

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05166

研究課題名(和文)非線形ラマン・シングルショット分光による蛋白質の変性における動的現象の観測

研究課題名(英文)Broadband Fourier-transform CARS as a probe of protein structural dynamics

研究代表者

大間知 潤子(Omachi, Junko)

関西学院大学・理工学部・講師

研究者番号：70724053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、近年開発されたフーリエ変換型コヒーレント反ストークス分光法(以下FT-CARS法)を用いて、秒や分スケール、または1秒以下で構造変化する動的現象を振動情報から捉えることへの応用を目指した。本研究では始めにFT-CARS法の光源として広帯域チタンサファイアモード同期レーザーの作製を行った。これにより指紋領域を十分に網羅し、2700 cm⁻¹までのラマンシフトを観測することが可能になった。測定試料として高速に構造変化が起こる瞬間接着剤の硬化過程の観測を行った。さらに信号を増強するためヘテロダイン光学系へ改良を行った。今後このシステムによりタンパク質の変性現象の観測を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、近年開発されたフーリエ変換型コヒーレント反ストークス分光システムをイメージング用途ではなく、高速に構造変化する物質の変化を観測することに応用した。この研究は、分子の静的な立体構造を決定するX線回折、電子顕微鏡とは異なり、動的な変化を捉えられることが特徴である。本研究では瞬間接着剤の硬化過程の観測を行った。振動ピーク構造の変化を定量的に議論するためには、さらなる信号の増強が必要であり、ヘテロダイン検出のシステムまで完成させた。今後は、このシステムを活用することで、短時間での構造変化を高感度に捉える手法を確立し、タンパク質の変性現象を捉える研究に進めていく。

研究成果の概要(英文)：We aimed to apply the recently-developed Fourier-transform coherent anti-Stokes Raman spectroscopy (FT-CARS) system as a probe of protein structural dynamics. Firstly, we developed a broadband Ti:sapphire mode-locked laser with FWHM of 140 nm (hem-to-hem 280 nm). This light source enables us to measure Raman spectra up to 2700 wavenumber beyond fingerprint region. Using FT-CARS, we measured a hardening process of epoxy adhesive, which is easy to obtain and whose structural dynamics is within several minutes. We altered the system to heterodyne detection in order to enhance the CARS signal. For future perspective, we will observe protein structure dynamics with this heterodyne FT-CARS system.

研究分野：光物性

キーワード：非線形ラマン散乱 振動分光

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ラマン散乱測定は赤外吸収測定と並び、物質の構造を反映する振動スペクトルを測定することで、物質の状態を明らかにする手法である。ラマン分光は試料に非侵襲、非破壊で、その場観察が可能という特徴に加え、水の吸収が少ない可視から近赤外の波長の光を励起光とするため水溶液中で機能を発現する生体高分子を高い空間分解能で調べるバイオイメージングに使われている。しかしラマン散乱確率は低いため測定に時間を要することが課題であった。近年、超短パルスレーザーを用いた非線形効果として誘導ラマン測定により、その測定を短時間高感度に行う手法が発展してきた。その中で我々のグループはフーリエ変換・コヒーレント反ストークス分光法(以下 FT-CARS 法)により、短時間で広帯域にラマン散乱信号を取得し、その手法はイメージングへと応用されてきた。本研究ではこの FT-CARS 法をイメージングではなく、秒や分スケール、または 1 秒以下で構造変化する動的現象を振動情報から捉えることへの応用を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、超短パルスレーザーが持つ広帯域なスペクトルを利用した FT-CARS 法により、構造が時間変化する現象を振動情報として追跡することである。

3. 研究の方法

(1) FT-CARS 測定のための広帯域パルス光源の作製

本研究は、開始当初に代表者が研究室を立ち上げたため、まずは光源作製から開始することにした。本研究で用いる FT-CARS 法では、光源のスペクトルが広帯域であることを利用する。指紋領域(ラマンシフトの波数 $500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$)を網羅するためには、スペクトルの線幅が 1800 cm^{-1} 以上の光源が必要である。これを実現するため、初年度は FT-CARS 測定のための光源としてチタンサファイアモード同期レーザーの作製を行った。

