

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17802

研究課題名(和文)ヘテロダイン検出キラル和周波発生による界面におけるたんぱく質の二次構造の解明

研究課題名(英文)Secondary structures of proteins at interfaces studied by heterodyne-detected chiral VSFG spectroscopy

研究代表者

奥野 将成 (OKUNO, Masanari)

筑波大学・数理物質系・助教

研究者番号：00719065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：1350 cm⁻¹までの低波数領域までのヘテロダイン検出キラル振動和周波発生分光(HD-キラルVSFG分光)を可能とする装置を開発し、キラリティーを持つ分子界面に応用を行った。まず、キラリティーをもつ両親媒性分子(ビナフチル誘導体)の単分子膜を空気/水界面においてin situで測定し、単分子膜レベルのキラリティーの検出に成功した。また、共鳴ラマン散乱の理論を用いることにより、このキラルVSFG信号が対称ラマンテンソルに由来するものであることを世界で初めて示した。また、らせん構造を持つポリ乳酸やポルフィリンの超分子構造へと応用し、界面におけるらせん構造を高感度に検出可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Heterodyne-detected chiral vibrational sum frequency generation (HD-chiral VSFG) spectrometer, which enables us to measure HD-chiral VSFG spectra above 13350 cm⁻¹, has been developed. The spectrometer was applied to various interfaces with chirality. It was shown that HD-chiral VSFG spectroscopy is sensitive enough to detect chirality of monolayers consisting of binaphthyl amphiphiles at the air/water interface in situ. It was experimentally first proved that the chiral VSG signals from monolayers originate from the symmetric Raman tensor by using a resonance Raman scattering theory. Furthermore, chiral VSFG spectroscopy was applied to interfaces having helical structures; poly lactic acid and supramolecular structures containing chiral surfactants and achiral porphyrins. It was shown that helical structures at interfaces can be detected by HD-chiral VSFG spectroscopy with high sensitivity.

研究分野：分子分光学

キーワード：キラリティー 表面・界面 非線形分光

1. 研究開始当初の背景

キラリティーの検出および区別は分光法にとって大きな課題のひとつである。従来のキラル敏感な手法である振動円二色性 (Vibrational Circular Dichroism: VCD)、ラマン光学活性 (Raman Optical Activity: ROA) といった分光法は、生体分子を対象として広く分析に応用されているものの、感度が低いという問題点がある。これはこれらの分光法が光と分子の高次の相互作用である磁気双極子や電気四極子と電場の相互作用に基づいているためである。一方近年、分子の電気双極子と電場の相互作用に基づいた、キラル振動和周波発生 (Vibrational Sum Frequency Generation: VSFG) 分光法が高感度なキラル敏感な手法として注目を集めている。VSFG 分光法は高感度なため単分子膜や薄膜からの信号取得が可能である。近年ではアミドバンド領域における VSFG 分光法は、界面におけるタンパク質の二次構造を区別可能な手法として注目を集めている。しかし、バルク相からの信号発生メカニズムは精査されているのに対して、単分子膜などの界面相からの VSFG 信号発生メカニズムは実験的にほとんど検証されていなかった。特に、VSFG 信号光の波長が測定対象の電子吸収帯に近づいたときに起きる電子共鳴効果についての研究は、単分子膜について行われてこなかった。

