

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年6月5日現在

機関番号：15401

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19056007

研究課題名（和文） SFG 分光法による有機および生体分子膜界面の電子振動状態の研究

研究課題名（英文） Vibrational and electronic structures of organic and biomolecular interfaces studied by SFG spectroscopy

## 研究代表者

石橋 孝章 (ISHIBASHI TAKA-AKI)

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：70232337

研究成果の概要（和文）：界面選択性のある表面界面の分光である SFG 分光法の機能を持つ分子高次系の解明のための計測法として可能性を開拓することを目的として、電子共鳴条件下の振動 SFG 分光（電子振動二重共鳴 SFG 分光）に着目し、界面分子種の電子および振動状態に関する詳細な情報の獲得を目指した研究を行った。研究期間に、紫外プローブによる芳香族単分子膜の高選択高感度測定、薄膜のキラリティ検出、水中での単分子膜の指紋領域振動 SFG スペクトルの測定法等、二重共鳴 SFG 分光の様々な応用技術を開発することができた。

研究成果の概要（英文）：In this project, we have explored applications of sum-frequency generation (SFG) spectroscopy as a valuable probe for elucidating supra-functional systems with a special emphasis on vibrationally-electronically doubly resonant SFG (DR-SFG) process, which can provide detailed information on vibrational and electronic states of interface species. As the result of the project, we have developed various DR-SFG techniques, such as sensible and selective detection of aromatic groups in organic monolayers by IR-UV DR-SFG spectroscopy, sensitive detection of chirality of very thin molecular films by DR-SFG, and a new methodology for detecting fingerprint region vibrational SFG spectra of silanized monolayer-aqueous solution interfaces.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,100,000	0	9,100,000
2008年度	18,000,000	0	18,000,000
2009年度	2,200,000	0	2,200,000
2010年度	3,600,000	0	3,600,000
2011年度	1,900,000	0	1,900,000
総計	34,800,000	0	34,800,000

研究分野：物理化学・界面分子分光学

科研費の分科・細目：

キーワード：非線形分光，振動スペクトル，電子スペクトル，薄膜，界面，生体分子

## 1. 研究開始当初の背景

赤外光を用いる和周波発生 (SFG) 分光は、表面界面の振動分光である。SFG 分光は二次非線形効果に基づくため、バルクからの信号の妨害を受けずに界面にある分子種だけを選択的にプローブすることができる点が最大の特徴である。生体に代表される機能を有する高次系は化学的素過程を担う部分の集

合体である。そこには必ず部分間の界面が存在し、重要な働きをする。SFG のもつ界面選択性は、この界面を分子論的に探求する最適な手法である。

研究代表者は、SFG 分光の高感度化と高情報化を目指し、SFG 分光を手法開発のレベルから応用方法まで総合的な研究を展開していた。手法開発の面では、世界で初めて、

広い領域で可視プローブの波長可変性を備えたマルチプレックス SFG 分光装置の開発し、これまで長時間測定が必要だった SFG スペクトルの測定時間を、マルチチャンネル化と電子共鳴効果によって飛躍的に短縮することに成功した。さらに可視プローブ光の可変範囲を紫外領域に拡大し、電子共鳴増強効果の利用範囲を芳香族界面種全体へと拡大した。すなわち核酸塩基や芳香族アミノ酸類などの重要な生体分子を、電子共鳴 SFG 分光の対象とすることができたのである。これは、界面選択的だけでなく電子共鳴によって分子選択的に分子の局所的な環境を電子および振動状態を通してプローブする道筋が開けたことを意味する。この様な研究上の準備の上で、特定領域の研究に取り組んだ。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、SFG 分光法の生体に代表される分子高次系機能解明のための計測法として可能性を開拓することである。特に電子共鳴条件下の SFG 分光（電子振動二重共鳴 SFG 分光）に着目し、界面分子種の電子および振動状態に関する詳細な情報の獲得を目指す。そのために、電子共鳴増強効果の利用による測定の高感度化のノウハウと解析手法を確立させる。芳香族性の生体分子（核酸塩基、アミノ酸残基）を配向性の良く高密度に固定した膜を使用して、研究を開始する。電子共鳴 SFG によって、分子の電子および振動状態に関してどのような情報が得られるかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、研究対象を簡単（または測定が容易）な膜から複雑（または測定が困難）な膜へと発展させていながら、同時に、振動電子二重共鳴 SFG 分光法の技術的な手法を開発していくという研究手法をとることにした。ここで、簡単な膜とは膜の秩序度と分子密度が高く、固定されている化学種が低分子であるものであり、困難な膜とは秩序度や分子密度が低く、固定されている化学種自身も複雑であるものである。簡単な系を用いて、二重共鳴 SFG の測定手法と解析手法の確立をめざし、その蓄積の上に困難な系へ研究を発展させる。平行して SFG 分光システムをより安定でより強力なものに改良していき、5年間の研究期間の内の前半部分で簡単な膜への取り組みと、分光システムの改良を行い、後半部分で困難な膜へ挑戦するという計画である。

