

脂質膜と生体分子間相互作用観測のための 全内部反射ラマン分光装置の構築

数理物質系化学域 近藤 正人
数理物質科学研究群化学学位プログラム 佐野有里紗
数理物質系化学域 石橋 孝章

【はじめに】

細胞膜は生物を構成する基本的な要素の一つであり、物質輸送や生化学反応が起きる重要な場である。膜の近傍では、細胞内にあるタンパク質やペプチドなどの生体分子が、膜に吸着、侵入したり、逆に膜から脱離したりと、様々な形で膜と相互作用する。膜近傍で起きる生化学過程を理解するには、膜と生体分子間の相互作用を感度よく捉えることが不可欠である。

相互作用が、分子のどの部位で、どのような変化を通して起きるのか、これらを分子レベルで明らかにすることを考えた際、分子の局所的な構造変化に敏感な振動スペクトル測定は有効な手段となる。しかし、これを単純に適用しただけでは、膜と生体分子間の相互作用を検出することは難しい。その理由は、「膜と相互作用していない分子」に由来する背景信号が、興味ある「膜と相互作用している分子」の信号検出を妨げるためである。もう少し詳しく述べると、相互作用を観る際には、標的分子の添加前後で

得たスペクトルの差を取る方法が一般に用いられるが、この方法をただ適用しただけでは、膜と相互作用している分子も、そうでない分子も、同じ強度でスペクトルに寄与してしまう。このため、興味ある相互作用を反映した信号だけを得るには、背景信号として大きく寄与する相互作用を反映していない信号を正確に除く必要がある。このことが難しいのである。

この困難を克服するために、界面を利用するという視点を取り入れたことが、我々のアイデアである。その要は、固体と液体の界面（固液界面）に平面脂質二重膜を準備し、その標的となる生体分子が溶液相にあるときとないときの違いを界面敏感な分光法で検出することである（図1）。この系では、膜は界面にだけ存在しているため、ここに界面敏感な分光法を適用させると、「膜と相互作用している分子」由来の振動スペクトルを、「相互作用していない分子」由来のものに比べて、高い比率で検出できる。

このアイデアを実現するために、我々は装置構築のレベルから研究に取り組んできた。本稿では、膜と生体分子間相互作用の高感度検出実現のための界面敏感なラマン分光装置の構築の話題に焦点をあて、これまでの取り組みを述べる。

【ラマン分光とその界面敏感検出の原理】

ラマン分光は、分子の振動スペクトルを得る代表的な手法である。励起光を試料に入れた際、試料から生じる散乱光には、励起光とは異なる振動数のものが含まれる。これは、試料分子と光の間でエネルギーのやり取りが起こったためである。励起光に比べて低振動数（低エネルギー）側に現れる散乱光は、光の

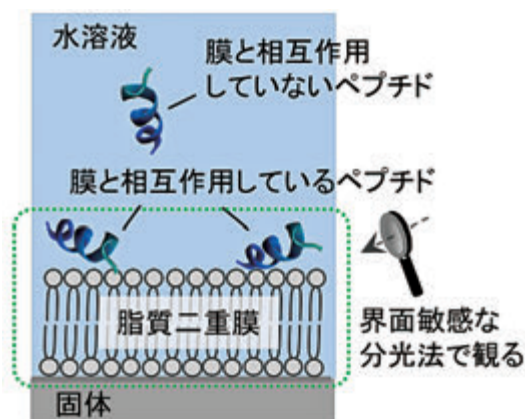


図1 本研究のアイデア

エネルギーが分子の系の振動状態を励起する（激しい振動を示す分子が多くある状態に遷移させる）のに使われたことを反映している。散乱光と励起光の振動数差（ラマンシフト）は、分子振動数に対応する。振動数ごとに散乱光強度を測定し、散乱光強度をラマンシフトに対してプロットすることで、振動スペクトルを得ることができる。

このラマン分光法を、前節で述べたアイデアに従って、膜と分子の相互作用の系に応用するには、界面敏感な検出を実現しなければならない。これは、全内部反射現象を利用することで実現できる。ラマン分光で用いる励起光を、プリズムを用いて全内部反射条件を満たすように試料に入射させると、試料側に励起光の浸み出し波が生じる。この浸み出し波は、界面からの距離とともに強度が指数関数的に減衰するため、これを利用すると、浸み込み深さ程度の界面近傍領域からの振動スペクトルだけを検出できる。界面近傍に限定された微小な空間領域からのラマン散乱光の強度は非常に小さいが、開口数の大きい対物レンズを用いて高効率で測光することで、単一分子層レベルの界面活性剤会合膜からのラマンスペクトルをも得られることが示されている。[E. Tyrode et al, *J. Am. Chem. Soc.* 130, 17434 (2008)]