2. 研究の目的

キラル VSFG 分光法は現在界面におけるタンパク質の二次構造を決定可能な手法と期待されているが、二次構造の持つキラリティーと信号発生分子科学的な理解はほとんど行われていない。バルク相からのキラル VSFG 信号光は反対称ラマンテンソルのみが寄与していることがわかっているが、界面からのキラル VSFG 信号において対称ラマンテンソルおよび反対称ラマンテンソルがどのように寄与しているのか、実験的に解明することを目指す。特に、単分子膜からのキラル VSFG 信号が、どのような電子共鳴効果によって発生するのかを明らかにする。さらに、 α ヘリックスなど生体分子はらせん構造を持つことでキラリティーを発現することから、らせん構造を持つ分子から発生するキラル VSFG 信号が分子の配向により受ける影響について研究を行う。本研究では、ヘテロダイナミック検出キラル VSFG 分光法を用いることで、非常に高感度にキラル VSFG 信号光が検出し、さらに信号の“位相”情報から電子共鳴および分子配向に関する情報を得ることを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、フェムト秒チタンサファイア増幅器 (3.3 mJ, 1 kHz, 800 nm) からの出力を用い、光パラメトリック増幅器に導入することにより、200 cm^{-1} 程度のスペクトル幅を持つフェムト秒赤外光 (波長 3 μm ~ 8 μm) と 10 cm^{-1} 程度の狭いスペクトルをもつピコ秒可視光を得、それらを時空間的に試料にて重ね合わせることでキラル VSFG 信号光を得た。試料からの VSFG 信号発生の前に、極薄水晶板に赤外光・可視光を照射することにより得た SFG 光を局所発振器とし、局所発振器を赤外光・可視光に対して時間的に遅延させることにより、分光器内で試料からの VSFG 信号光と干渉させ、ヘテロダイナミック検出を達成した。偏光配置を PSP (左から VSFG 光、可視光、赤外光の変更を表す) とすることにより、キラル VSFG 信号のみを選択的に取得した。本装置により、3500 cm^{-1} から 1300 cm^{-1} 程度の振動バンドをヘテロダイナミック検出キラル VSFG 分光が可能であることを示した。

さらに、可視光を得るために 400 nm 励起の光パラメトリック増幅器を用い、さらに非線形光学結晶を用いて波長変換を行うことにより、可視光の波長を 350 nm の紫外領域から 800 nm 程度の近赤外領域まで可変とすることができる。この可変性を用いることにより、さまざまな可視光波長でキラル VSFG 分光を行い、励起プロファイルを作成した。本研究ではヘテロダイナミック検出を用いているため、振動バンドの“位相”に関する情報を得ることができる。従来の励起プロファイルは、信号強度を信号光波長に対してプロットしたものであったが、本研究ではこれを拡張し、振動バンドの“位相”の励起プロファイルをはじめとして作成した。振動バンドの位相は、信号発生における電子共鳴効果のメカニズムに関する情報を与えることが期待される。

4. 研究成果

ヘテロダイナミック検出キラル VSFG 分光法を用いて、(1) ビナフチル誘導体単分子膜およびビナフトール溶液のキラル VSFG 信号の電子共鳴メカニズムの解明、および(2) らせん構造を持つポリ乳酸薄膜からのキラル VSFG 信号発生と分子配向解析 についての研究を行った。

(1) 空気/水界面に形成した両親媒性のビナフチル誘導体単分子膜および 1, 1, ビ-2-ナフトール溶液について、可視光波長を 350 ~ 400 nm と変化させ、そのときの 1300 ~ 1600 cm^{-1} におけるヘテロダイナミック検出キラル VSFG スペクトルおよび単分子膜についてはアキラル VSFG スペクトルもあわせて取得した。VSFG 信号の波長に対して、VSFG 信号の信号バンドの強度および位相をプロットした励起プロファイルを作成した。ビナフトール

溶液からのキラル VSGF 信号はバルク相に由来することがわかっており、これを比較対象としてピナフチル誘導体単分子膜からのデータを検討した。実験と比較した計算モデルとして、共鳴ラマン散乱の理論において、Albrecht の理論に非断熱補正を加えたものを用い、ラマンテンソルの波長依存性を実験条件にあわせて計算した。通常 Albrecht の理論では対称ラマンテンソルを A 項と振電相互作用に由来する B 項に分けるが、非断熱補正を加えることにより、B 項をさらに対称および反対称項に分けることができる。ピナフチル系の分子は 335 nm 付近に二つの電子吸収帯を持つ。この二つの吸収帯の帰属として、励起子カップリングと振電構造であるという二つの説が提唱されている。本研究では、ラマンテンソルの A 項、対称 B 項、反対称 B 項の波長依存性を、これら二つの帰属に基づいてそれぞれ計算し、実験結果と比較し、それぞれの優劣を検討した。

