タンパク質は水溶液中では不安定であり、表面などに結合して凝集や失活をしやすいという欠点がある。とくにリポソームなどの空間にタンパク質を封入すると、安定性や活性が変化すると考えられる。そこで本研究では、リポソームなどの人工細胞系に封入することが可能な低分子の溶質を利用したタンパク質の安定化について研究した。タンパク質の表面への吸着を抑制する低分子試薬として、アルギニンのメカニズムを調べた。その結果、主鎖の電荷がタンパク質の分子間会合の制御に不可欠であることがわかった。さらに、溶媒環境によって酵素活性が増加する現象について論文に報告した。プラス荷電を持つ低分子や、硫酸ナトリウムのようなコスモトロープ塩は酵素活性を増加させる可能性がある。そのため、リポソームなどの閉空間に低分子を共存させる方法は、タンパク質の安定化や酵素の活性化の技術として利用することが期待できる。

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 4 件)

[1] Akihiro Endo, Takaaki Kurinomaru, and

Kentaro Shiraki, "Hyperactivation of α -chymotrypsin by the Hofmeister effect" *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. **2017**, in press. (査読有)
DOI: 10.1016/j.molcatb.2017.03.006

[2] Soh Kushida, Daichi Okada, Fumio Sasaki, Zhan-Hong Lin, Jer-Shing Huang, Yohei Yamamoto, "Low-Threshold Whispering Gallery Mode Lasing from Self-Assembled Microspheres of Single-Sort Conjugated Polymers" *Adv. Opt. Mater.* **2017**, in press. (査読有)
DOI: 10.1002/adom.201700123

[3] Takumi Miyatake, Shunsuke Yoshizawa, Tsutomu Arakawa, Kentaro Shiraki, "Charge state of arginine as an additive on heat-induced protein aggregation" *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, 87, 563-569. (査読有)
DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.03.015

[4] Yohei Yamamoto, "Spherical resonators from π -conjugated polymers" (Focus Review) *Polym. J.* **2016**, 48, 1045-1050. (査読有)
DOI: 10.1038/pj.2016.81

〔学会発表〕(計 108 件、うち招待・依頼講演 13 件)

[1] Yohei Yamamoto, "Optical and Laser Microcavities by Self-Assembly of Conjugated Molecules and Polymers" CeNIDE-NTHU-TIMS Joint Symposium(筑波大学、茨城県つくば市) 2017 年 3 月 10-11 日

[2] Yohei Yamamoto, "Self-assembled optical microcavities from conjugated polymers and macromolecules" 九州大学 OPERA セミナー (九州大学、福岡県福岡市) 2017 年 3 月 8 日

[3] Yohei Yamamoto, "Conjugated Polymer Microspheres for Resonators and Lasers" MRS-J (神奈川県横浜市) 2016 年 12 月 19-22 日

[4] 山本洋平、「自己組織化共役ポリマー球体からの WGM レーザー発振」レーザー学会第 497 回研究会「有機固体レーザー」(福岡県福岡市) 2016 年 11 月 18 日 (依頼講演)

[5] 白木賢太郎、「蛋白質凝集テクノロジー」蛋白質科学会セミナー(東京都千代田区) 2016 年 11 月 16 日 (依頼講演)

[6] Yohei Yamamoto, "Conjugated Polymer Spheres as Fluorescent Microcavities" Univ. Duisburg-Essen Seminar (Duisburg, Germany) 2016 年 9 月 27 日

[7] 山本洋平、「自己組織化共役ポリマー球体からの共鳴発光とレーザー発振」九州大学先導研セミナー(九州大学、福岡県福岡市) 2016 年 9 月 7 日

[8] Yohei Yamamoto, "Conjugated Polymer Spheres for Fluorescent Microcavities" Seminar in UC Santa Barbara (サンタバーバラ、アメリカ合衆国) 2016 年 6 月 3 日

[9] Yohei Yamamoto, "Conjugated Polymer Spherical Microcavities for Energy Conversion" The Electrochemical Society 229th meeting (サンディエゴ、アメリカ合衆国) 2016 年 5 月 29 日-6 月 3 日

[10] 山本洋平、「ポリマー球体共振器による光エネルギー変調」CiRfSe ワークショップ (筑波大学、茨城県つくば市) 2016 年 1 月 18-19 日

[11] 山本洋平、「共役系高分子マイクロ球体による共鳴発光現象と発光材料としての応用」高分子学会 印刷・情報記録・表示研究会および光反応・電子用材料研究会 (東京理科大学、東京都新宿区) 2015 年 10 月 9 日

[12] 山本洋平、「 π 共役高分子球体による発光性マイクロ共振器の開発」第 64 回高分子討論会 (東北大学、宮城県仙台市) 2015 年 9 月 15-17 日 (日立化成賞受賞講演)

[13] 山本洋平、「様々な高発光性 π 共役高分子によるマイクロ球体の作製と WGM 発光」第 64 回高分子討論会 (東北大学、宮城県仙台市) 2015 年 9 月 15-17 日

[14] 山本洋平、「共役系高分子による球体形成と共鳴発光現象」第 3 回数理連携サロン(筑波大学、茨城県つくば市) 2015 年 6 月 18 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等:

http://www.ims.tsukuba.ac.jp/~yamamoto_lab/Hompage_Japanese/toppu.html

受賞 (計 2 件):

[1] 山本洋平、ICSM 2016 Best Poster Award "Self-Assembled Conjugated Polymer Spherical Microresonators" (2016 年 7 月 1 日)

[2] 山本洋平、2015 年度高分子学会日立化成賞「 π 共役高分子球体による発光性マイクロ共振器の開発」(2015 年 9 月)

6．研究組織

(1)研究代表者

山本 洋平 (YAMAMOTO Yohei)

筑波大学・数理物質系・准教授

研究者番号：40589834

(2)研究分担者

白木 賢太郎 (SHIRAKI Kentaro)

筑波大学・数理物質系・教授

研究者番号： 90334797