

放射圧で創る分子集合体とレーザー捕捉・顕微分光計測によるその構造解析

Molecular Aggregates Produced by Radiation Pressure of a Focused Laser Beam:
Structural Analysis using Micro spectroscopy combined with Laser Trapping Technique

(推薦研究)

代表研究者： 北海道大学 坪井 泰之 Hokkaido University Yasuyuki Tsuboi

共同研究者： 北海道大学 堀田 純一 Hokkaido University Jun-Ichi Hotta

We developed a confocal Raman microspectroscopy system combined with a laser trapping technique and applied it to aqueous solutions (H_2O and D_2O) of poly(N-isopropylacrylamide) (PIPA) and poly(vinyl methyl ether)(PVME), which are well-known as representative thermo-responsive polymers, i.e., phase transition/separation between coiled and globular states. By introducing a near-infrared (1064 nm) laser beam into a microscope, PNIPA and microparticles were produced at the focused spot of the laser beam, both in H_2O and D_2O . By using the present system, we succeeded in obtaining the Raman spectra of PIPA in the coiled and globular states over a wide wavenumber region ($800\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$) for the first time. For the D_2O solutions (in which the photothermal effect is negligible and hence the microparticles should be produced purely by the effect of radiation pressure), some significant differences were observed in the Raman spectra for the coiled state, in the globular state, and for laser induced microparticles. By analyzing these spectra in detail, we revealed that the structure of the laser-induced microparticles was analogous to that in the globular state. We also discuss the fundamental mechanism underlying the transformation of the higher order structure of a polymer by radiation pressure. For PVME, the similar behavior, i.e., the photo-induced phase transition was also confirmed. Moreover, influence of the radiation pressure was examined for volume phase transition of PIPA gel. By the integration of above results, we demonstrated radiation pressure of a focused laser beam can induce structural changes of thermo-responsive polymer systems.

<研究目的> 蛋白質、あるいはそれらの関連化合物やモデル化合物は溶液中（生体中）で特殊な立体構造をとり、それによって機能を発現しており、その構造や構造形成過程/機構は科学一般において重要課題の一つと云ってよい。このような特殊な立体構造をレーザー光という物理摂動によって作り出すことはできないであろうか？ 例えば、推進者は蛋白質（フィブリン）の二次元超薄膜にパルスレーザー光を照射すれば、ランダムコイル型二次構造の中に逆平行 β シート構造が形成されることを見出したが、他の系においてもレーザーによって高次構造を変化させたり、その過程をモニターすることはできないのであろうか？ このような疑問がそもそものモチベーションである。

蛋白質などの高分子の溶液に対物レンズを通じてCWレーザー光を集光すれば、分子鎖に電磁気学的な圧力（=放射圧 あるいは dipole gradient force）が働き、集光位置に高分子が凝集する。この現象を用いれば、高分子を高い濃度で存在させる、濃度非平衡状態（=マイクロ微粒子）を、非接触で任意の位置に出現できることになる。さらに、出現したマイクロ微粒子は放射圧によりただちに捕捉され、光軸に従って自在に操ることが出来る。このような技術は他に見当たらない。放射圧で集められた蛋白質、高分子の集合構造は極めて興味深い。また、局所的高濃度下では、自発的な結晶や高次構造の形成も、もちろん大きく期待されるであろう。このような集合体に対し、蛍光分光法による凝集状態の解析例は Hofkens & Masuhara らの先駆的な報告があるが、振動分光法はより構造に鋭敏であると期待した。

そこで、上記のような放射圧下での蛋白質/高分子の構造を高精度で解析できる「レーザー捕捉機能を有した顕微ラマン分光システム」の開発を行った。放射圧で誘起される高分子系の構造変化を解明することが本研究の目的である。

