

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 18日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21360031

研究課題名（和文） 生体分子計測用テラヘルツ帯コヒーレントラマン分光手法の開拓

研究課題名（英文） Development of Coherent Raman Spectroscopy for Biological Molecules in Terahertz Frequency Region

研究代表者：

谷 正彦（TANI MASAHIKO）

福井大学・遠赤外領域開発研究センター・教授

研究者番号：00346181

研究成果の概要（和文）：

生体高分子のテラヘルツ帯の非線形、大振幅の振動モードは生体高分子の熱力学特性を支配し、その機能や反応に関与していると考えられている。そのような生体高分子のテラヘルツ帯振動モードを観測することを目的とし、周波数チャープさせたフェムト秒レーザーパルスを用いた起光として用い、信号を時間領域で検出する新しいコヒーレントラマン分光法（時間領域テラヘルツ帯コヒーレントラマン分光法）を開発し、さらにその高度化に取り組んだ。

研究成果の概要（英文）：

Anharmonic and large-amplitude vibrational modes in biological macro-molecules are thought to be important for their functions and interaction with other molecules, governing the thermo-dynamical the properties. To observe such molecular vibrations in terahertz (THz) frequency region, a novel coherent Raman technique (THz Time-Domain Coherent Raman Spectroscopy), which utilizes THz optical beats created by two frequency-chirped femtosecond pulses and detects the coherent Raman signal in time-domain, has been developed and applied to some non-organic samples for demonstration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎、応用光学・量子光工学

キーワード：光計測、テラヘルツ分光

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質などの生体高分子は、水素結合やファンデルワールス力、疎水性相互作用など比較的弱い相互作用を媒介として、機能発

現に必要な固有高次構造を形成あるいは変化させており、その相互作用のエネルギーはちょうどテラヘルツ(THz)帯に対応している。また室温の 300 K を周波数に換算すると約

6 THz (= 200  $\text{cm}^{-1}$ , ~25 meV)であるが、タンパク質などの生体高分子は室温における熱揺らぎ程度の大きさのエネルギーを巧みに利用して機能発現あるいは構造変化を行っていると考えられている。したがって 6 THz 付近またはそれ以下の周波数の大振幅振動モードが生体分子の構造変化と機能に大きく関与しているのではないかと推定されている。実際、タンパク質の基準モード計算では、分子全体が大きく振動するモードが THz の領域(<120  $\text{cm}^{-1}$ )で確認されている[1-2]。また振動の周波数が低いほど振幅および非調和性が大きくなり、サブ THz(<30  $\text{cm}^{-1}$ )の領域のモードが分子全体のエントロピーすなわち熱力学的特性を支配していることが示唆されている[1]。このようなことから THz 帯の振動スペクトルはタンパク質を含む生体分子の機能やダイナミクスを探る上で重要な情報を提供するものと考えられている。しかし残念ながらこのようなタンパク質分子全体の delocalized した低振動数モードの研究は実験的にはあまり進んでいない。ヘムタンパクなど一部のタンパク質の localize した振動モード (porphyrin 構造とそれに結合する ligand 間の振動モードなど) が stimulated Raman scattering などの手法で観測されている程度である[3]。

我々は、近年開発された THz 領域の赤外吸収分光法であるテラヘルツ時間領域分光法(THz-TDS)を用いて、タンパク質などの生体分子のスペクトルを測定し低振動数モードのダイナミクスを調べる試みを行ってきた。その結果 THz-TDS により振動モードの密度分布を反映した生体分子のスペクトルが得られることが分かった。またそれらの振動モードが THz 帯で大きな非調和性を示すことを示唆する結果をタンパク質(乾燥または一部水和状態の試料)の温度依存吸収スペクトルから得ている。しかし、THz-TDS のような吸収を利用した分光法では、水の強い吸収のために、より天然状態に近い水溶液中での生体分子の観測が容易ではない。そこで赤外吸収分光と並ぶもうひとつの振動分光であるラマン分光を水和状態、あるいは水溶液状態の生体分子の THz 帯振動スペクトルの測定に用いることが考えられる。ラマン分光では励起光(入射光)として水に対して吸収のほとんどない可視あるいは近赤外光を用いることができ、また空間分解能も高い (~1 $\mu\text{m}$ )。

[1] Go, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 3696 (1983).  
 [2] Brooks, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 4995 (1985).  
 [3] Champion, *et al.*, J. Phys. Chem. A **106**, 3540 (2002).

## 2. 研究の目的

我々はコヒーレントラマン分光を THz 帯で行う新手法を開発した。分子や物質のスペクトル情報をもとにその分布可視化することを「分光イメージング」というが、コヒーレントラマン信号は通常のラマン信号よりも何桁も強度が強いため、ラマン信号に基づく分光イメージングを短時間で取得することが可能である。THz 帯のコヒーレントラマン分光により THz 帯の生体高分子の低振動モードダイナミクスを探ることができるのみならず、生体分子の生物組織内での分布や、反応による時間変化を可視化することができれば、生体分子分光の強力なツールとなりえる。

