

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19063

研究課題名(和文)非線形ラマン原子間力顕微鏡による超解像イメージング

研究課題名(英文)Super-resolution Imaging of nonlinear Raman atomic force imaging

研究代表者

橋本 守 (Hashimoto, Mamoru)

北海道大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：70237949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：光の回折限界を越える、非線形ラマン散乱と原子間力顕微鏡(AFM)とを組み合わせた超解像分子振動イメージング顕微鏡を開発した。非線形ラマン散乱過程を利用して特定の分子振動を励起し、この分子振動励起に伴う体積膨張をAFMで観測する。レーザー光をAFMのプロブ付近に集光するため、この影響を除去しながら高感度に体積膨張を検出する必要がある。そこで探針の試料接触の際のみに2台のパルス光が同時に試料に照射されるように、2台のレーザーのパルス発振の周波数差が、カンチレバーの共振と同期させるシステムの開発した。開発した装置を使って、非線形ラマン散乱によって誘起された体積膨張と思われる信号の検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光の回折限界を越えたイメージング手法は、超解像イメージングと呼ばれ近年その進展には著しいものがあり、2014年にはノーベル化学賞を受賞するに至った。超解像技術に用いられている手法は、主に蛍光を利用したものであるが、蛍光発色団は非常に大きな分子量を持つために、実際の生体・細胞反応とは反応が異なる可能性を持つ。そこで、無染色で分子種を分別し、超解像イメージング可能な手法に注目が集まっている。本研究で、安定的にナノメートルオーダーの空間分解能で水溶液中での無染色分子イメージングが可能となれば、生きたままの細胞の膜タンパクの動態を検出可能となり、薬理作用の解明等に貢献することができる。

研究成果の概要(英文)：We have developed a super-resolution molecular vibration imaging microscope that combines atomic force microscopy (AFM) with nonlinear Raman scattering beyond the diffraction limit of light. The volume expansion accompanying the molecular vibrational excitation via nonlinear Raman scattering process is observed by AFM. In order to focus the laser beam near the probe of AFM, it is necessary to detect volume expansion with high sensitivity while irradiation of the probe. Therefore, we developed a system in which the frequency difference between the pulse oscillations of the two lasers is synchronized with the resonance of the cantilever so that the two pulse lights are simultaneously irradiated to the sample only when the probe contacts the sample. Using the developed device, we successfully detected a signal that seems to be volume expansion induced by nonlinear Raman scattering.

研究分野：生体光計測

キーワード：ラマンイメージング 非線形ラマン 超解像イメージング

1. 研究開始当初の背景

光の回折限界を越えた超解像イメージング技術の進展には著しいものがあり、2014年には「超解像顕微鏡の開発」として、ノーベル化学賞を受賞するに至った。超解像技術に用いられている手法は、主に蛍光を利用したものであるが、蛍光発色団は非常に大きな分子量を持つために、実際の生体・細胞反応とは反応が異なる可能性を持つ。また、発色団以外にも、抗体等の物質認識部位、またそれらと発色団をつなぐリンカー部位により、超解像技術を用いて高空間分解能で観測すればするほど、実際に観測したい生体分子との位置の違いが問題となってくる。そこで、蛍光プローブを用いない超解像イメージングが重要となる。

近年、ラマン散乱分光を、金属探針を用いた電場増強近接場光学によって行なう、近接場ラマン散乱顕微鏡が開発され、ナノメートルオーダーの蛍光プローブを用いない分子イメージングが実現されている。研究代表者らも、非線形ラマン散乱の一種である CARS (coherent anti-Stokes Raman scattering) と近接場顕微鏡を組み合わせ、近接場 CARS 顕微鏡を開発し、15 nm という使用したレーザー光波長の 1/50 以下の空間分解能を持つ超解像振動分光を実現した。しかしながら、金属探針を用いた電場増強型近接場顕微鏡では、その金属探針によってイメージング性能が左右され、再現性が高くないといった問題があった。

一方、赤外線パルスレーザーと AFM (atomic force microscopy) を組み合わせ、AFM-IR (infrared) が実現され、赤外分光の超解像イメージングが実現された。この手法は、赤外線レーザーにより物質中の特定の分子を振動励起し、これによって生じた試料の膨張を、AFM で観測するものであり、水は赤外線吸収大きいため、生体試料への適用が困難であるという問題がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新しい原理による超解像非線形ラマン散乱顕微鏡の実現である。非線形ラマン散乱過程を利用して特定の分子振動を励起し、この分子振動励起に伴う体積膨張を AFM で観測することにより、安定したイメージングが可能な超解像非線形ラマン散乱顕微鏡を実現する。

3. 研究の方法

非線形ラマン散乱原子間力顕微鏡の開発

図 1 に開発した非線形ラマン散乱原子間力顕微鏡の構成図を示す。光学顕微鏡の試料ステージ上に xyz-PZT ステージを設置し、さらにこの上に本研究室で購入した市販の原子間力顕微鏡キット (AFM) を設置する。光源には、既存の同期可能な 2 台のチタンサファイアレーザーを用いる。カンチレバーの様子を観測するため、側方からカンチレバー先端を観測するためのカメラと光検出器を配している。