実験から得られたピナフトール溶液からのキラル VSGF 信号から作成した信号強度および位相の励起プロファイルは、非常に大きな波長依存性を示した。電子吸収帯付近では非常に大きな共鳴効果を示したのに対して、可視光の波長を 20 nm 長波長に変えた際にはその 1/10 以下の信号しか得られなかった。この大きな波長依存性は先行研究と一致し、ピナフトール溶液からのキラル VSGF 信号がバルク相に由来し、反対称 B 項だけが寄与していることを示唆する結果が得られた。一方、ピナフチル誘導体単分子膜から得られたアキラルおよびキラル VSGF 信号の強度および位相の励起プロファイルは、ピナフトール溶液から得られたものと比較して、緩やかな波長依存性を示し、定性的に異なる結果が得られた。これは、バルク相から信号が発生するピナフトール溶液と、ピナフチル誘導体単分子膜では電子共鳴効果のメカニズムが異なることを示している。これは、ピナフチル単分子膜からのアキラルおよびアキラル VSGF 信号における共鳴効果が、反対称 B 項に由来するのではなく、対称ラマンテンソルに由来することを意味している。さらに、実験で得られた励起プロファイルをモデル計算と比較することにより、単分子膜からのアキラルおよびキラル VSGF 信号は、A 項ではなく対称 B 項に由来していることを示唆する結果が得られた。加えて、位相の励起プロファイルを用いることにより、励起子カップリングではなく振電相互作用に基づいた電子状態を 335 nm に仮定して計算した対称 B 項が、もっともよく単分子膜からの信号を再現することが分かった。

これらの結果は、界面からのキラル VSGF 信号が反対称でなく対称ラマンテンソルに由来することを世界で初めて実験的に証明したものであり、Journal of Physical Chemistry C に掲載された。

(2) らせん構造をもつポリ乳酸薄膜からのキラル VSGF 信号とポリ乳酸の分子配向の関係を検討した。ポリ乳酸はらせん構造を取り、その方向はモノマーである乳酸のキラリティーを反映することが知られている。さらに、ポリ乳酸を薄膜にしたのちアニーリングしたとき、アニーリング温度によって異なる結晶構造を取ることが知られている。試料の作製方法を同一としたとき、ポリ-L-乳酸およびポリ-D-乳酸薄膜から得られたヘテロダイン検出キラル VSGF 信号の符号が反転することが CH 伸縮振動およびアミド領域において観測された。これはらせん構造の向きが反対であることを示している。一方、ポリ-L-乳酸についてアニーリング温度を変化させると、120 よりも高温でアニーリングした試料と低温でアニーリングした試料から、信号強度だけでなく位相が反転した信号が得られた。これは、らせん構造の配向がアニーリング温度によって変化し、ヘテロダイン検出キラル VSGF 信号の符号に反映されていると考えられる。一方、アキラルな VSGF スペクトルはアニーリング温度に全く依存せず、キラルなスペクトルと異なる挙動を示した。これはそれぞれのスペクトル成分を与える分子種が異なっていることを示唆している。本研究では、アキラルな成分は C₁₀ 対称性を持つ一本のらせん構造から、アキラルな成分は D₂ 対称性を持つらせん構造が反平行に配置した分子種に由来すると考えた。

キラル VSGF 信号のアニーリング温度依存性を説明するため、D₂ 対称性を持つ反平行ならせん構造の与える超分極率を量子化学計算によって検討した。報告されているポリ乳酸における原子配置に基づいてモデル分子を配置し、各モデル分子の配向および振動の位相を考慮に入れて足し合わせることで、らせん構造の CH₃ 伸縮振動および反対称伸縮振動の超分極率を計算した。この計算した超分極率を用いて、実験で得られた CH₃ 伸縮振動および反対称伸縮振動の符号をらせん構造の分子配向を求めることを試みた。その結果、高温でアニーリングした試料についてはらせん構造のヘリックスの軸が界面に対して垂直に近い配向を、低温でアニーリングした試料についてはヘリックスの軸が界面に対して平行に近い配向を取っていると推測した。

