

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 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：2012～2013

課題番号：24655004

研究課題名(和文)キラル敏感非線形ラマン分光法による溶液中タンパク質の絶対立体配置の高速決定

研究課題名(英文)high-speed detection of absolute steric configuration of proteins in solution using chiral-sensitive nonlinear Raman spectroscopy

研究代表者

加納 英明(KANO, Hideaki)

筑波大学・数理物質系・准教授

研究者番号：70334240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新しい光源、白色レーザーを用いることで、分子のキラリティーを検出するまったく新しい測定手法の開拓を行った。まず初めに、分光干渉法を取り入れた全く新しいシステムの構築を試みた。その結果、キラル由来のCARS光について、光電場の実部及び虚部の同時測定を実現した。さらに、白色レーザーの発生に用いるフォトニック結晶ファイバーに、近赤外及び可視の二つの波長のレーザー光を導入することで、可視域白色レーザー発生を実現し、可視域CARS-ROAの実験装置を立ち上げた。その結果、信号対雑音比が格段に向上した結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we used a new laser source, namely white-light laser source to develop a spectroscopic system which is capable of detecting molecular chirality. First, we employed spectral interferometric technique to improve the sensitivity of the system. As a result, we measured real and imaginary parts of the optical electric field due to the chiral CARS process. Next, we introduced two-color (visible and near infra-red) laser pulses into a photonic crystal fiber in order to extend spectral coverage of the white-light laser. With the use of the visible white-light laser source, we have successfully developed CARS-ROA system in visible, and found improvement of the signal-to-noise ratio.

研究分野：基礎化学

科研費の分科・細目：物理化学

キーワード：キラリティ ラマン CARS 非線形

1. 研究開始当初の背景

物質のキラリティーは、生命の発生、タンパク質の機能発現、サリドマイドの催奇作用など、化学・薬学・生命科学の分野を横断する非常に重要な分子の構造情報であり、これまで様々な方面から研究が行われている。キラリティーを識別する一般的な方法として、可視及び近紫外領域の円偏光二色性(Circular Dichroism: CD)及び旋光性(Optical Rotation: OR)が挙げられる。しかしながら、これらの方法は分子の構造情報に乏しく、間接的な知見しか得ることが出来ない。これに対して、赤外領域のCD(Vibrational Circular Dichroism: VCD)及び旋光分散(Vibrational Optical Rotatory Dispersion: VORD)、また、ラマン分光を用いた光学活性測定(Raman Optical Activity: ROA)は、振動スペクトルに基づいた分子レベルの構造情報を得ることが出来るため、例えば水溶液中におけるタンパク質の絶対立体配置が決定できるなど、生体分子の機能を知る上で、重要な知見を得ることが出来る。振動スペクトルは可視、近紫外領域の電子スペクトルに比べ、分子振動に対応した数多くのピークをもつため、ROA や VCD では分子レベルの豊かかつ詳細な構造情報が得られる。

ROA は Barron らによって 1973 年に初めて観測されて以来、装置の改良、計算手法の確立がなされてきた。現在では単純な分子の液相及び溶液中での絶対立体配置を ROA スペクトルと計算との比較によって精密に決定する事が可能である。しかしながら、ROA の信号強度は、測定されるラマン散乱光強度の 10^{-3} 程度と、非常に小さい。そのため、タンパク質水溶液のような試料では、通常測定に 1 時間以上を要し、測定に困難を極める。申請者は最近、非線形ラマン分光法の一つであるコヒーレント・アンチストークス・ラマン散乱(Coherent Anti-Stokes Raman Scattering: CARS)を用いることで、分子のキラリティー検出に世界で初めて成功した。これにより、非線形ラマン分光法が極めて有効であることを示した。

2. 研究の目的

本研究では、新しい光源、白色レーザーを用いた分光干渉法(spectral interferometry)を用いることで、CARS-ROA スペクトルの高速取得実現を目指す。分光干渉法とは、スペクトル広がりを持つ信号光と局部発振光(ローカル・オシレーター:LO)とを分光器内で干渉させることにより、信号光の振幅・

位相を検出する方法である。通常の光検出では、信号光の位相情報は失われてしまうが、分光干渉法では、光検出前に LO 光との混合を行うことで、信号光の振幅・位相成分を同時に抽出することが出来る。これに加えて、信号光は LO 光により増幅して検出することが出来るため、キラリティーに由来する極めて小さい信号成分を検出することが可能になる。生体分子のほとんどがキラリティーを持っていること、そして、タンパク質の機能発現がその構造に依っていることを考えると、ROA の高速測定・高速時間分解測定は、タンパク質の機能発現のダイナミクスについて、他の方法では得られないユニークな情報を提供することができる。

3. 研究の方法

本研究では、非線形ラマン散乱の中で最もよく用いられている coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)を採用した。CARS 過程では、一般に波長の異なる二つのレーザー光 (ω_1 , ω_2 光)を用いる。これら二つの入射光の振動数差 $\omega_1-\omega_2$ が試料分子の持つ振動モード(化学結合に対応する)の角振動数 Ω と一致すると、多数の試料分子の振動モードが共鳴的に励振される。このようにして生じた分子振動は、分子が三つ目のレーザー光(ω_1 光)と相互作用することにより、 ω_{CARS} 光として取り出される。エネルギー保存則から、 $\omega_{\text{CARS}}=2\omega_1-\omega_2$ であることが要請される。CARS 過程の大きな特徴の一つとして、 ω_{CARS} 光の信号強度が ω_1 光の強度の二乗に比例する、すなわち、 ω_{CARS} 光の信号強度が ω_1 光の強度に対して非線形に増大する、ということが挙げられる。これを効果的に用いることにより、キラル由来のラマン散乱光を増幅し、効率的に検出することが可能になる。

本研究のもう一つの特色として、フランス人研究者との国際研究協力が挙げられる。フランス側共同研究者は、フォトニック結晶ファイバー(photonic crystal fiber; PCF)を用いた白色レーザーの発生について極めて高度な技術を有している。彼らは世界に先駆けて PCF 中の光パルスの伝搬特性を研究し、PCF の設計から実際の製作まで、一連の工程を自身の研究室にて行う実績を持つ。光源開発について、国際的な共同研究体制を取ることで、本研究に最適化された光源を用いることが可能である。

4. 研究成果

本研究では、新しい光源、白色レーザーを用いることで、分子のキラリティーを検出するまったく新しい測定手法の開拓を行った。研究初年度には、高感度検出を目指して、分光干渉法を取り入れた全く新しいシステム(

非線形ラマン分光干渉装置)の構築を試みた。

実験装置について詳細を述べる。Nd:YAGマイクロチップレーザー(浜松ホトニクス:パルス幅:400 ps, 波長:1064 nm, 繰り返し:25 kHz, 出力:600mW)からの出力を2つに分けし、一方はそのまま狭帯域な ω_1 光として、他方はフォトニック結晶ファイバーに導入し得られる白色レーザー光を ω_2 光として用いた。これらの入射光を偏光ビームスプリッターで2つのアームに分岐し、Mach-Zehnder型の干渉計を構築した。それぞれのアームでの偏光配置は直交している。サンプルとリファレンスで発生したCARS光はピエゾステージで一定の光学遅延 τ を経たのち、ビームスプリッターで合波した。ビームスプリッターの透過成分と反射成分をCCDカメラの別のビニングエリアで同時に測定した。サンプルとリファレンスから発生したCARS光同士が干渉することによってスペクトル上に干渉縞が観測される。干渉縞が $Re[\chi_{xxxx}^{sample}(\omega)]$ によって決まることに注意し、フーリエ変換による信号スペクトルの抽出を行った。その結果、キラル由来のCARS光について、光電場の実部及び虚部の同時測定を実現した。

装置の原理検証として、(-)- β -pineneをサンプルとして測定を行った。アナライザの角度 $\theta = \pm 0.125^\circ$ のとき、得られるスペクトルは $|\chi_{xxxx}^{sample}|$ に比例していると考えてよく、通常のCARS強度の平方根のスペクトルに等しい。一方 $\theta = 0.000^\circ$ のとき、得られるスペクトルは $|\chi_{xxxx}^{sample}|$ に比例しており、分子がキラルの場合のみゼロでないスペクトルが観測される。 $|\chi_{xxxx}^{sample}|$ スペクトルでは全てのピークが同じ分散型をしているのに対し、 $|\chi_{xxxx}^{sample}|$ スペクトルでは分散型の符号がピークによって異なって観測された。磁気双極子及び電気四重極子相互作用を考慮して感受率を計算すると $\chi_{xxxx}^{sample} = \chi_{xxxx}^{NR} - \frac{2\alpha(\omega^2)}{\omega} \chi_{xxxx}^{R}$ となることが知られている。ここで $\Delta(\theta^*)$ は前方散乱のROAで観測されるCID(circular intensity difference)である。これから、 $|\chi_{xxxx}^{sample}|$ スペクトルのピークによるバンド形の違いは、 $\Delta(\theta^*)$ の正負に対応していることが分かった。以上のように、分子のキラリティーに由来する $|\chi_{xxxx}^{sample}|$ スペクトルを直接観測したのは、本研究が初めてである。

研究の過程で、CARS-ROAの信号強度が光源の波長の5乗に反比例することを発見した。こ

のことは、光源の波長が近赤外から可視域に変わることによって、数十倍の信号強度の増大をもたらす。そこで、白色レーザーの発生に用いるフォトニック結晶ファイバーに、近赤外及び可視の二つの波長のレーザー光を導入(デュアル・ポンピング)することで、可視域白色レーザー発生を実現し、可視域CARS-ROAの実験装置を立ち上げた。その結果、信号対雑音比が格段に向上した結果が得られた。研究期間内に、キラリティーを有する代表的な分子として、ピネン、リモネンなどの測定を行い、良好なCARS-ROAスペクトルを得ることに成功した。

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 2 件)

1. Kotaro Hiramatsu, Hideaki Kano, and Takashi Nagata, "Raman optical activity by coherent anti-Stokes Raman scattering spectral interferometry", *Optics Express* 21, 13515 (2013).

DOI: 10.1364/OE.21.013515, 査読有

2. Kotaro Hiramatsu, Masanari Okuno, Hideaki Kano, Philippe Leproux, Vincent Couderc, and Hiro-o Hamaguchi, "Observation of Raman Optical Activity by Heterodyne-Detected Polarization-Resolved Coherent Anti-Stokes Raman Scattering", *Physical Review Letters* 109, 083901 (2012).

DOI: 10.1103/PhysRevLett.109.083901, 査読有

[学会発表](計 7 件)

1. (招待講演)平松光太郎, "ヘテロダイン検出法によるアキラル・バックグラウンドフリーな光活性測定法の開発", 第5回キラルサイエンス&テクノロジーシンポジウム, 2014年2月28日(東京)

2. (招待講演)平松光太郎, "コヒーレントラマン分光法で見る分子のキラリティー", 量子エレクトロニクス研究会, 2013年12月21日(長野)

3. (招待講演)Kotaro Hiramatsu, "coherent Raman optical activity spectroscopy", spectroscopic studies on molecular chirality, 20th, Dec. 2013 (Kyoto).

4. (招待講演)加納英明, "白色レーザーを用いた生細胞・生体組織の多光子分光イメージング", 第8回表面科学研究会, 2013年10月18日, 東京

5. Kotaro Hiramatsu, Hideaki Kano, and Takeshi Nagata, "Raman optical activity

measured by coherent anti-Stokes Raman scattering”, ICAVS-7, 26th, Aug. 2013 (Kobe).

6. 平松光太郎、奥野将成、加納英明、永田敬、濱口宏夫, “CARS-ROA のショットノイズ限界測定”, 日本分光学会年次講演会, 2012 年 11 月 28 日 (東京)

7. 平松光太郎、奥野将成、加納英明、永田敬、濱口宏夫, “CARS-ROA による分子キラリティーの観測”, 第 6 回分子科学討論会, 2012 年 9 月 18 日 (東京)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bk.tsukuba.ac.jp/~CARS/carsr/oa.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加納 英明 (Hideaki KANO)

筑波大学・数理物質系・准教授

研究者番号：70334240