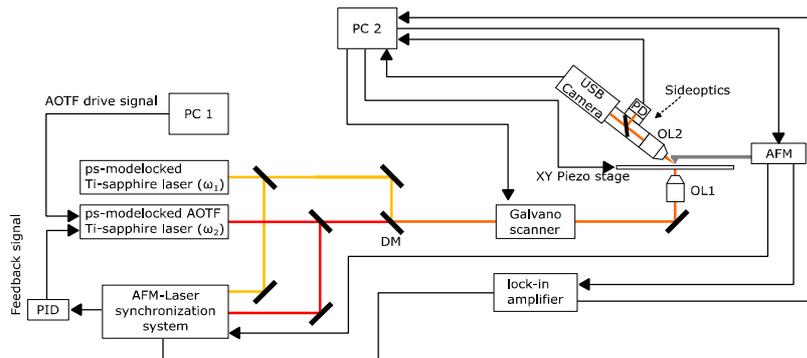


図 1 非線形ラマン散乱原子間力顕微鏡の構成図

使用している AFM は共振型のカンチレバーを使用しており、その信号を自己検知するものである。このため、カンチレバーの振動に合わせて励起することで、微小な体積膨張の信号拡大が期待できる。一方、光励起を行うことから、高強度なレーザー光がカンチレバー先端付近に集光されており、レーザー光照射の影響がカンチレバーに加わる可能性が高い。したがって、レーザー光照射の影響を回避して、微小な体積膨張を検出する必要がある。

ラマン散乱過程で分子振動を励起するために、非線形ラマン散乱過程を用いる。自発ラマン散乱過程では、ラマン散乱許容な全ての分子振動を励起してしまい、分子振動を特定することができないが、非線形ラマン散乱過程では 2 色 (2 周波数) の光を試料に照射し、分子振動に周波数差が一致した時にその分子振動を励起することが可能であるためである。

非線形ラマン散乱過程で分子振動を励起するためには、パルスレーザー光が用いられる。このため、2 色のレーザーが同時に試料に照射された時のみに、非線形ラマン散乱過程が誘起される。カンチレバーが試料に接触するタイミングで同時に試料に 2 色のレーザー光を照射し、カンチレバーが試料に接触していない時には、バラバラに照射させることで、パルスレーザー光照射の影響を回避して、微小な体積膨張を検出することを試みた。

図2は、構築したレーザーの同時照射と、カンチレバーの接触を同期させるためのシステムである。2台のレーザー光は(Laser1, Laser2), それぞれ約 80 MHz でパルス発振しているが, Laser2 のパルス発振周波数をわずかに小さくしておく。2台のレーザー光からのレーザーパルスをそれぞれ光検出器(PD1, PD2)で検出し, これらの信号の積をダブルバランスミキサーで得て, 低周波数成分を取り出すことで, 2台のレーザー光のパルス発振の差周波信号を得る。この差周波信号が2台のレーザー光が同時に照射されることを表しており, これをカンチレバーの共振信号との周波数差がゼロとなるように, Laser2 のパルス発振周波数制御へフィードバックしている。

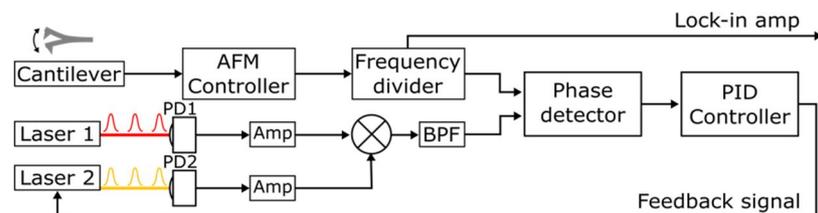


図2 レーザーの同時照射とカンチレバーの接触の同期システム

試料

試料には, 直径 10 μm のポリスチレンビーズを用いた。カバーガラス上にポリスチレンビーズ溶液を塗布し, 風乾させて用いた。2台レーザー光の波長は 709, 888 nm とし, ポリスチレンの CH 伸縮信号に合わせて観察を行う。

4. 研究成果

カンチレバーの運動とパルスレーザー光照射のタイミングを同期させるためには, カンチレバーから得られる共振信号と実際のカンチレバーの運動の対応させる必要がある。カンチレバーの先端の大きさは数マイクロン, 上下運動も 10 数マイクロン程度であり, またその運動は 45 kHz 程度である。面内方向の位置はカメラ等で確認することができるが, 上下運動は観測することができない。そこでレーザー光をカンチレバー先端付近に集光し, カンチレバー先端で散乱される光を側方検出することで, カンチレバーの上下方向の運動とカンチレバーが試料へ接触するタイミングの検出を行なった