(2) FT-CARS システムの構築

次年度から、(1)で作製したレーザーを光源とする FT-CARS 光学系の構築に取り組んだ。FT-CARS 光学系は、誘導ラマンのための pump 光と Stokes 光に対して、相対的に遅延時間を付けて probe 光を試料に入射する。そのための干渉光学系を組んだ。遅延時間掃引は 12 kHz の周波数で高速回転するレゾナントスキヤナーを用いた。これにより一回の掃引を $83\text{ }\mu\text{s}$ (往復)で行うことが可能になった。この光学系を用いた FT-CARS 測定の実証を行うために、ラマンスペクトルが既知のベンゼンを試料として FT-CARS 信号を得た。データ解析から得られるラマンスペクトルを既知のデータと比較することで、指紋領域のラマンスペクトルを得られることを確認した。

(3) FT-CARS システムを用いた構造が時間変化する対象のダイナミクスの追跡

最終年度に、この FT-CARS 光学系を用いて、時間変化する試料の探索に進んだ。研究申請当初は、タンパク質の変性を捉えることを目標としていたが、タンパク質の調製までは間に合わなかったため、秒から分の時間スケールで変化し、入手が容易な瞬間接着剤の硬化過程を観測することとした。接着剤の硬化過程は自発ラマン測定により分スケールの応答が報告されているため、これらと比較しながら測定を進めた。

4. 研究成果

(1) FT-CARS 測定のための広帯域パルス光源の作製

FT-CARS 測定のための光源として用意したチタンサファイアモード同期レーザーのスペクトルを図 1(a)に示す。波長 532 nm 、平均出力 5 W 励起において、平均出力 120 mW 、繰り返し周波数 73 MHz 、中心波長 820 nm 、半値全幅 145 nm (端から端で 280 nm)の広帯域スペクトルを持つレーザーが得られた。

(2) FT-CARS システムの構築

これを光源とする FT-CARS 光学系を図 1(b)に示す。チタンサファイアレーザーからの光をマイケルソン干渉光学系と同様な光学系に伝搬させ、干渉計の一方のアームからのラマン励起光を試料に照射すると、複数の振動モードが励起される。他方のアームは高速掃引型ミラーで pump 光と Stokes 光に対して相対遅延が付けられており、そのアームからのプローブ光を試料に照射することでコヒーレントな反ストークス・ラマン散乱光が放出される。 750 nm 以上の成分を pump と Stokes、およびに probe 光とし、アンチストークス成分は 750 nm 以下のものをアバランシェフォトダイオード検出器に集光し、デジタルオシロスコープを用いて測定を行った。この光学系において理論上測定可能なラマンシフトの波数領域は 100 cm^{-1} から 2700 cm^{-1} までであり、分解能は 12 cm^{-1} となった。

本光学系の動作確認として、ラマン散乱確率の高いベンゼンの FT-CARS 信号を取得した。測定時間 $83\text{ }\mu\text{s}$ (単掃引)で得られた信号を図 2(a)に示す。非共鳴信号の後に振動構造が確認できる。これをフーリエ変換すると(図 2(b))、 998 cm^{-1} において強いピーク信号が確認でき、これ

は報告されている 991.6 cm^{-1} の ring stretching 振動と分解能の範囲で良く一致している。以上から、本光学系で指紋領域のラマン散乱信号を測定できることを示した。

