

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05671

研究課題名(和文) 表面増強ラマン散乱明滅現象の二色同時超解像撮影による金属上分子配向変化の解明

研究課題名(英文) Detection of molecular orientation via simultaneous bi-color movie of blinking surface-enhanced Raman scattering

研究代表者

北濱 康孝 (Kitahama, Yasutaka)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任研究員

研究者番号：00342775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：金属ナノ構造体表面あるいは近傍の分子から発する表面増強ラマン散乱(SERS)と表面増強蛍光(SEF)の明滅現象を、二色に分けることで同時に動画を撮影し、冪乗則で解析した。その結果、SERSおよびSEF活性分子の動き方の違いを検討できることがわかった。また、同時刻でのSERSとSEFの強度を多数プロットした分布から、1分子計測の可否や金属表面での分子運動の違いを検討した。さらに、超解像イメージングでSERS/SEF活性分子の正確な位置を決定した。励起光を強くすると位置のゆらぎが小さくなったことから、金属表面で増強された光圧により単一分子を光ピンセットで捕捉していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の二色同時動画の撮影と解析から、超高感度分析の極北である1分子計測ができているかを簡便に調べられることを示した。また、触媒反応で重要な金属表面・近傍での分子の動き方の違いも検討できることも示した。さらに、今回の金属ナノ構造体表面での光圧捕捉では、単一分子を常温の溶液中でも操作できる。金属ナノ構造体の位置を精密に制御することは既存の走査型プローブ顕微鏡で可能である。その装置による光ピンセットを用いれば、非接触で分子を配置できる上に、表面増強ラマン散乱スペクトルから希望の分子を同定できるので、様々な分子を自由に組み合わせた分子素子の開発も可能となる。

研究成果の概要(英文)：Blinking surface-enhanced Raman scattering and fluorescence (SERS and SEF), which are emitted from a molecule on and near the surface of a noble metal, respectively, were simultaneously observed in different wavelength regions. Then the bi-color movie was analyzed by a truncated power law. From the power-law exponents and the truncation times, we can estimate the behavior of the SERS- and SEF-active molecule.

Also from a fluctuation in the bi-color intensity ratios, the molecular behavior on and near the surface can be estimated. Moreover, it suggests single-molecule detection that SERS of an analyte was not observed while SEF of another analyte was emitted.

By super-resolution imaging, the precise positions of the SERS- and SEF-active molecule were detected. As the excitation laser intensity increased, the fluctuation of the positions was decreased. This indicates that the single molecule was optically trapped via plasmon-resonance.

研究分野：物理化学、分析化学、分子分光學

キーワード：1分子計測 光ピンセット 超解像イメージング 冪乗則 明滅現象 表面増強ラマン散乱 表面増強蛍光 プラズモニクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

表面増強ラマン散乱 (SERS) 分光法は、非蛍光性分子にも適用可能で、シャープな振動ピークから分子構造などの詳細な情報が得られるだけでなく、極めて高感度な1分子計測も可能である。この感度の高さの原因は、入射光と結合した局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) によって、金・銀ナノ微粒子の凝集接点に高強度光電場が誘起され、そこに吸着した分子からのラマン散乱光が著しく増強される上に、この散乱光と LSPR が結合して二段階の増幅が起きるためと考えられる。この SERS の散乱効率は共鳴ラマン効果も含めると、通常に比べ 10^{12} 倍にも増加するため、単一分子レベルでの振動分光も可能となる。しかし、この高感度な SERS 分光法の実用化のためには解明すべき現象がいくつかある。

その一つが SERS 光の明滅現象である。この起源は金・銀ナノ微粒子の凝集接点に生じた高強度な光励起電磁場への単一分子の出入りによるもので、同じく明滅現象が観測される単一分子蛍光分光のように、単一分子 SERS 分光の証拠と考えられている。しかし近年では、吸着分子の光・熱分解によるアモルファス炭素などの不純物の SERS スペクトルが明滅を示すなど、単一分子分光の証拠としては、離散的な SERS 強度の測定や、二種類の分子を含む試料からの一方のみの SERS スペクトル観測など、明滅現象以外での確認の必要性も指摘されている。さらに、SERS 増強度が大きい銀を用いると、金の場合より頻繁に明滅現象が起き、スペクトル再現性の欠如の原因となる。このように明滅現象の機構解明は単一分子 SERS 分光の実用化にとって重要である。

申請者は、単一量子ドット蛍光の明滅現象の研究を参考にして、銀ナノ微粒子凝集体に吸着したチアカルボシアニン系色素分子の SERS の明滅現象を冪乗則により解析してきた[1]。冪乗則による解析は、明滅間隔がランダムに数ミリ秒から数十秒までになり平均間隔を定義するのが困難な明滅現象の研究に適している。量子ドットの場合、暗状態の時間間隔とその頻度が冪乗則に従うが、長く保たれる明状態は冪乗則の予想より頻度が小さくなるという数多くの実験例が知られており、この普遍的な結果を説明するための理論も提案されている。一方、申請者は、SERS 明滅現象における時間間隔とその頻度が単一量子ドット蛍光とは全く正反対の特徴を示すことを初めて発見した。これは、明状態に対してエネルギー障壁がある準安定な SERS 暗状態が存在することを示唆している。また、吸着分子の金属表面上での運動とプラズモンによる増強電磁場の双方が大きく影響していることを示し、吸着分子の運動がコロイド銀ナノ粒子上の保護基の量によって異なる事を見いだした。従来の SERS 明滅現象の研究では各々の金属ナノ微粒子凝集体での平均明滅継続時間などが用いられてきたが、暗状態ではその回数が増えるに連れ合計時間が減るというように平均という概念が適用できない事を、初めて申請者が明らかにし、冪乗則による解析こそが SERS 明滅現象の研究に最適という特色を示している。近年、超解像イメージング (2014 年ノーベル化学賞) によって、SERS 光を発する分子が金属ナノ微粒子の凝集接点のどの部分に存在してどのような運動をしているかを詳細に観測する研究が行われているが[2]、この手法では凝集接点以外の金属表面に存在する分子の運動は原理的に観測する事ができない。一方、冪乗則による SERS 明滅現象からは、暗状態すなわち凝集接点以外の金属表面上の単一分子が一次元あるいは二次元的な動きをしている事などが簡便に推測できた。さらに、それ単体でも様々な色の発光が観測される銀ナノコロイド微粒子に、ポリマーを吸着させた SERS 明滅現象の研究では、背景発光と SERS を波長的に分離して測定を行った。その結果、暗状態保持時間の確率分布が冪乗則からずれ始める時間が違っていた。これは背景発光と SERS の発光源の銀表面上での運動速度が異なることを示唆している。しかし、この研究は同一銀ナノコロイド微粒子での異なる波長での明滅現象を同時に観測した結果ではない。

そこで今回、イメージスプリッティング光学系を用いて同じ分子の異なる振動モードでの SERS 明滅現象を観測することで、どの置換基が増強電磁場に対してラマン活性あるいは不活性に変わっていくのか、すなわち金属表面上での分子配向の時間変化を観測することができると思い、本研究の着想に至った。今回のイメージスプリッティング光学系を用いた観測では、同じ分子の異なる振動モードが活性になる時間情報を数十ミリ秒という短いスケールまで得られる。また、超解像イメージングの活用で明滅現象の機構を正確に区別する事ができる。これにより、単一分子の並進だけでなく回転に関する情報を簡便に取得できる事が予想される。この情報から金属ナノ微粒子などの金属界面で起きるクリーンかつ省エネルギーな触媒反応の解明へと繋がる事が期待できる。

2. 研究の目的

同一銀ナノ微粒子凝集体上の SERS 活性分子の発光強度の時間変化を異なる波長で観測し (二色同時撮影)、その時間変化の確率分布を冪乗則で解析して冪指数や冪乗則からずれ始める時間といった定量的な指標を得る。次に、冪乗則指標の違いや超解像イメージングの時間変化に注目する事で、SERS 活性分子の並進運動や配向変化などを検討する。SERS および表面増

強蛍光 (SEF) は、それぞれ銀表面上あるいは表面から少し離れた分子から発するので、異なる波長の SERS と SEF の観測では分子運動の違いが見られるかもしれない。また、プラズモン共鳴時には銀ナノ凝集体接点の増強電磁場による単一分子光ピンセット (レーザートラップ) のような現象が起きていると、冪乗則による解析から考えられてきたが、この予測を超解像イメージングで直接的に確認できる機会となる。