この結果は、らせん構造を持つ分子がその配向によってキラル VSGF 信号の符号が変化することを示しており、ヘリックス構造をとるタンパク質やペプチドの分子配向を検討する際にキラル VSGF 分光が有用であることを意味している。さらに、これらの結果は信号の位相(符号)が決定可能なヘテロダイン検出で初めて明らかになったものであり、従来法では得られなかった結果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- (1) M. Okuno, D. Ishikawa, W. Nakanishi, K. Ariga and T. Ishibashi, "The Symmetric Raman Tensor Contributes to Chiral Vibrational Sum Frequency Generation from Binaphthyl Amphiphilic Monolayers on Water –Study of Electronic Resonance Amplitude and Phase Profiles", *Journal of Physical Chemistry C*, in press. (査読有)
- (2) N. Takeshita, M. Okuno and T. Ishibashi, "Molecular Conformation of DPPC Phospholipid Langmuir and Langmuir-Blodgett Monolayers Studied by Heterodyne-detected Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy", *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19, 2060-2066 (2017). (査読有)
- (3) H. Kano, H. Segawa, M. Okuno, P. Leproux and V. Couderc, "Hyperspectral Coherent Raman Imaging ~principle, theory, instrumentation, and application to life sciences~", *Journal of Raman Spectroscopy*, 47, 116-123 (2016). (査読有)
- (4) M. Okuno and T. Ishibashi, "Sensitive and Quantitative Probe of Molecular Chirality with Heterodyne-detected Doubly Resonant SFG spectroscopy", *Analytical Chemistry*, 87, 10103-10108 (2015). (査読有)
- (5) M. Okuno, T. Tokimoto, M. Eguchi, H. Kano, T. Ishibashi, "Intensity Enhancement of Vibrational Sum Frequency Generation by Gap-mode Plasmon Resonance", *Chemical Physics Letters*, 639, 83-87 (2015). (査読有)
- (6) M. Hishida, Y. Kaneko, M. Okuno, Y. Yamamura, T. Ishibashi and K. Saito, "Salt-induced water orientation at a surface of non-ionic surfactant in relation to a mechanism of Hofmeister effect", *Journal of Chemical Physics*, 142, 171101 (2015). (査読有)
- (7) M. Okuno and T. Ishibashi, "Heterodyne-detected Achiral and Chiral Vibrational Sum-Frequency Generation Spectroscopy of Proteins at Air/Water Interface", *Journal of Physical Chemistry C*, 119, 9947-9954 (2015). (査読有)

〔学会発表〕(計 18 件)

【招待講演発表】

- (1) 奥野将成, 「ヘテロダイン検出キラル振動和周波発生法による超高感度キラリティー検出」, 先端的レーザー分光の若手シンポジウム, 学習院大学, 東京都豊島区, 2016 年 12 月 3 日.
- (2) T. Ishibashi, M. Okuno, 「Chiral VSFG Spectroscopy under Electronic Resonant

Conditions」, 7th SFG meeting, 東京都目黒区, 2016 年 6 月 10 日.

- (3) M. Okuno, T. Ishibashi, 「Molecular Orientation and Conformation of Fluorinated Polymers at Interfaces Studied by Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy」, SCIX2016, Minneapolis, USA, 2016 年 9 月 18 日~9 月 23 日.
- (4) 奥野将成, 「高効率な線形および非線形振動分光手法の開発と応用」, 日本分光学会年次講演会, 大阪府豊中市, 2016 年 5 月 24 日~5 月 26 日.
- (5) T. Ishibashi, M. Okuno, 「Heterodyne-detected chiral VSFG of bulk liquids and liquid interfaces」, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii, USA, 2015 年 12 月 15 日~12 月 20 日.