この全内部反射ラマン分光法で膜の系を測定するには、原理的には全内部反射に用いたプリズム上に脂質二重膜試料を準備すればよい。だが実際には、それほど単純ではなく、精度良い測定を実現するに

は、いくつかの困難があった。これまで我々が直面してきた問題と、それを解決するために装置にどんな工夫を凝らしてきたかを、次節以降で述べる。

【脂質膜測定用のセルと分光装置試料部の試作】

全内部反射ラマン分光で膜と分子の相互作用の系を測定しようとした際、まず考えなければいけないのは、信号強度の確保である。界面に保持した単一分子層の脂質膜からの微弱なラマン散乱光を観るために、開口数の大きい対物レンズを用いて、ラマン散乱光を高効率で測光する方法を採用した。だが、こうした対物レンズの作動距離（レンズから試料までの距離）は短い。このため、分光装置の試料部には、プリズム（試料セル）および対物レンズ（集光光学系）を短い距離に配置しなければならない。

はじめに試作した分光装置試料部の概要図を図2aに示す。この装置では、波長532 nmの励起レーザー光をシリカ半球プリズム（直径20 mm）を用いて全内部反射条件を満たす角度で試料に入射させ、試料側に生じたラマン散乱光を対物レンズ（開口数0.45、作動距離6.9-8.2 mm）を用いて測光した。ラマン光を励起光の逆側から測光する方式（背面測光方式）としたのは、対物レンズの作動距離の制限を受けずに、後述の膜試料準備の際に扱いやすいサイズの大きなプリズムを使うためである。膜試料は、プリズムと水溶液の界面に準備する。そのため、プリズムを固定でき、なおかつ溶液のリザーバーも兼ねるテフロン製のセルを設計した。対物レンズの作動距離



図2 (a) 試料部の概要、(b) 半球プリズムを用いたセル（第一号機）の写真、(c) 固液界面のリン脂質二重膜のラマンスペクトル

と開口数を考慮して、このレンズで測光できる領域がテフロン部分で遮られないように、セルの厚みとリザーバー穴の直径を決定した。また、このセルを装置に固定するためのジュラルミン製のホルダーも設計した。セルの工作は、工作部門の公開工作室にて、工作部門の教職員の先生方の指導を受けながら、当研究室所属の学類生・大学院生が行った。図2bに、セルの第一号機の写真を示す。

この半球プリズムと水溶液の界面に、脂質二重膜試料を準備し、まず二重膜試料からのラマンスペクトルが得られるかを試験した。脂質二重膜試料は、Langmuir Blodgett (LB) および Langmuir-Schaefer (LS) 法に基づき、まず、プリズム上にリン脂質単分子膜を累積させ、これをセルのリザーバー部分に準備した水上単分子膜を合わせて作製した。この際、プリズムを水から引き揚げたり、セルに載せたりする操作が含まれるが、これらの操作は、プリズムサイズが十分な大きさだからこそできたことを強調しておきたい。以上の操作で準備した、シリカプリズム-水溶液界面のリン脂質二重膜からの全内部反射ラマンスペクトルを図2cに示す。このように、単分子層レベルの脂質二重膜からのラマンスペクトルを得ることができた。

【測定精度改善のためのセルの改良】

第一号機のセルを利用した試作装置で、単分子層レベルの脂質二重膜からのラマンスペクトルを測定できるだけの検出感度があることを示せた。その

一方、この試作装置には、得られるラマンスペクトルの強度に、測定ごとに大きなばらつきがある問題があった。本装置では、膜試料をプリズム上に準備しなければならない。そのため、第一号機のセルでは、試料を交換するたびにプリズムを装置から取り外す必要があった。プリズムを全く同じように再度装置に設置するのは非常に困難であり、これがばらつきの問題の要因であった。興味ある膜と生体分子の相互作用を検出するためには、溶液相に生体分子があるときとないときの差を取る必要がある。このため、ばらつきを抑え、精度を確保することは、不可欠な課題であった。