3. 研究の方法

(1) クエン酸ナトリウムを還元剤および保護基として作成した銀ナノコロイド微粒体に色素分子などを吸着させ NaCl 水溶液で凝集させた多数の同一銀ナノ凝集体に 532 nm のレーザー光を照射して、発生する信号光をイメージスプリッティング光学系に通して、異なる波長域の SERS および SEF として同時に動画撮影した。その明滅頻度 $P(t)$ とその継続時間 t を指数関数付き冪乗則 $P(t) = At^{-\alpha} \exp(-t/\tau)$ で解析して、そこからずれ始める時間 τ や冪指数 α の相関から、銀表面での動き方 (一/二次元的) と速さの違いを検討した。

(2) 二次元ガウス関数でのフィッティングによる超解像イメージングで SERS および SEF 活性分子の詳細な位置決定を行い、励起光強度などが及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

(1) まず、銀ナノ凝集体にポリ-L-リジンあるいはチアカルボシアニン色素分子を吸着させた試料の発光明滅現象を、同一の凝集体から波長を分けて同時に観測し、短波長側と長波長側との発光強度の相関を調べると共に、明暗状態の保持時間とその確率分布を冪乗則で解析した。

ポリ-L-リジンでは、短波長側が発光している時には長波長側が発光していないという特徴が見られた (図 1)。一方、チアカルボシアニンの場合は、短波長側が発光している時に長波長側も発光しているということがわかった。ポリ-L-リジンでは、短波長側に SERS ピークが現れ、長波長側にブロードな発光バンドが現れるが、後者の起源は銀ナノ微粒子の酸化膜が光還元されてできた発光性銀原子クラスターによる蛍光である。すなわち、二種類の発光源があるが、極微小な凝集接点に入ることができるのはどちらかだけなので、短波長側あるいは長波長側だけが発光したと考えられる。これは、単一分子分光の証拠と言える。一方、チアカルボシアニンでは、短波長側に SERS ピークが現れるとともに、長波長側にもその色素由来の SEF が現れる。すなわち、発光源が同じであるため、短波長側と長波長側で同時に発光が観測されたと考えられる。

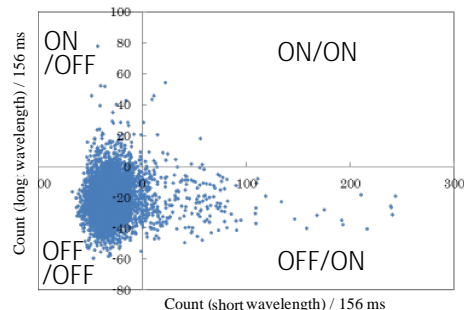


図 1 ポリ-L-リジンで修飾した同一銀ナノ凝集体からの長/短波長域で同時に観測された発光の強度相関

SERS における冪指数 α は、立体障害を持ち梯子状に会合した H 会合体を生成する色素分子においては、ほぼ一定であった。一方、立体障害を持たず階段状に会合した J 会合体を生成する色素分子においては、SEF における冪指数がほぼ一定であった。これらは、各分子の吸着力の強弱に伴う、銀表面あるいは少し離れた面での分子の運動の違いが原因と考えられる。前者は吸着力が弱いので、SERS が発生する銀表面でも動けるものの、少し離れると SEF 活性な表面からの距離を保てなくなるのに対して、後者は吸着力が強いので、少し離れても SEF 活性な距離を保ちながら並進運動できるために、冪指数が一定になると考えられる。

暗状態保持時間の確率分布が冪乗則からずれ始める時間 τ に関して検討した。ポリ-L-リジンの場合、背景発光の方が早くずれ始めており、その発光源である銀原子クラスターの銀表面上での運動速度の方が速いことを示唆している。この結果は異なる多数の銀ナノ凝集体での実験でも示唆されていたが、今回、同一銀ナノコロイド微粒子による明滅現象の同時観測で確認することができた。一方、色素分子の場合は発光源が同じにも関わらず SERS の方が早くずれ始めていた。これは明状態に対してエネルギー障壁がある準安定な SERS 暗状態と SEF 暗状態の空間的分布が異なるためと考えられる。

また、シクロデキストリンを保護基として作成した非等方的な銀ナノ微粒子からの SERS 明滅現象を冪乗則で解析した。その結果、冪乗則からずれ始める時間が複数ある場合 (図 2) や、ずれがきつ $\exp(-t/\tau)$ では表す事ができない場合があった。これは、異なるエネルギー障

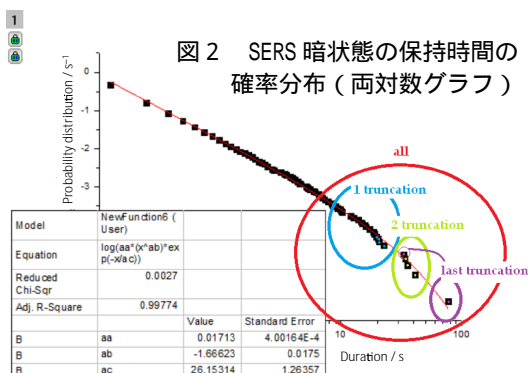


図 2 SERS 暗状態の保持時間の確率分布 (両対数グラフ)

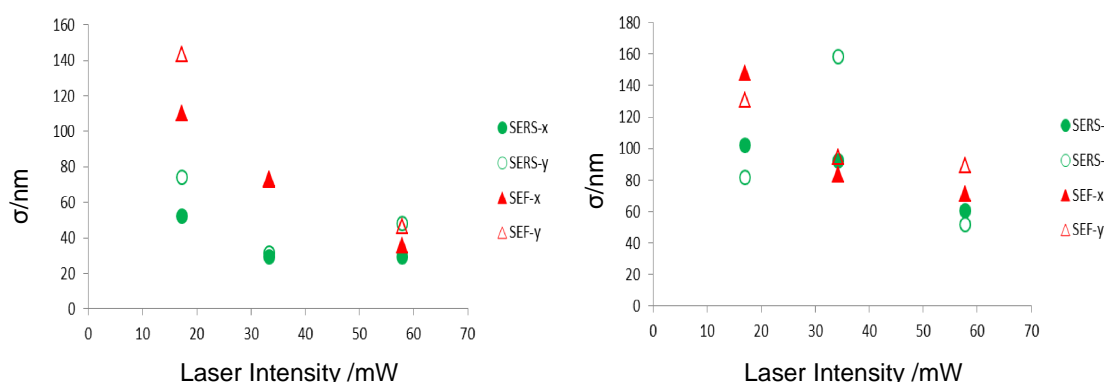
壁を持つ準安定な SERS 暗状態が複数あることや、従来とは違う分子運動を示唆しているのかもしれない、更なる検討が必要である。

(2) 色素分子を吸着させた銀ナノ微粒子を波長 532 nm の光で励起し、同時に二色に分けることで SERS と SEF の明滅現象を動画撮影し、発光源の正確な位置を二次元ガウス関数でフィットすることで決定する超解像イメージングを用いて、その空間的揺らぎを調べた。これまで、光の回折限界により波長の半分程度までしか絞り込めなかったが、二次元ガウス関数でフィッティングする超解像イメージングにより、回折限界を超えた正確な分子の位置決定が可能となった。今回、レーザー強度を変えることで SERS/SEF 活性分子位置の揺らぎがどう変化するかを研究した。色素および銀コロイド溶液に 5 mM または 1 M NaCl 溶液を混合した試料溶液をスライドガラスに滴下しスピンコートして、サンプルとした。二色同時超解像イメージングにより同一銀ナノ微粒子に吸着した単一色素分子からの SERS と SEF の明滅現象を同時測定し、レーザー強度・試料溶液調製時の塩濃度・SERS 対 SEF の三点で比較した。

SERS および SEF 活性分子の正確な位置の時間変化を見たところ、SERS での空間的揺らぎが減少するにつれて SEF での空間的揺らぎが増大するという結果も得られた。これは、銀表面で揺らいでいた SERS 活性分子が離脱して SEF 活性となる少し離れた面へ移動し、そこで分子の揺らぎが観測された場合と考えられる。

レーザー強度を大きくするにしたがい、SERS および SEF 活性分子の空間的揺らぎが小さくなることを確認できた。その揺らぎをヒストグラムにして、その線幅が標準偏差に対応するため、各塩濃度、各色素に対して標準偏差をとった。図 3 にチアジカルボシアニン色素を用いた場合のレーザー強度と揺らぎ(標準偏差)の関係を示す。レーザー強度を大きくすると、試料溶液調製時に 5 mM NaCl 溶液で銀ナノ凝集体を作成した場合にのみ分子位置の揺らぎが小さくなり、1 M NaCl 溶液で作成した場合には分子位置の揺らぎはほぼ変わらなかった。この原因