簡単な膜としては、自己組織化的手法によって作製した芳香族低分子（アミノ酸類や核酸塩基などの生体分子）を固定した分子膜を対象とする。次のステップとして、単一の分

子から一段階高次化したポリペプチドやポリ核酸など高次構造（ヘリックス、シートなど）をとり得る高分子（疑似生体物質）を基板上に固定した試料を対象としてとりあげる。さらに、複雑な膜として高分子表面や脂質二重膜に吸着したタンパク質などへと測定対象を高次化していく計画であった。実際には、研究対象は低分子の分子膜に留まった。これは研究を進めていった結果、生体高分子の膜試料の研究は水溶液環境下で指紋領域の振動 SFG スペクトルを測定することが不可欠であるが、それが既存の技術では難しいことが、明らかになったためであった。この問題を克服するために、研究期間の後半では、水溶液環境下にある単分子膜の指紋領域振動 SFG 分光を実現する方法を新たに開発した。

SFG 測定装置の改良としては、高出力な全固体化によるレーザーシステムの導入による、プローブレザーの安定化と赤外プローブの高輝度化を行うことを計画した。赤外プローブ光の高輝度化によって信号強度は増大する、また安定性の向上は測定データの信頼性を向上と長時間露光による微弱信号の検出を可能とする。実際には、配分された予算額を考慮し、高輝度化は断念し全固体レーザーの導入による安定化に重点を置いた改良を実行した。その際、パーソナルコンピュータ（PC）を利用した安価なフィードバック機構を工夫することで、一層の安定化を達成することを目指した。

## 4. 研究成果

[レーザービーム位置制御装置による和周波分光装置の安定化]

和周波分光法（SFG）の実験で安定した測定信号を得るには、入射レーザービームのポインティングの安定性が必要である。ビーム位置を検出しながらミラーを制御し安定化する自作の付加装置を現有する SFG 分光装置のレーザーシステムに組み込むことで、装置の長時間安定性を向上させることができた。

[二重共鳴 SFG 電子励起スペクトルの自動化測定]

振動バンドの SFG 強度について、SFG 信号光の波長に対する依存性を測定することで電子スペクトルを得ることができる（二重共鳴 SFG 電子励起スペクトル）。振動バンド毎の界面選択的な電子スペクトルである二重共鳴 SFG 電子励起スペクトルの測定効率化の為に、マルチプレックス SFG 分光装置を可視プローブ波長の自動変更が可能のように拡張した。拡張した装置では、波長可変可視プローブ光源である光学パラメトリック増幅器の波長、前置および主分光器の設定波長、試料部でのプローブレザーパワー、可視プローブ光学遅延ステージ、可動式試料ステージが PC により制御される。拡張の結果、励

起スペクトルの測定効率が格段に向上した。  
[金基板上のシアノターフェニル自己組織化単分子膜の二重共鳴 SFG 分光]

ジスルフィド基の両端にメチレン鎖を介してターフェニル基を導入した試料 (LC-dimer) と、純粋なアルキル鎖とメチレン鎖を介したターフェニル基を非対称に導入した試料 (LC-monomer) とに関して単分子膜を作製した。両試料の振動 SFG スペクトルはほぼ同じ強度パターンを持ち、両試料中でのターフェニル基の平均配向が同じであることが示唆された。一方、スペクトルの全体的強度に関しては、LC-monomer 試料の方がターフェニル基の面密度がおおよそ倍である LC-dimer 試料より大きかった。これは後者の試料膜中のターフェニル基の配向の乱れが前者のものより大きいためであると解釈した。またこの乱れは LC-dimer 試料の LC-monomer 試料に対する、二重共鳴電子励起スペクトルのバンド幅の増大と電子共鳴増強度の減少にも現れていると考えられる。

[金基板上のアデニン単分子膜の SFG その振動スペクトル]

核酸塩基の一つであるアデニンの単分子膜に関して UV プローブを用いた振動 SFG 分光による研究を行った。

異なる鎖長のアルキル鎖でアデニンを固定した数種類の単分子膜を作製し、芳香族分子に対して感度が高い電子振動二重共鳴 IR-UV SFG 分光法によって SFG スペクトルを測定した。スペクトルは電子共鳴効果によってアデニン部分の信号が選択的得られており、単分子膜のスペクトルがアルキル鎖長に依存して変化することを見いだした。簡単な配向のモデルをもとに量子化学計算を利用したスペクトルシミュレーションを行い、観測された変化をアデニン部分の配向の鎖長依存性として半定量的に評価した。

[ポルフィリン会合体薄膜の振動電子二重共鳴キラル SFG 分光]

振動電子二重共鳴 SFG (DR-SFG) は、分子薄膜のキラリティを検出するためにも有用な手法である。円偏光二色性 (CD) などの双極子禁制過程に基づく分光法と違い、SFG 分光を用いるキラリティ検出は双極子許容過程を利用しているため、高感度である。ランダム配向系のキラル SFG の信号強度はラマンテンソルの逆対称成分 (Albrecht の B 項) に由来しており、電子共鳴条件下でのみ実質的に測定が可能となる。

測定対象として D 体または L 体の酒石酸分子を鋳型として導入し形成したカイラルなポルフィリン (tetrakis-4-sulfonatophenyl porphyrin, TSPP) J-会合体薄膜を選択した。金属を含まないポルフィリンである TSPP は酸性水溶性中で会合体を形成するが、キラルな酒石酸分子が共存すると会合体は水溶液

中に分散した状態ではキラルな構造となることがわかっている。会合体分散液をガラス基板上にキャストすることで膜厚約 40 nm の試料薄膜を作製した。490 nm 付近の会合体の吸収 (J バンド) に共鳴する条件下で薄膜試料の振動 SFG を測定したところ、1300~950  $\text{cm}^{-1}$  領域で強いキラル SFG 信号が得られ、薄膜化した場合も会合体がキラルな構造であることが確認できた。信号発生機構を検討するために、観測された振動バンドの振幅の可視プローブ波長依存性 (DR-SFG 励起スペクトル) を測定した。特に、1090, 1130  $\text{cm}^{-1}$  バンドの励起スペクトルはキラル成分かアキラル成分かによって異なっており、吸収スペクトルとも異なった形となった。この特異なスペクトル形を、中間状態である振電準位が異なるいくつかのラマンテンソルの項の間の干渉効果として解釈した。

[水溶液中のシランカップリング膜の指紋領域振動 SFG 測定のための新規基板開発]

生体分子界面の研究において、生理学的な条件である水溶液中での測定が重要となる。我々は、シランカップリングによって作製した有機分子膜の水溶液中での振動 SFG 分光を可能とする新規の基板を開発した。開発した基板は、厚さ 125 nm のシリカ層を赤外に対して透明な  $\text{CaF}_2$  基板に蒸着することで作製した。シリカ層が十分薄いため、基板は紫外から赤外わたる広い領域に対して透明である。その結果、 $\text{CaF}_2$  基板側から紫外/可視と赤外プローブを入射することで、赤外プローブの水による吸収の妨害を受けることなく、シリカ層上のシランカップリング膜の審問領域振動 SFG スペクトルを水中で測定することが可能になった。テスト試料としてフェニルトリエトキシシラン ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ ) をシランカップリングによって固定した膜を作製し、SFG スペクトルを測定した。1600  $\text{cm}^{-1}$  付近にあるベンゼン環の伸縮振動バンドを、プローブ光を  $\text{CaF}_2$  基板側から照射する方法と分子膜側から照射する方法の二種類の方法で観測することができた。

[水溶液中のフルオレセイン単分子膜の DR-SFG 電子励起スペクトルの pH 依存性]

水溶液と接したシランカップリング分子膜の VSFG 分光を、水による赤外光の吸収による妨害を受けないように、基板側からプローブ光を入射させ実行した。この配置での測定を実現するために、我々が開発した紫外~赤外領域に対して透明な  $\text{CaF}_2$  上にシリカ薄膜層を蒸着させたシランカップリング用の基板を使用した。試験試料としてシリカ薄膜層上にシランカップリングによってフルオレセイン色素単分子膜を作製し、振動電子二重共鳴 SFG スペクトルの測定を行った。水溶液中のスペクトルは、溶液の pH によって大きく変化した。この原因は、フルオレセイン