<経過> 構築した「レーザー捕捉型顕微ラマン分光計測システム」の概要を、Fig. 1に示したブロックダイアグラムを参照しながら説明する。

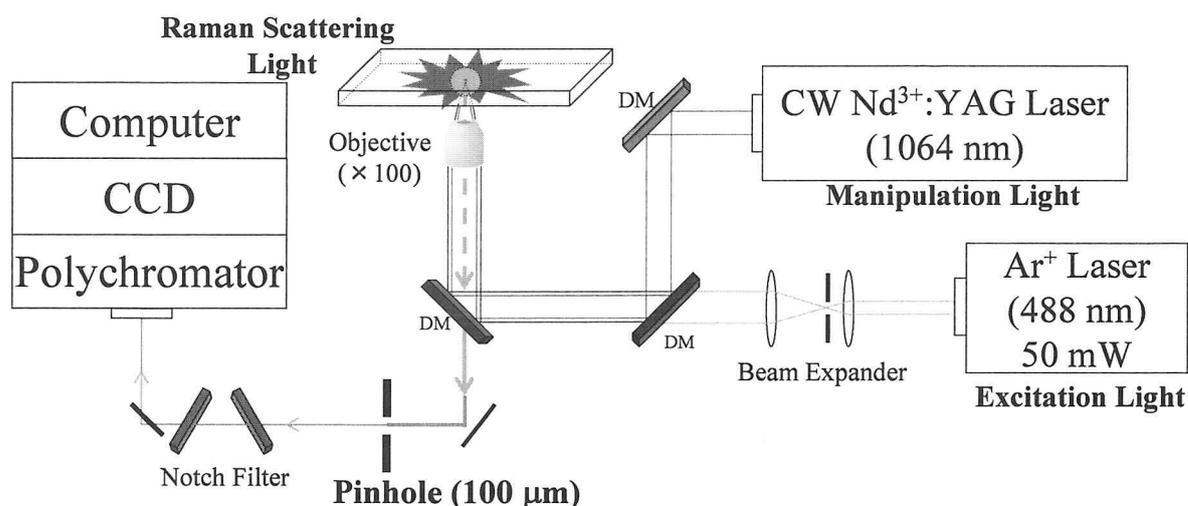


Figure 1: Optical setup of the confocal Raman microscope.

放射圧を発生させる光源としてCW発振型Nd:YAGレーザー（ $\lambda=1064\text{ nm}$ ）、ラマン励起用の光源としてCW発振型のアルゴンイオンレーザー（ $\lambda=488\text{ nm}$ ）を用いた。これらの二本のレーザービームは同軸で倒立型光学顕微鏡に導入され、特注ダイクロイックミラーで反射された後に対物レンズ（ $\times 100$ 、 $\text{NA}=1.3$ ）で試料溶液中の同じ位置に焦点を結ぶ。このダイクロイックミラーの反射率は 1064 nm で 100% 、可視域で 50% となっており、焦点位置に高い放射圧を印加することができる。放射圧が強く働いた領域からのラマン散乱光は、ピンホール（ $d=100\ \mu\text{m}$ ）、二枚のホログラフィックノッチフィルターを通過した後に、分光器/冷却型CCDカメラによって分光検出される。ピンホールにより本光学配置は共焦点型になっており、集光焦点位置のみの分光情報を拾うことができる。本装置の空間分解能は深さ方向 $2.4\ \mu\text{m}$ /水平方向 $0.3\ \mu\text{m}$ 、分光波数分解能は 2.0 cm^{-1} である。

本装置を用い、「放射圧で誘起される高分子系の構造変化」に関して実験を重ね、詳細を考察した。次項に述べる。

<考察> 本研究で対象として取り挙げたのは、代表的な感熱応答型ポリマーであるポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（PIPA）やポリビニルメチルエーテル（PVME）である。PIPAやPVMEは水溶液中で室温から 10 K 程度の温度上昇でコイル→グローブ型への相転移を起こし、巨視的な相分離に至ることはよく知られており、蛋白質のモデル化合物とみなすことが出来る。このような水溶液に 1064 nm レーザー光を集光すると、水が 1064 nm に弱い倍音吸収を有するため光熱効果で温度上昇が誘起され、集光位置に微粒子が形成される。一方、重水溶液中ではそのような光熱効果を無視できるが、純粋な放射圧の凝集効果により、微粒子が形成される。すなわち、PIPAやPVMEは放射圧で形成される高分子高次構造を解析するのに最適なモデル化合物である。振動分光法によるPIPA（PVME）のコイル-グローブ相転移の研究は1990年代より活発に研究されているが、PIPA自身のラマン散乱強度が著しく弱いため、十分な議論が進められていないのが現状である。推進者は、このPIPAやPVMEを対象に、以下のような成果をあげた