そこで、装置の試料部に設置するプリズムを、シリカ半円筒プリズム（直径20 mm、高さ40 mm）に変更することを着想した。図2aのように配置した際、半円筒プリズムでは、プリズムの高さ方向（紙面の垂直方向）の移動に対して、等価な条件で測定できる。この着想に基づき、溶液を保持するためのリザーバー部分を二つ持つテフロンセルおよびホルダーの設計を行い、第二号機として公開工作室で作製した。図3aに、セルおよびホルダーの第二号機の写真を示す。半円筒プリズムセルの位置を微調整できるよう、傾斜、回転、並進ステージを試料部に取り入れて、装置全体を組み直した。この装置で、セルの二つの試料部で脂質二重膜の試料を測定した結果（図3b）、二つの試料部からほぼ同じ強度のスペクトルが得られた。セルを装置に設置したまま、二つの試料を並進ステー

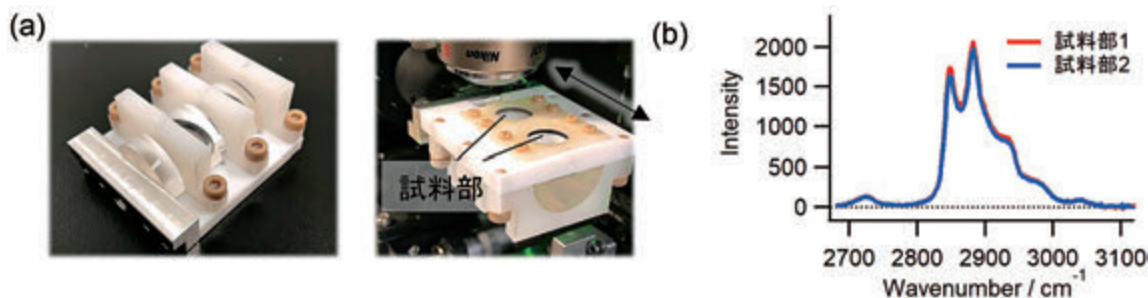


図3 (a) 半円筒プリズムを用いた二つの試料部を持つセル（第二号機）の写真、(b) それぞれの試料部で得た固液界面のリン脂質二重膜のラマンスペクトル

ジの調整だけで切り替えて測定できるようになり、精度の問題を大きく改善することができた。

【測定精度と使いやすさ向上のための試料部の変更】

半円筒プリズムを用いた二つの試料部を持つセル(第二号機)の実装で、測定精度の問題は大きく改善された。だが、一方、測定精度を出すための分光装置の光学調整は、非常に煩雑で時間のかかる作業である。半円筒プリズムの傾斜や並進位置を厳格に調整しなければ、二つの試料部で同じ強度のスペクトルは得られない。加えて、試料を作り直す際には、一号機同様に、プリズムを装置から取り外す必要がある。このため、その際の再現性を得るには、その都度光軸調整を厳格に行う必要があり、測定開始までに非常に時間がかかる問題があった。また、背面測光方式を採用しているため、試料側の媒質の屈折率の違いにより、対物レンズの最適な位置が異なる問題もある。

そこで、シリカ台形プリズム(底面 28 mm×20 mm、高さ6 mm、仰角 45°)を用い、プリズムの実効的なサイズは変えずに、ラマン光を励起光と同じ側で測光する方式に変更することを着想した(図

4a)。試料溶液のリザーバーをプリズムの下側に配置し、試料交換はリザーバー内の溶液だけを交換して行うことで、交換の際の光軸調整変更の必要を一切なくすることが、この方式のポイントである。

この変更に必要な部品は、台形プリズムを装置に固定するためのプリズムホルダーと、リザーバー、および、リザーバーを装置に固定するホルダーである。ジュラルミン製のプリズムおよびリザーバーホルダー、テフロン製のリザーバーを設計し、公開工作室で作製した。これらの部品を装置に組み込んだ写真を図4bに示す。リザーバーにはプリズムとは独立に並進ステージを取り付けており、高さ方向に動かしてプリズムを溶液面につけたり、溶液面から離したりできるような設計となっている。このため、脂質二重膜試料の準備を装置に組み込んだまま行うことができる。また、新しい方式では、励起光をプリズム底面に対して平行に入射させた際に、プリズム底面中央付近で全反射するような設計にしているため、励起光を斜めに打ち上げてプリズムに入射させていたこれまでの方式に比べて、光軸調整が格段に行いやすくなった。装置全体を組み直し、リン脂

