

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26706006

研究課題名(和文) 先端振動分光法を駆使したタンパク質一分子の時空間的機能解析手法の開拓

研究課題名(英文) Probing single bio-molecular functions using advanced vibrational spectroscopies

研究代表者

矢野 隆章 (Yano, Takaaki)

東京工業大学・物質理工学院・助教

研究者番号：90600651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,600,000円

研究成果の概要(和文)：生命の分子基であるタンパク質は、水中においてその構造を時々刻々と変化させることによって機能を発揮している。本研究では、光照射下の貴金属ナノ構造の表面に誘起される局在表面プラズモン共鳴を用いて、溶液中の生体機能動態変化を単一分子スケールでラマン分光分析する手法を開発した。この実現によって、生体分子認識反応のメカニズムの理解の深化につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Biomolecules are known to express their biological functions through the structural fluctuations. In this research, we developed a vibrational spectroscopic method to analyze bio-molecular functions and dynamics using field-enhanced Raman effects caused by plasmonic nanostructures. This method developed here will open a new way to deeply understand underlying mechanisms of biomolecular recognition reactions.

研究分野：ナノフォトニクス

キーワード：ナノバイオフィotonics プラズモニクス

1. 研究開始当初の背景

生命の分子基であるタンパク質は、水中においてその構造を時々刻々と変化させることによって機能を発揮している。これまでに、蛍光顕微鏡や原子間力顕微鏡を用いて単一タンパク質のダイナミクスを計測する手法が精力的に開発されてきた。しかしながら、溶液中でのタンパク質の変位を追従することは可能であるが、機能動態を正確に分析するまでに至っていないのが現状である。

タンパク質の機能を分析する手法としてラマン散乱分光法が有用であることが知られている。しかしながら、ラマン散乱光は蛍光と比べて10桁以上微弱であるため、リアルタイムでタンパク質のラマン散乱を検出することは極めて困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、先端分光法を駆使して、溶液中の生体機能動態変化を単一分子スケールで分析する手法を開発することである。この実現によって、生体分子認識反応のメカニズムの理解の深化につながることを期待される。

3. 研究の方法

光照射下の貴金属ナノ構造の表面に誘起される局在表面プラズモン共鳴を用いて、ナノ構造近傍の生体分子のラマン散乱を実効的に増大させた。貴金属ナノ構造として、探針型の金属ナノプローブとナノギャップを有するダイポールアンテナ構造を用いて、単一生体分子検出感度を実現した。

4. 研究成果

金ナノギャップ間に介在する生体低分子(アルギニン-グリシン-アスパラギン酸から構成される RGD ペプチド)の電場増強ラマン分光分析を行った。図1(a)に示すように、1秒間隔で50秒間ラマンスペクトルを測定し続けた結果、単一分子レベルの検出を示唆するラマン散乱のブリンキング現象が観測され、金属ナノギャップを用いると高感度で生体分子の振動分光計測が可能になったことがわかった。

また、図1(b)に示すように、B, C, G のラマンバンドの強度変化には相関(correlation)が見られたが、A のラマンバンドのそれは、B, C, G と比べて反相関的(anti-correlation)な変化が示された。スペクトル解析を行った結果、RGD ペプチド中のフェニルアラニンのベンゼン環がギャップ内で回転することがわかり、ペプチド分子の配向変化を測定することに成功した。さらに、Amide II バンド(1544 cm^{-1})は増強検出されたが、Amide I バンド(1680 cm^{-1})は消失し検出されなかった。この原因については今後の検討課題である。

さらに、ポリエチレングリコール等のリンカー分子を用いて原子間力顕微鏡の探針先端に生体分子を修飾する手法についても検討し、単一分子程度の低密度で再現性良く生体分子を探針先端に修飾できる見通しが立った。

タンパク質内の高波数側の振動モード以外に、低振動運動を分光検出するシステムを構築し、テラヘルツ領域の振動モードの検出が可能とした。さらに、量子化学計算によって生体低分子の分子間振動を解析することが

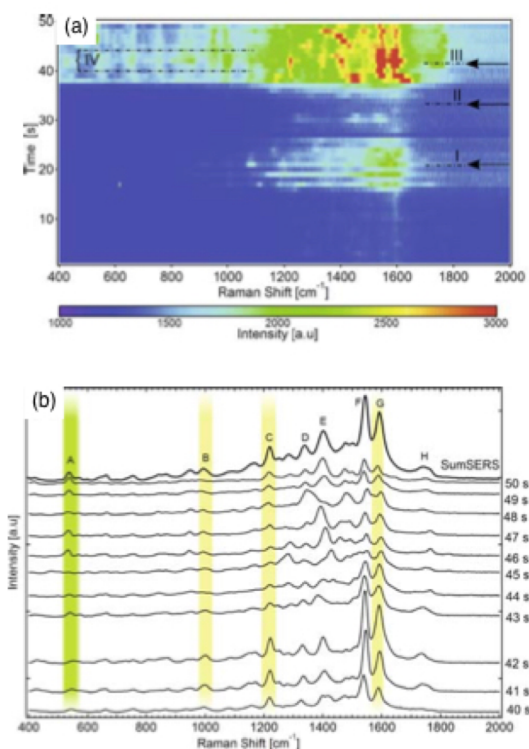


図1: RGD ペプチドのラマンスペクトルの経時変化

可能となり、実験と理論の両輪からタンパク質の相互作用分光分析を行うことが可能になった。実際に本システムを用いてアミノ酸ナノクリスタルの分光計測を行い、アミノ酸分子間の低振動分子間モードを検出できることを確認した。