溶液中における PIPA/PVME のラマンスペクトルの測定

共焦点型顕微光学配置を採用することにより、ラマン散乱測定におけるバックグラウンド光を大幅に低減し、各種光学系を工夫した。その結果、水溶液/重水中における PIPA 自身の骨格振動に由来するラマンスペクトル（ $500 \sim 2000\text{ cm}^{-1}$ ）を広い波数範囲に渡って取得することに初めて成功した（Fig. 2）。低波数範囲のラマンスペクトルは高次構造に依存しがたいこと、アミド振動散乱帯は高次構造に若干依存すること、アミドの水素原子が重水素原子に置換されると広い波数範囲に渡ってラマンスペクトル形状は影響をうけることなど、重要な知見を得ることができた。尚、PVME に対しても同様のラマンスペクトルの計測に成功している。

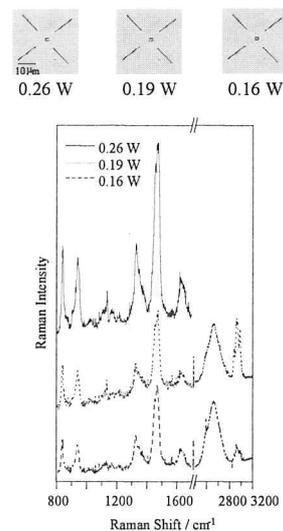


Fig. 2 Optical micrographs of the PNIPA particles produced by Radiation pressure and their Raman spectra.

放射圧による相分離/相転移の実証： 上述の通り、PIPA や PVME の重水溶液中に CW レーザービームを集光すれば、焦点位置に働く純粋な放射圧の効果で分子集合体（微粒子）が形成される。その様子と集合体のラマンスペクトルを図6に示す。やはり、広い波数範囲において S/N 比よくラマンスペクトルが計測されていることがわかる。PIPA や PVME は、ランダムコイル型の高次構造を取って水溶液中に均一に溶解している。そこに強い放射圧が働くと右図のように微粒子が形成されるわけであるが、問題は微粒子における PVME の高次構造である。ランダムコイル型は水和している構造を有し、グローブ型への構造転移は高分子鎖の脱水和により誘起されると考えられており、この水和/脱水和構造も鋭敏にラマンスペクトルに反映される。このような観点から図のラマンスペクトルを詳細に検討したところ、微粒子における PIPA の高次構造はグローブ型であることがわかった。

すなわち、集光レーザービームが創り出す放射圧という擾動によって、蛋白質モデル化合物である PIPA や PVME のコイル→グローブ型の相転移 / 相分離を誘起できることを実証した。それらの様子は右の Fig. 3 のように描けるであろう。

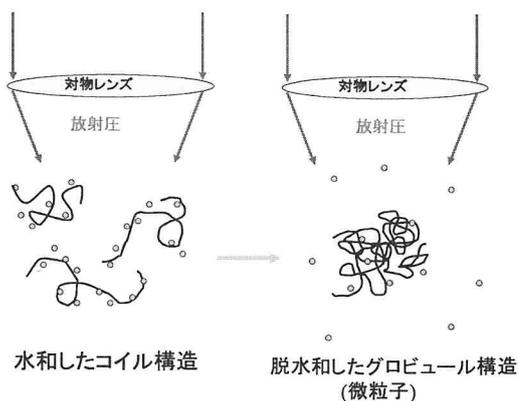


Fig. 3 Illustration of process in laser-induced phase separation/transition of PIPA in D₂O.

PIPA ゲルの放射圧による体積転移： 最近、三澤らは放射圧印加下でロッド状 PNIPAM ゲル（高分子ゲル）の全体的な収縮運動が起こることを報告している（H. Misawa, *et al.*, *Nature*. **2000**, 408, 178）。そこで、この現象の機構を詳細に検討した。

放射圧印加前後における重水中の高分子ゲルの顕微鏡画像 Fig. 4 に示す。放射圧の印加によって放射圧が直接印加されていない領域においても高分子ゲルの収縮が観測されており、その挙動は興味深い。

そこで、開発した装置により、右図で示すような状態において、ラマンマッピングを行った。その結果、放射圧印加下でのゲルの高分子ゲルの脱水和に伴うラマンスペクトルの変化が観測された。さらに、焦点周囲、つまり放射圧が直接印加されていない領域のラマンスペクトルも

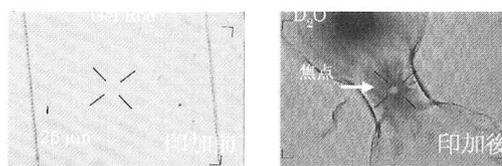


Fig.4 Optical micrographs of PIPA gel before (left) and after (right) the laser irradiation.