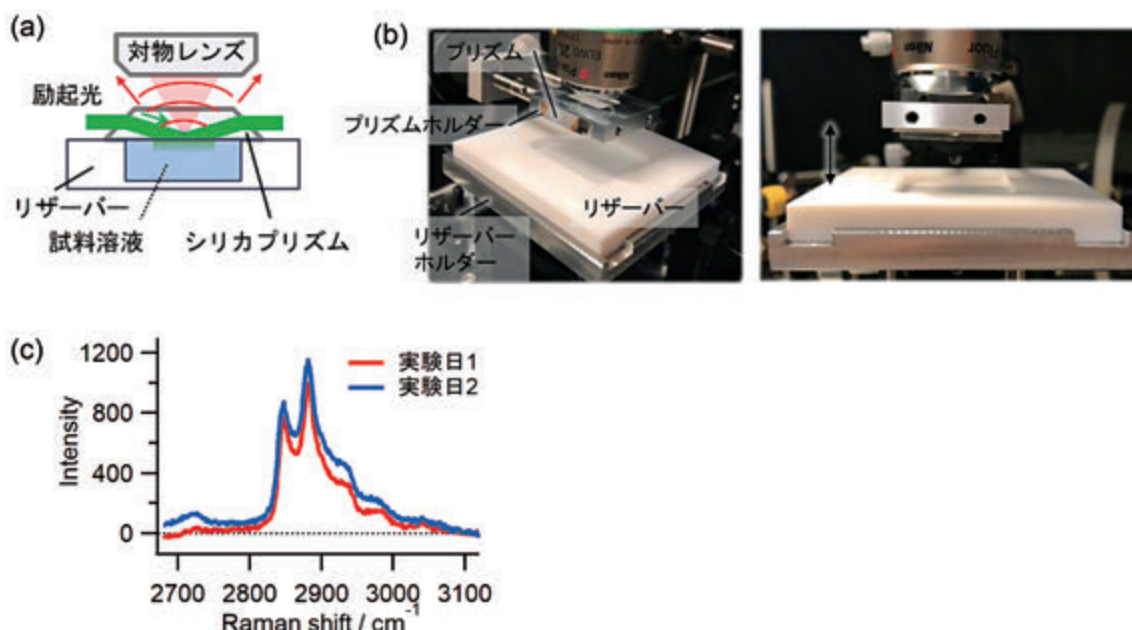


図4 (a) 台形プリズムを用いた試料部の概要、(b) プリズムホルダー、リザーバー、リザーバーホルダーの写真、(c) 別々の日取りの実験で得た固液界面のリン脂質二重膜のラマンスペクトル

質二重膜のスペクトルの試験測定を行った。得られたスペクトルを図4cに示す。測定日ごとのばらつきが抑えられており、着想の通りに、精度および使いやすさの向上を実現できた。

【まとめ】

脂質膜と生体分子間相互作用の高感度検出を、界面敏感な振動分光法である全内部反射ラマン分光法の適用により実現することを目指し、装置構築のレベルから研究してきた。分光装置の試料部、特にプリズムセルやそのホルダーに関して、工作部門の先生方の協力を受けながら、試作から改良を重ねてきた。現段階で、シリカプリズムと水溶液界面に準備したリン脂質二重膜からの単一分子層のレベルのラマンスペクトルを精度よく測定できるようになり、溶液

相に標的となる生体分子を加えて、相互作用検出の実験に挑戦できる段階まで到達した。

【謝辞】

分光装置構築に必要な部品の設計や製作に関して、研究基盤総合センター工作部門の先生方と職員の皆様に多大な協力を頂いた。製作が困難な部品に対しても、丁寧かつ真摯に対応して頂いた。また、本稿で取り上げた部品のほかにも、振動和周波発生分光や過渡回折格子法などの分光法を固液界面の脂質二重膜の系に応用するために必要な部品について、製作面で支えて頂いている。心より感謝申し上げたい。本研究は、理工学群化学類卒業生の江波静夏氏、林田幸之介氏、張欽坤氏と共同で行った。ここに感謝の意を示す。