これらの成果により、局在表面プラズモンによる電場増強効果を用いて単一のタンパク質分子の機能を高感度かつ高速に分光計測できる見通しを得た。さらに、タンパク質内の高振動運動（低次構造の揺らぎ）と低振動運動（高次構造の揺らぎ）との協奏性・同調性を探ることが可能な見通しも得た。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- (1) A. Portela, T. Yano, C. Santschi, H. Matsui, T. Hayashi, M. Hara, O. J. F. Martin, and H. Tabata, "Spectral tunability of realistic plasmonic nanoantennas" *Appl. Phys. Lett.* **105**, 091105 (2014).DOI: 10.1063/1.4894633 (査読有り)
- (2) Y. Tsuchimoto, T. Yano, M. Hada, K. G. Nakamura, T. Hayashi, and M. Hara, "Controlling the Visible Electromagnetic Resonances of Si/SiO₂ Dielectric Core-Shell Nanoparticles by Thermal Oxidation" *Small*, **11**, 4844–4849 (2015).DOI: 10.1002/smll.201500884(査読有り)
- (3) 市村垂生, 矢野隆章 "局在表面プラズモンを利用した超解像顕微分光とイメージング" 分光研究, 64, No. 6, 582-598 (2015).
URL:http://www.bunkou.or.jp/prints/prints_640_6.html (査読有り)
- (4) T. Yano, Y. Tsuchimoto, M. Mochizuki, T. Hayashi and M. Hara, "Laser Scanning Assisted Tip-Enhanced Optical Microscopy for Robust Optical Nanospectroscopy," *Appl. Spectrosc.* **70**, 1239–1243 (2016).DOI: 10.1177/0003702816652369(査読有り)

- (5) Y. Tsuchimoto, T. Yano, T. Hayashi, and M. Hara, "Fano resonant all-dielectric core/shell nanoparticles with ultrahigh scattering directionality in the visible region" *Optics Express* **24**, 14451-14462 (2016).DOI:10.1364/OE.24.014451(査読有り)
- (6) H. Wang, H.Y. Wang, A. Toma, T. Yano, Q.D. Chen, H.L. Xu, H.B. Sun, and R. P. Zaccaria, "Dynamics of Strong Coupling between CdSe Quantum Dots and Surface Plasmon Polaritons in Subwavelength Hole Array" *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 4648-4654 (2016). DOI: 10.1021/acs.jpcclett.6b02059(査読有り)
- (7) A. Portela, T. Yano, C. Santschi, O.J.F. Martin, H. Tabata, and M. Hara, "Highly sensitive SERS analysis of the cyclic Arg-Gly-Asp peptide ligands of cells using nanogap antennas" *J. Biophoton.* **10**, 294-302 (2017).DOI: 10.1002/jbio.201500327(査読有り)

[学会発表] (計 7 件)

- (1) [招待講演]矢野 隆章, 土本 悠, 林 智広, 原 正彦, "プラズモン光増強場を用いたナノ力学分光"レーザー学会第35回年次大会, 2015年1月, 東京.
- (2) Yuta Tsuchimoto, Taka-aki Yano, Tomohiro Hayashi, Masahiko Hara, "Tunable electromagnetic responses of high-index dielectric nanostructures in the visible region" The 10th Asia-Pacific Conference on Near-field Optics (APNFO10), July 8-9, Hakodate, Japan.
- (3) [招待講演]Taka-aki Yano, "Functional nano-optical imaging & spectroscopy: from nano-plasmonics to nano-dielectrics", Seminar talk in Italian Institute of Technology, July 13, 2016, Genoa, Italy.

- (4) [招待講演] Taka-aki Yano, “In-situ TERS Observation of Mechanically- and Electrically-induced Chemical Reactions” PIERS 2016, Aug. 8-11, 2016, Shanghai, China.
- (5) [招待講演] Taka-aki Yano, Yuta Tsuchimoto, Tomohiro Hayashi and Masahiko Hara, “All-dielectric nanostructures for low-loss field enhanced spectroscopy and imaging” SPIE: Optics and Photonics, Aug. 28-Sept. 1, 2016, San Diego. USA.
- (6) [招待講演] Taka-aki Yano, “Tip-enhanced Raman spectroscopy for nano-analysis and nano-imaging” IUMRS-ICYRAM 2016, Dec 11-15, 2016, Bangalore, India.
- (7) [招待講演] 矢野 隆章, “原子層物質表面の近接場ナノ分光計測” 物性研究所短期研究会 「原子層上の活性サイトで発現する局所機能物性」, 2016年12月, 千葉.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 隆章 (YANO, Taka-aki)
東京工業大学・物質理工学院・助教
研究者番号：90600651