測定したところ、定性的には同様の結果が得られた。レーザー光を操作することによって焦点位置以外の振動情報を得ることができる本手法は、このような挙動を示す系において非常に有効であると言え、収縮挙動に関する様々な知見が得られると期待される。

<まとめと展望> 集光レーザービームが創り出す放射圧によって、均一な高分子溶液中の任意の位置に濃度非平衡な凝集状態を作り出すことができる。今回構築した計測システムは、このような集合体のラマンスペクトルを精度よく計測することが出来る。蛋白質モデル化合物である PIPA や PVME を対象に、放射圧によって高次構造変化-相転移/相分離を引き起こすことを実証できた。さらに、PIPA ゲルを対象に、放射圧によってもゲルの体積相転移を誘起できることがわかった。

本手法は、大きな可能性を秘めていると考える。高分子や蛋白質における秩序構造の形成の機構解明は魅力的なテーマであるが、実験的なアプローチは容易ではない。ここでアピールした“放射圧による集合体形成”が一つの解決の糸口になるのではないか。コイル→グロビュール型の転移だけでなく、例えば集合体におけるβシート構造形成とそのラマンモニタリングなどを行うことにより、秩序構造の形成の機構解明に迫れば、と考えている。

<研究発表>

口頭発表 (2004-2005 国際学会招待講演のみ記す)

1. **Y. Tsuboi** “Phase Transition of a Thermo-responsive Polymer by Radiation Pressure of a Focused Laser Beam” 7th *Japan-American Frontiers of Science* (invited poster presentation), (2004. Dec. 10-12, Carifornia).
2. **Y. Tsuboi** “Laser Chemistry of Biomaterials” *International Symposium on Nanostructure Control at Solid Surfaces for the Construction of Nano-molecular / Bio Devices*, (2005, 3.9-10, Sapporo).
3. **Y. Tsuboi** “Laser Chemistry of Biomaterials” *Pacific Rim Conference on Lasers and Electro-Optics 2005* (Jul. 12-15, 2005, Tokyo).

誌上発表 (2004-2005 査読付き原著論文のみ記す)

1. “Pulsed Laser Deposition of Polytetrafluoroethylene Using Fundamental Pulses of a Nd³⁺:YAG Laser”
Yasuyuki Tsuboi, Tomohiro Kuro-Oka, Kentaro Irie, and Akira Itaya
Appl. Phys. A, 78 (2004), 339-342.
2. “Fluorescent Crystalloluminescence of N-isopropylcarbazole”
Yasuyuki Tsuboi, Toshiaki Seto, and Noboru Kitamura
J. Phys. Chem. B, 108 (2004) 2822-2826.

3. “Investigation of Formation Process of Metal Colloids Generated by Laser Ablation in Water: Observation of Ejection of Matter with Microsecond-Time-Resolved-Imaging”
Takeshi Tsuji, **Yasuyuki Tsuboi**, Noboru Kitamura, and Masaharu Tsuji
Appl. Surf. Sci., 229 (2004) 365-371.
4. “Molecular Probe for a Fluorous Medium: Long-Lived Phosphorescence of α -Diketones in Perfluoromethylcyclohexane”
Yasuyuki Tsuboi, Kensaku Okada, Noboru Kitamura
Anal. Sci., 21 (2005) 303-308.
5. “Poly(N-Isopropylacrylamide) Microparticles Produced by Radiation Pressure of a Focused Laser Beam: A structural Analysis by Confocal Raman Microspectroscopy Combined with Laser-Trapping technique”
Yasuyuki Tsuboi, Masayuki Nishino, Tetsuya sasaki, Noboru Kitamura
J.Phys. Chem. B 109 (2005) 7033-7039.
6. “Template-Guided Synthesis and Individual Characterization of Poly(N-Isopropylacrylamide)-Based Microgels”
Hu Yan, Masayuki Nishino, **Yasuyuki Tsuboi**, Noboru Kitamura, and Kaoru Tsujii
Langmuir, 21 (2005) 7076-7079.

(以上)