図3は, カンチレバーの共振信号(a), カンチレバーによる散乱光の強度を示している(b-d)。(b), (d)は(c)からそれぞれ上方(カンチレバーが集光点から離れる方向)に μm , 下方に μm カンチレバー(カンチレバーが集光点へ向かう方向)を移動させて観測した。(b), (d)はカンチレバーの共振信号と同一の周波数で信号が得られており, (c)では2倍の周波数となっていることがわかる。したがって, (c)ではカンチレバーの振動で2度散乱信号が得られている。カンチレバー探針の先端で散乱光強度が大きいと考えると, 集光点を2度探針先端が通っていると考えられる。一方, (b), (d)ではカンチレバー先端の1回の振動に対して1度散乱信号が現れており, また, (b)ではカンチレバーが集光点から離れる方向に移動させているため, この状態で探針が試料接触する付近にレーザー集光されていると考えられる。これから, カンチレバーの共振信号が最大となる付近で, 探針は試料に接触すると思われる。

図4に, カンチレバーの共振信号(a)と, 2光子検出器によって2レーザーパルスの強度相関(b), (c)を観測した結果を示す。(b)の制御電圧は 10 V, (c)の制御電圧は 6 V である。2光子検出器は, バンドギャップが大きな GaAsP 半導体検出器であり, チタンサファイアレーザーの光では1光子吸収は起こらず, 2光子吸収のみが生じる。このため, 2レーザーパルスが時間的に重なりあった時に大きな信号を示す。また, 制御電圧は, 2パルスの重なる時刻と共振信号が一定の

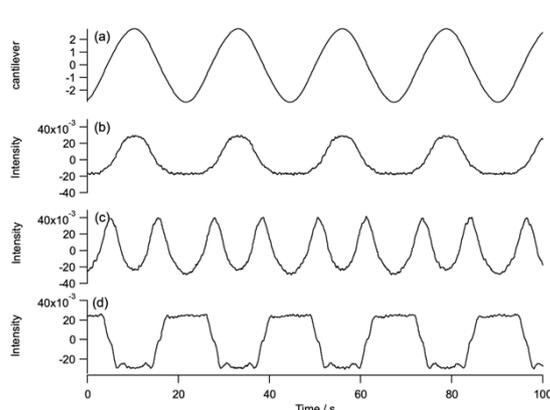


図3 カンチレバー共振信号と(a) カンチレバー探針による散乱光(b-d)

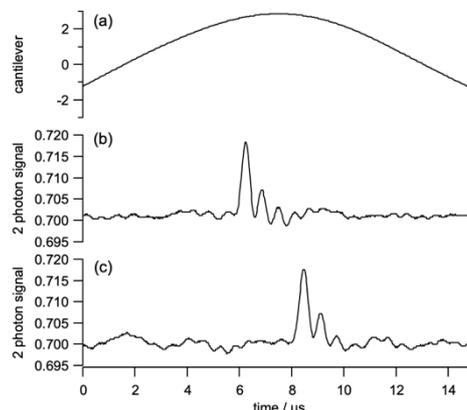


図4 カンチレバー共振信号(a)と強度相関信号(b, c)

状態となるように制御している．図を見わかるように，制御電圧を変化させることで2パルスの重なる時刻を制御できていることがわかる．

直径10 μm のポリスチレンビーズを試料に用いてAFM像を観測し，ビーズ上にカンチレバー探針があることを確認した上で，体積膨張信号の取得を試みた．図5に実験結果を示す．(a)は，2パルスの重なる時刻と共振信号の時間差の制御信号(位相制御信号)を表し，(b)はカンチレバーの位置(高さ)信号である．図を見てわかるように，位相制御信号が約8Vのとき，高さ制御信号が上昇していることがわかる．これは，位相制御信号が約8Vの時に，探針の接触と2レーザーパルスの同時照射が起きていて，カンチレバー位置信号として試料の膨張信号が現れたものと考えられる．

非線形ラマン散乱過程を利用して特定の分子振動を励起し，この分子振動励起に伴う体積膨張をAFMで観測する非線形ラマン散乱超解像顕微鏡を開発し，実際に体積膨張であると思われる信号の取得に成功した．

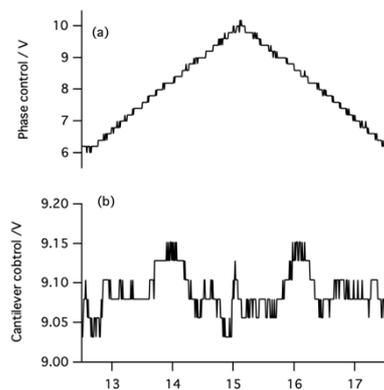


図5 2パルスの重なる時刻と共振信号の時間差の制御信号(a)とカンチレバーの位置(高さ)信号(b)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

橋本守, “非線形ラマンを用いたラベルフリーング”

S12: ラベルフリー生体イメージングの進歩, 一般社団法人レーザー学会学術講演会第38回年次大会, 京都市産業館みやこめッセ, 京都市, 京都府 (2018)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。