色素のプロトン化状態の pH 依存性の為である考えられる。

この原因を詳しく検討する為には、pH 6.9 と 10.0 の 2 つ溶液中について、429~639 nm の範囲で 9 種類の可視プローブ光を用いて振動電子二重共鳴 SFG 電子励起スペクトルの測定を行った。励起スペクトルの振動モード依存性は小さく、また両 pH においてその形が良く一致していた。得られた励起スペクトルを Page 等の共鳴ラマン強度の理論を用いて解析したところ、ジアニオン種の電子スペクトルを変換することで、DR-SFG 電子励起スペクトルを再現できた。これは、両 pH の振動 SFG スペクトルはどちらもジアニオン種のものであり、pH による振動スペクトルの強度の変化はジアニオン-アニオン間の平衡の変化に、スペクトル形の変化はジアニオン種の配向や環境の変化を反映していると帰属した。[シリカ基板上のマレイミド単分子膜の作製とチオール化合物の固定]

我々が開発したシリカ蒸着 CaF<sub>2</sub> 基板を利用した単分子膜の水溶液中での指紋領域振動 SFG スペクトル測定法を、様々な生体分子膜へ適用することを想定して、チオール基を持つ様々な分子を固定するためのシリカ基板上に形成したマレイミド単分子膜の作製方法を検討した。マレイミド基はチオール基と容易に結合するため、作製した膜上にチオール化合物を固定できる。

作製したマレイミド膜固定されたマレイミド基の配向角を、振動 SFG 分光によって評価した。また、そのチオール化合物の固定能力の評価を、チオール基を有するアデニンとフルオレセイン色素を用いて行った。その結果、チオール化合物の固定量と配向性には、マレイミド基と基板をつなぐメチレン鎖の鎖長に依存し、鎖長 11 の膜の方が鎖長 3 の膜より、チオール化合物の固定量についても配向度についても優れていることがわかった。

#### 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 8 件)

(査読有り原著論文)

- 1) Adchara Padermshoke, Shouta Konishi, Masato Ara, Hirokazu Tada, and \*Taka-aki Ishibashi, *Applied Spectroscopy*, “Novel SiO<sub>2</sub>-deposited CaF<sub>2</sub> Substrate for Vibrational SFG Measurements of Chemisorbed Monolayers under Aqueous Environment”, in press.
- 2) Tetsuhiko Nagahara, Hitoshi Fukushima, Misako Aida, \*Taka-aki Ishibashi, “Self-assembled monolayers of cyanoterphenyl terminated alkyl disulfides studied by

vibrationally and electronically doubly-resonant sum-frequency generation spectroscopy”, *Chemical Physics Letters*, **506**, 190-195 (2011). (doi:10.1016/j.cplett.2011.03.019)

3) Tetsuhiko Nagahara, Takumi Suemasu, Misako Aida, \*Taka-aki Ishibashi, “Self-Assembled Monolayers of Double-Chain Disulfides of Adenine of Au: An IR-UV Sum-Frequency Generation Spectroscopic Study”, *Langmuir*, **26**, 389-396 (2010). (DOI: 10.1021/la9021992)

4) Tetsuhiko Nagahara, Kenji Kisoda, Hiroshi Harima, Misako Aida, \*Taka-aki Ishibashi, “Chiral Sum-Frequency Spectroscopy of Thin Films of Porphyrin J-Aggregates”, *Journal of Physical Chemistry B*, **113**, 5098-5103 (2009). (DOI: 10.1021/jp8105138)

5) Toshiki Maeda, Tetsuhiko Nagahara, Misako Aida, \*Taka-aki Ishibashi, “Identification of chemical species of fluorescein isothiocyanate isomer-I (FITC) monolayers on platinum by doubly-resonant sum-frequency generation spectroscopy”, *Journal of Raman Spectroscopy*, **39**, 1694-1702 (2008). (DOI: 10.1002/jrs.2131)

6) Toshiki Maeda, Taka-aki Ishibashi, “Infrared-Ultraviolet Sum-Frequency Generation Spectrometer with a Wide Tunability of the Ultraviolet Probe”, *Applied Spectroscopy*, **61**, 459-464 (2007). (DOI: <http://dx.doi.org/10.1366/000370207780807812>)

(査読有り解説論文)

7) \*石橋孝章, 振動和周波発生分光法 (講座赤外分光測定法-基礎と最新手法), *分光研究*, **60**, 195-204 (2011).

8) \*石橋孝章, 振動電子二重共鳴和周波発生分光による有機分子膜の研究, *レーザー研究*, **37**, 752-757 (2008).