【一般講演発表】

- (6) 本間脩, 奥野将成, 宮嶋達也, 石橋孝章, 「ヘテロダイン検出振動和周波発生分光法による含フッ素ポリマーの界面配向解析」, 高分子分析討論会, 愛知県名古屋市, 2016 年 10 月 20 日~10 月 21 日.
- (7) 奥野将成, 本間脩, 宮嶋達也, 石橋孝章, 「Molecular Orientational Study of Fluorinated Polymers at Interface by Heterodyne-detected Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy」, 第 7 回 SFG 研究会, 東京都目黒区, 2016 年 6 月 10 日.
- (8) 奥野将成, 石橋孝章, 「キラル VSFG 分光法によるらせん構造を持つポリマー界面の配向解析」, 分子科学討論会, 兵庫県神戸市, 2016 年 9 月 13 日~9 月 15 日.
- (9) 山田周平, 奥野将成, 中西和嘉, 有賀克彦, 石橋孝章, 「メラミン誘導体とバルビツール酸が気水界面につくる超分子構造のヘテロダイン検出振動 SFG 分光」, 分子科学討論会, 兵庫県神戸市, 2016 年 9 月 13 日~9 月 15 日.
- (10) 竹下尚樹, 奥野将成, 石橋孝章, 「固液界面観測のためのヘテロダイン検出全内部反射振動 SFG 分光装置の開発」, 分子科学討論会, 兵庫県神戸市, 2016 年 9 月 13 日~9 月 15 日.
- (11) 奥野将成, 本間脩, 宮嶋達也, 石橋孝章, 「ヘテロダイン検出振動和周波発生分光法による界面における含フッ素ポリマーの配向解析」, 日本分光学会年次講演会, 大阪府豊中市, 2016 年 5 月 24 日~5 月 26 日.
- (12) 奥野将成, 石川大輔, 中西和嘉, 有賀克彦, 石橋孝章, 「ピナフチル系の振動電子二重共鳴 SFG 分光: 電子共鳴効果の研究」, 分子科学討論会, 東京都目黒区, 2015 年 9 月 16 日~9 月 19 日.
- (13) 竹下尚樹, 奥野将成, 石橋孝章, 「ヘテロダイン検出振動 SFG 分光法によるリン脂

質 DPPC の L 膜および LB 単分子膜の分子構造の研究」、分子科学討論会、東京都目黒区、2015 年 9 月 16 日～9 月 19 日。

(14) 深谷和玄、奥野将成、力山和晃、勝本之晶、石橋孝章、「振動和周波発生分光法による PNiPAm 薄膜のイソプロピル基の配向解析」、分子科学討論会、東京都目黒区、2015 年 9 月 16 日～9 月 19 日。

(15) M. Okuno、T. Ishibashi、「Heterodyne-detected Chiral Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy」、15th International Conference on Chiroptical Spectroscopy、北海道札幌市、2015 年 8 月 30 日～9 月 3 日。

(16) 奥野将成、石橋孝章、「ヘテロダイナミック検出キラル振動和周波分光法の開発」、日本分光学会年次講演会、東京都目黒区、2015 年 6 月 3 日～6 月 5 日。

(17) 深谷和玄、奥野将成、力山和晃、勝本之晶、石橋孝章、「ヘテロダイナミック検出振動和周波発生分光を用いた PNiPAm 薄膜の配向解析」、日本分光学会年次講演会、東京都目黒区、2015 年 6 月 3 日～6 月 5 日。

(18) 竹下尚樹、奥野将成、石橋孝章、「リン脂質 DPPC の L 膜および LB 膜のヘテロダイナミック検出振動 SFG 分光」、日本分光学会年次講演会、東京都目黒区、2015 年 6 月 3 日～6 月 5 日。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥野 将成 (OKUNO, Masanari)

筑波大学・数理物質系・助教

研究者番号：00719065

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし