7D45

ハイパーラマン分光顕微鏡を用いた生体分子の観測

Observation of biological molecules using hyper-Raman microspectroscopy

学 ○加納寛人 (大阪大学) 非 新岡宏彦 (大阪大学)
 正 荒木勉 (大阪大学) 正 橋本守 (大阪大学)

Hiroto KANO, Graduate School of Engineering Science, Osaka University, 1-3, Machikaneyama-cho, Toyonaka,
 Hirohiko NIIOKA, Osaka University, Tsutomu ARAKI, Osaka University, Mamoru HASHIMOTO, Osaka University

Key words: Hyper Raman scattering, Fourth order Raman microspectroscopy, DAST

1. 緒言

細胞膜タンパク質は、細胞膜を透過できないイオンや小分子の輸送や信号伝達経路などにおいて重要な役割を果たしている。しかしながら、膜貫通部位など細胞膜タンパク質の分子情報を取得するのは難しい^[1]。CARS (coherent anti-Stokes Raman scattering) 顕微鏡は、非侵襲、無染色に分子振動を通して分子の空間分布や構造変化などを得る手法であるが、様々な物質に対し選択性を持つため、細胞膜中のタンパク質のみの情報を得るのは困難である。ラマン及びハイパーラマン散乱現象を組み合わせた、コヒーレント反ストークスハイパーラマン (4次ラマン) 散乱分光顕微鏡は非中心対称性物質にのみ選択性をもつため、非中心対称性の膜タンパク質のみの情報を得ることが可能である。我々はマルチブレックス4次ラマン分光顕微鏡を開発し、顕微鏡下での非中心対称性物質の4次ラマンスペクトル及びイメージをはじめ得たのでその結果を報告する。

2. 理論

4次ラマンは偶数次の非線形光学現象であることから非中心対称性物質にのみ選択性を持つため、バルクの影響を受けずに界面の分子の振動スペクトルを得ることができ、界面選択分光法として応用されている^[2,3]。

図1に4次ラマンのエネルギー図を示す。4次ラマン光 (ω_{fourth}) は2色のレーザー光 (pump: ω_1 , Stokes: ω_2) の周波数差が分子振動と一致したとき ($\Omega = \omega_1 - \omega_2$) に、2つの ω_1 光によって増強されて発生する ($\omega_{\text{fourth}} = 3\omega_1 - \omega_2 = 2\omega_1 + \Omega$)。4次ラマンはストークスラマン散乱過程及び反ストークスハイパーラマン散乱過程の組み合わせで発生するため、4次ラマン活性はラマン活性及びハイパーラマン活性にのみ生じる。さらに ω_2 光に広帯域光の SC (supercontinuum) 光を用いることにより、複数の分子振動を同時に励起でき、様々な分子振動スペクトルを一度に検出することが可能である。

Fig.1 Energy diagram of fourth order Raman microspectroscopy

3. 実験装置及び測定試料

図2に開発したマルチブレックス4次ラマン分光顕微鏡の実験系を示す。光源にはフェムト秒モード同期 Ti:Sapphire レーザー (波長 800 nm, パルス幅 100 fs, 繰り返し周波数 80 MHz, Tsunami, Spectra Physics) を用いた。光源から発生したパルス光をグランレーザプリズムにより2つに分離し、一方をフォトニック結晶ファイバー (NL-PM-750, NKT photonics) に導入して SC 光を発生させた。もう一方のパルス光は狭帯域光学フィルターによってスペクトル幅を 17.7 cm^{-1} とし、時間遅延を経由させた後、エッジフィルターによって SC 光と重ね合わせた。2つのパルス光を顕微鏡に導入、対物レンズ ($\times 40$, NA 0.9, CFI S Fluor, Nikon) を用いて試料上に集光し、4次ラマン光を発生させた。発生した4次ラマン光を同じ対物レンズを通して集光し、励起光及び第二高調波光を光学フィルターによって除去した後、ファイバーを通して4次ラマン光のスペクトルを分光器及び冷却 CCD 検出器により測定した。なお、励起光及び第二高調波光の除去フィルターを変更することにより、CARS スペクトル及びハイパーラマンスペクトルを取得することも可能である。

非中心対称性物質である 4-ジメチルアミノ-N-メチル-4-スチルバゾリウムトシレート (DAST) 結晶 (厚さ 0.3 mm) の測定を行った。図3に DAST の分子構造を示す。DAST はラマン活性及びハイパーラマン活性双方を持つトシレートの環呼吸振動 (1170 cm^{-1})、 CH_3 の分子振動 (1347 cm^{-1})、スチルバゾリウム発色団の芳香環間の二重結合 ($\text{C-C}=\text{C-C}$) の分子振動モード (1577 cm^{-1}) を有する^[4]。

Fig.2 Experimental setup

Fig.3 Structure of 4-dimethylamino-N-methyl-4-stilbazolium tosylate (DAST)

4. 結果

図4 (a) に DAST 結晶の 4 次ラマンスペクトル, (b) にハイパーラマンスペクトル, (c) に CARS スペクトルを示す。いずれにおいても, 1170 cm^{-1} , 1347 cm^{-1} , 1577 cm^{-1} にピークが得られた。これらの結果から, 我々が開発した分光顕微鏡を用いることで, 4 次ラマンスペクトルを取得することが可能であることを示している。

Fig.4 Spectra of fourth order Raman (a), hyper-Raman (b), and CARS (c) of a DAST crystal. The exposure times were 20 s (a), 10 s (b), and 0.05 s (c), and laser power at the sample were 10 mW (a), 5 mW (b), and 6 mW (c).

図5 (a) に DAST 結晶のトシレート環呼吸振動の 4 次ラマンイメージ, (b) にハイパーラマンイメージを示す。また, 図5 (c) に透過像及び走査範囲を示す。図より, ハイパーラマン信号が著しく大きい部分にのみ 4 次ラマン信号が確認された。その部分は結晶品質が高いことを示していると考えられる。

Fig. 5 Image of fourth order Raman (a) and hyper Raman scattering (b). The exposure times per one pixel were 2 s (a) and 1 s (b), and laser power at the sample were 9.5 mW (a) and 5 mW (b), respectively. (c) Transmission Image of DAST crystal. The square shows scanning area.

5. 結言

今回, マルチブックス 4 次ラマン分光顕微鏡を用い, DAST 結晶の 4 次ラマンスペクトル及びイメージの取得を行った。結果, ハイパーラマンスペクトルや CARS スペクトルと同様なピークが得られた。また, 一部分で 4 次ラマンイメージが得られた。従って, 開発した 4 次ラマン分光顕微鏡で非中心対称性物質の信号取得が可能であることを示した。今後, 膜タンパク質の選択的イメージングを目指す。

参考文献

- [1] A. Elofsson and G. von Heijne, "Membrane Protein Structure: Prediction versus Reality", *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 76, 125 (2007)
- [2] S. Fujiyoshi, T. Ishibashi, and H. Onishi, "Interfacespecific vibrational spectroscopy of molecules with visible lights", *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 108 (30), 10636 (2004).
- [3] S. Yamaguchi and T. Tahara, " $\chi^{(4)}$ Raman spectroscopy for buried water interfaces", *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 46 (40), 7609 (2007)
- [4] Ch. Bosshard, R. Spreiter, L. Degiorgi, and P. Gunter, "Infrared and Raman spectroscopy of the organic crystal DAST: Polarization dependence and contribution of molecular vibrations to the linear electro-optics effect", *Physical Review B*, Vol. 66, 205107 (2002)