[学会発表] (計 33 件)

(国際会議発表招待講演)

1) Taka-aki Ishibashi  
“Vibrational SFG Studies of Chemisorbed Monolayers on Silica-Deposited CaF<sub>2</sub> Substrates in Aqueous Environments”

The Third Asian Spectroscopy Conference  
(Xiamen China, November 28 – December 1, 2011)

2) Taka-aki Ishibashi  
“Doubly-resonant SFG studies of organic monolayers with widely tunable UV/VIS probe”  
2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Recent Advances in Studies of Molecular Processes at Liquid Interfaces  
(Honolulu, USA, December 16-19, 2010)

3) Taka-aki Ishibashi  
“Vibrationally-Electronically Doubly-Resonant Sum-Frequency Generation Spectroscopy of Molecular Thin Films”

The Division of Laser Science (DLS) of the American Physical Society (APS) 25th annual meeting

(San Jose, USA, October 11-15, 2009)

4) Taka-aki Ishibashi (Plenary)

“Development of a Multiplex Spectrometer for Doubly-Resonant SFG spectroscopy”

The annual meeting of the Federation of Analytical Chemistry and Spectroscopy (FACSS) (Reno, USA, September 28 - October 2, 2008)

5) Taka-aki Ishibashi

“Vibrationally-electronically doubly-resonant SFG spectroscopy of interface species”

Tokyo International Symposium on Time- and Space-resolved Vibrational Spectroscopy (Tokyo, Japan, January 23-24, 2008)

6) Tetsuhiko Nagahara, Misako Aida, Taka-aki Ishibashi

Electronically-Vibrationally Resonant Sum Frequency Generation: Application to Chiral Spectroscopy of Thin Films of Porphyrin

The Annual Meeting of the Spectroscopical Society of Japan, Tokyo

(Tokyo, Japan, November 12-14, 2007)

7) Taka-aki Ishibashi

“Electronically-Vibrationally doubly resonant SFG spectroscopy: a sensitive and selective probe for aromatic molecules at interfaces”

The 67th Okazaki Conference “Molecular Science and Chemical Biology of Biomolecular Function”

(Okazaki, Japan, November 10-12, 2007)

(国内会議発表招待講演)

8) 石橋孝章

水溶液中のシランカップリング膜の指紋領域における振動 SFG 分光

第 5 回 SFG 研究会

(仙台, 2012/03/10)

9) 石橋孝章

有機単分子膜／薄膜の振動和周波発生分光

日本分光学会 近赤外分光部会・赤外ラマン分光部会 合同シンポジウムシンポジウム「赤外・近赤外分光法により探る凝縮相・表面・バイオプロセス」

(広島, 2011/01/28)

10) 石橋孝章・永原哲彦

ポルフィリン会合体薄膜の振動電子二重共鳴キラル SFG 分光

シンポジウム「表面・界面を観る非線形分光の新しい展開」

(和光, 2009/03/24)

11) 石橋孝章

振動電子二重共鳴 SFG 分光法 — 生体分子膜の高感度測定を目指して特定領域研究「高次系分子科学」ミニ公開シンポジウム「イオンチャネルの構造ダイナミクス」

(福井, 2008/07/09)

12) 石橋孝章

赤外可視和周波分光法とその有機薄膜への応用

早稲田大学理工学術院大学院講演会

(東京, 2007/06/29)

[産業財産権]

○取得状況 (計 2 件)

①名称: 和周波発生分光装置及び和周波発生分光法

発明者: 石橋孝章、大西洋

権利者: 広島大学、神戸大学

種類: 特許

番号: 第 4719879 号

取得年月日: 平成 23 年 4 月 15 日

国内外の別: 国内

②名称: 和周波発生分光装置および方法

発明者: 大西洋、石橋孝章

権利者: (財) 神奈川科学技術アカデミー

種類: 特許

番号: 第 4955863 号

取得年月日: 平成 23 年 3 月 23 日

国内外の別: 国内

③名称: 金属酸化物表面の機能化法及びその方法により表面が機能化された金属酸化物

発明者: 大西洋、石橋孝章

権利者: (財) 神奈川科学技術アカデミー、

(独) 科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 第 4351541 号

取得年月日: 平成 21 年 7 月 31 日

国内外の別: 国内

④名称: 4 次の非線形光学効果に基づく界面の時間領域振動分光法および装置

発明者: 大西洋、藤芳暁、石橋孝章

権利者: (財) 神奈川科学技術アカデミー、

(独) 科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 第 4398261 号

取得年月日: 平成 20 年 10 月 30 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 孝章 (ISHIBASHI TAKA-AKI)

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号: 70232337

(2) 研究分担者 (無し)

(3) 連携研究者 (無し)