図 3 レーザー強度に対するチアジカルボシアニン色素分子の位置揺らぎの標準偏差
(左：試料溶液調製に 5mM NaCl 溶液を使用、右：1M NaCl 溶液を使用)



としては、励起光強度変更がおよぼす SERS/SEF 強度とエラーへの影響が考えられる。励起光を強くするにつれて SERS/SEF 強度が大きくなるなら、フィッティングエラーが小さくなり、このことにより発光源の位置の揺らぎが小さくなっているようにみせられるかもしれない。しかし実際には、励起光強度を大きくしても SERS および SEF 強度はそれぞれあまり変わらず、フィッティングエラーの大きさについてもあまり変わらなかったため、これが原因ではないと考えられる。またこれが原因だと仮定すると、5 mM だけではなく 1 M NaCl 溶液で作成した場合でも同じような効果が起きるはずだが、実際には起きていない。すなわち、レーザーを照射することで、波長よりも小さいような微粒子などに電気双極子を誘起し、微粒子を焦点方向へ引き寄せて捕捉する光ピンセット(レーザートラップ)が、5 mM NaCl 溶液で作成した銀ナノ凝集体の場合にプラズモン共鳴で増強されて起きていると考えられる。

また SEF の方が SERS よりも分子位置の揺らぎが大きいという傾向が示された。SERS は銀コロイド表面上で、SEF は銀ナノコロイド表面から離れた場所で生じるため、SERS と比較して、活性分子が表面に吸着せず離れた位置にいるために、自由に動くことが可能で、受ける電磁場の増強率が小さい SEF の方が、揺らぎが大きくなったと考えられる。吸収と発光波長が近くプラズモン共鳴による二段階増強が起きている SEF は、吸収と発光波長が離れて二段階増強が起きている SEF よりも発光源の位置分布が広がることが報告されている[3]。これはプラズモンクス構造体との光学的な結合により正確な位置決定ができなくなる mislocalization 効果によるものだが[2]、同じように二段階増強が起きている SERS の場合には当てはまらないことがわかった。

空間的揺らぎの時間変化をフーリエ変換して、パワースペクトル密度を求めた。試料溶液調製時に 5mM NaCl 溶液を使用した場合のグラフは両対数グラフで斜めの直線、1M NaCl 溶液を

使用した場合は水平線が折れ曲がるローレンツ型曲線となった。前者はランダムなノイズに起因するものとされており、後者は通常の光ピンセットで見られる調和振動子的な動きをしていると思われる。前者のようにプラズモン共鳴が起きた状況では、冪乗則での解析からも SERS 活性分子がランダムな振る舞いを示すことが示されており[1]、異なる手法による解析から同じ結果を得ることができた。

< 引用文献 >

[1] Y. Kitahama, Y. Ozaki, “Chapter 6 Analysis of blinking SERS by a power law with an exponential function” in “*Frontiers of Surface-Enhanced Raman Scattering: Single-Nanoparticles and Single Cells*”, Wiley, 2014, 107—137. [2] K. A. Willets, A. J. Wilson, V. Sundaresan, P. B. Joshi, *Chem. Rev.*, **117**, 2017, 7538—7582. [3] D. L. Mack, E. Cortés, V. Giannini, P. Török, T. Roschuk, S. A. Maier, *Nat. Commun.*, **8**, 2017, 14513.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 3 件）

Yasutaka Kitahama, Yumi Nishiyama, Yukihiro Ozaki, “Blinking surface-enhanced Raman scattering and fluorescence from a single silver nanoaggregate simultaneously analyzed by bi-color intensity ratios and a truncated power law”, *J. Phys. Chem. C*, 査読有, Vol. 122, 2018, pp. 22106—22113, DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b06920

Yasutaka Kitahama, “Observation and analysis of blinking surface-enhanced Raman scattering”, *J. Vis. Exp.*, 査読有, Vol. 131, 2018, e56729-1—e56729-10, DOI: 10.3791/56729, <https://www.jove.com/video/56729/>

Yasutaka Kitahama, Takuji Nagahiro, Yoshito Tanaka, Tamitake Itoh, Yukihiro Ozaki, “Analysis of blinking from multicoloured SERS-active Ag colloidal nanoaggregates with poly-L-lysine via truncated power law”, *J. Raman. Spectrosc.*, 査読有, Vol. 48, 2017, pp. 570—577, DOI: 10.1002/jrs.5079