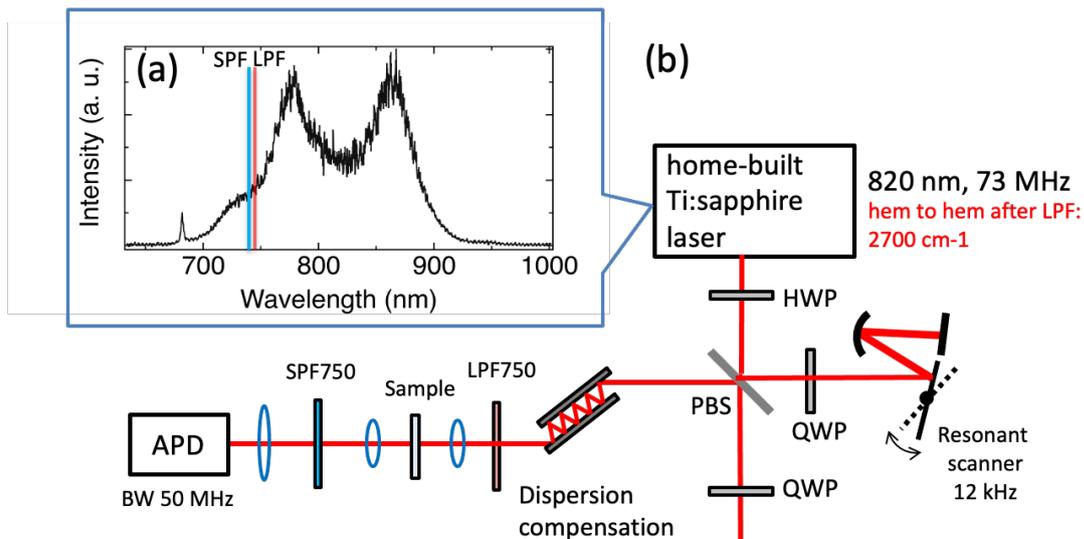


図 1 (a) 自作チタンサファイアモード同期レーザーのスペクトル。図中の赤線と青線はロングパスフィルター(LPF750)とショートパスフィルター(SPF750)のカットオフ波長を示す。(b) FT-CARS 光学系。

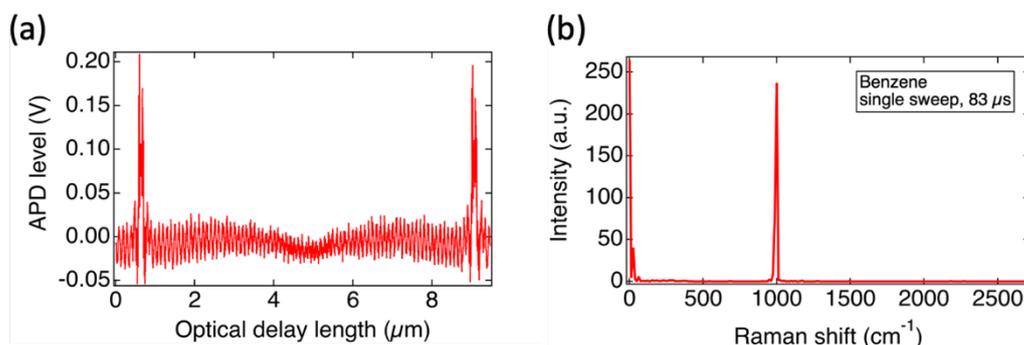


図 2 測定時間 $83 \mu\text{s}$ でのベンゼンの (a) FT-CARS 信号と (b) フーリエ変換後のラマン散乱スペクトル。

(3) FT-CARS システムを用いた構造が時間変化する対象のダイナミクスの追跡

最後に、FT-CARS システムを用いた時間変化する試料の探索について述べる。本研究では、秒から分の時間スケールで変化し、入手が容易な瞬間接着剤の硬化過程を観測することとした。接着剤は、密着性、接着強度、耐久性の観点で技術開発が行われているが、分子スケールでの詳細な研究はまだ少ない。本測定で対象とした瞬間接着剤の主剤の主成分はエポキシ樹脂であり、硬化剤は変性チオールを含有する。硬化過程においては、エポキシ基の三員環の酸素が変性チオールの硫黄により結合が分裂し、それらの重合反応が起きることが知られている。よって、時間変化においては、エポキシ基の三員環振動 ($800\text{--}900 \text{ cm}^{-1}$, 1254 cm^{-1}) に由来するピーク成分が減少し、それに伴い結合分裂に使われたチオール基 (-SH , 2568 cm^{-1}) も減少することが予想できる。(2) で作製した光学系により FT-CARS データを取得した。図 3 (a) に接着剤の主剤と硬化剤の FT-CARS によるラマン散乱スペクトルを示す。また主剤と硬化剤を混合後のラマン散乱スペクトルの時間変化を図 3 (b) に示す。振動成分の増減を定量的に議論するためには、FT-CARS 信号の SN 比をあげる必要があり、干渉計をヘテロダイン FT-CARS 光学系に改良し、測定を進めている。

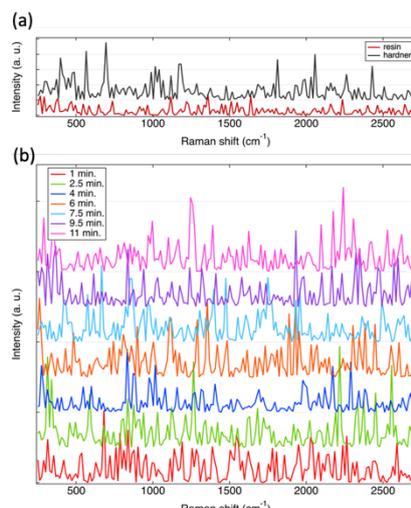


図 3 (a) 瞬間接着剤のエポキシ系主剤 (赤茶) と硬化剤 (黒) のラマン散乱スペクトル。(b) 主剤と硬化剤を混合後のラマン散乱スペクトルの時間変化。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------