〔学会発表〕（計 16 件）

Yasutaka Kitahama, “Power-law analysis and super-resolution imaging of blinking surface-enhanced Raman scattering and fluorescence”, The 26th International Conference on Raman Spectroscopy, 2018

Yasutaka Kitahama, Misato Funaoka, Yukihiro Ozaki, “Blinking surface-enhanced Raman scattering and fluorescence analyzed by super-resolution imaging”, International Conference on Advancing Molecular Spectroscopy, 2018

Beata Wrzosek, Yasutaka Kitahama, Yukihiro Ozaki, “SERS blinking on anisotropic nanoparticles”, International Conference on Advancing Molecular Spectroscopy, 2018

Yasutaka Kitahama, Shohei Uemura, Sanpon Vantasin, Yoshito Tanaka, Toshiaki Suzuki, Daichi Doujima, Tadaaki Kaneko, Yukihiro Ozaki, “Raman imaging and tip-enhanced Raman scattering for epitaxial graphene grown on SiC”, META2018: the 9th International Conference on Metamaterials, Photonic Crystals and Plasmonics, 2018

北濱康孝、船岡美里、西山由美、尾崎幸洋、「冪乗則と超解像イメージングによる表面増強ラマン散乱・蛍光明滅現象の研究」、日本化学会第 98 春季年会、2018

船岡美里、北濱康孝、尾崎幸洋、「超解像イメージングによる表面増強ラマン散乱と表面増強蛍光の明滅現象の研究」、日本化学会第 98 春季年会、2018

Yasutaka Kitahama, “Blinking surface-enhanced Raman scattering and fluorescence from polyamino acid or dye molecules on the same silver nanoaggregate”, META2017: the 8th International Conference on Metamaterials, Photonic Crystals and Plasmonics, 2017

Yasutaka Kitahama, Shohei Uemura, Ryota Katayama, Yuko S. Yamamoto, Toshiaki Suzuki, Tamitake Itoh, Yukihiro Ozaki, “Evaluation of probes for tip-enhanced Raman scattering by darkfield microspectroscopy and calculation”, SPIE Optics+Photonics, 2017

Prompong Pienpinijtham, Sanpon Vantasin, Yasutaka Kitahama, Sanong Ekgasit, Yukihiro Ozaki, “Extension of nano-scaled exploration into solution/liquid systems using tip-enhanced Raman scattering”, SPIE Optics+Photonics, 2017

北濱康孝、西山由美、尾崎幸洋、「二色同時動画撮影による表面増強ラマン散乱および蛍光明滅現象の解析」、第 11 回分子科学討論会、2017

北濱康孝、西山由美、尾崎幸洋、「SERS 明滅現象の二色同時動画撮影による研究」、日本化学会第 97 春季年会、2017

Yumi Nishiyama, Yasutaka Kitahama, Yukihiro Ozaki, “Study of blinking surface-enhanced Raman scattering of poly-L-lysine”, Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, 2016

Yasutaka Kitahama, Hiroaki Hayashi, Tamitake Itoh, Yukihiro Ozaki, “Detection of acidity on

yeast by surface-enhanced hyper Raman via optical trapping”, Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, 2016

Yasutaka Kitahama, Hiroaki Hayashi, Tamitake Itoh, Yukihiro Ozaki, “Surface-enhanced hyper-Raman scattering from optically trapped silver nanoparticles on yeast”, SciX2016, 2016

北濱康孝、林宏彰、伊藤民武、尾崎幸洋、「レーザートラッピングによる酵母細胞酸性度の表面増強ハイパーラマン散乱マッピング」、第10回分子科学討論会、2016

北濱康孝、長広拓志、田中嘉人、伊藤民武、尾崎幸洋、「銀ナノ微粒子からの多色発光明滅現象の機構と挙動」、平成28年度日本分光学会年次講演会、2016

〔図書〕（計 1件）

Yasutaka Kitahama, American Chemical Society, “Chapter 4 Truncated Power Law Analysis of Blinking SERS” in “*Frontiers of Plasmon Enhanced Spectroscopy Volume 1 (ACS Symposium series Vol. 1245)*”, Y. Ozaki, G.C. Schatz, D. Graham, T. Itoh (editors), 2016, pp. 55—94

〔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。