本研究の第1の目的はこの新しい THz 帯のコヒーレントラマン分光法を生体分子分光に適用するために、高度化、高感度化することである。また第2の目的は開発したコヒーレントラマン分光法を、タンパク質などの生体高分子の THz 帯(<12THz = 400  $\text{cm}^{-1}$ )の振動スペクトルの観測に適用し、生体分子の低振動モードダイナミクスを探ることである。

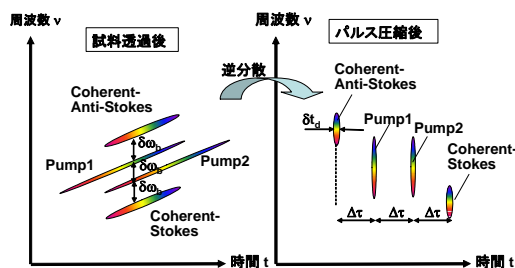


図1. 周波数チャープパルスによるコヒーレントラマン信号の発生とパルス圧縮による時間分離

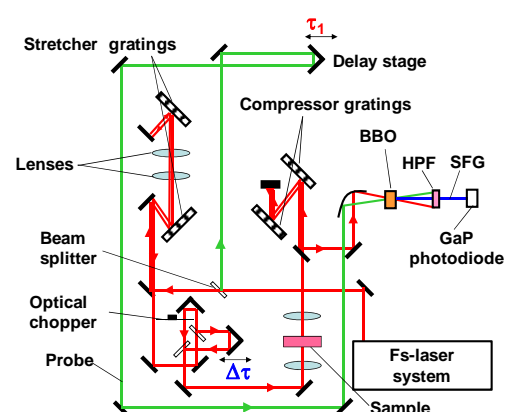


図2. 時間領域コヒーレントラマン分光装置の模式図

## 3. 研究の方法

<THz 帯時間領域コヒーレントラマン分光法の原理>

開発した THz 帯のコヒーレントラマン分光

法の原理をコヒーレントラマン分光の一つであるコヒーレントアンチストークスラマン散乱 (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering, CARS) 分光を例として以下に説明する。

従来の CARS 分光では Pump 及び Stokes 光用に 2 台のレーザー (または光源) を使用しなければならず必然的に通常のラマン散乱分光よりも装置が大掛かりになるという欠点があった。さらに、サブ THz 帯 (<30cm<sup>-1</sup>) のスペクトルを得るためには励起レーザーの線幅を極力狭くし (<0.1cm<sup>-1</sup>) かつレーザ光の影響を高性能のノッチフィルターで除去する必要があり、高 SN 比のスペクトルを得るのはそれほど容易ではない。一方、以下に説明する周波数チャープしたフェムト秒レーザーを用いる手法ではこれらの問題の多くを解決することができる。

まず回折格子対などを用いてフェムト秒レーザーに線形な周波数チャープを加え、2 つに分離 (Pump1 及び Pump2 とする) したあと、適当な時間差 ( $\Delta\tau$ ) をつけて再び重ね合わせると、時間差 ( $\Delta\tau$ ) に応じた差周波数 ( $\delta\omega \sim$  数 THz) の光ビートを発生させることができる。この光ビートを試料に入射させると、差周波数  $\delta\omega$  だけ up-shift し、かつ周波数チャープした Coherent-Anti-Stokes 光を得ることができる (図 1 左)。この Coherent-Anti-Stokes 光は THz 帯では  $\delta\omega$  が小さく周波数軸上ではスペクトルが Pump1 及び Pump2 と重なるので分離することができない。しかし、逆分散を加えることで、周波数チャープのないフェムト秒パルスに変換し、時間領域で分離することができる (図 1 右)。時間領域で分離された CARS 光は Up-conversion などの手法で検出することが可能である。この手法ではフェムト秒レーザーは 1 台でよく、分光器やフィルターを必要としない。このようなフェムト秒レーザーの周波数チャープを制御して行うコヒーレントラマン分光装置の模式図を図 2 に示す。励起レーザーには発振波長約 800nm で 1kHz 繰り返しのフェムト秒レーザー増幅器を用いる。

以上は CARS 分光を例にとり説明したが本手法は他のコヒーレントラマン分光にもそのまま利用できる。すなわち、時間領域で CARS 光と反対側に表れる Coherent Stokes 光を検出することで、コヒーレントストークスラマン散乱 (Coherent Stokes Raman Scattering, CSRS) 分光を行うことができる。また、Pump1 の減衰を検出することで逆ラマン分光、Pump2 の増加を検出することで、誘導ラマン利得散乱 (Stimulated Raman Gain Scattering, SRGS) 分光を行うことができる。本手法は時間領域で THz 帯のコヒーレントラマン信号を検出することから、THz 帯時間領域コヒーレントラマン分光法 (THz Time-

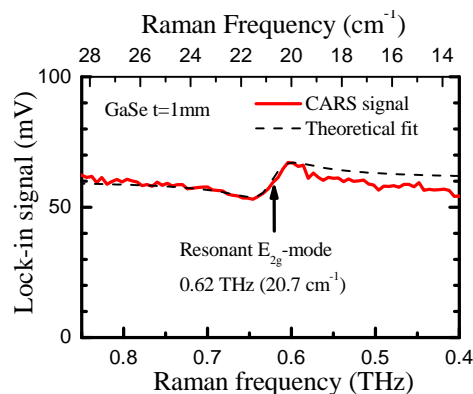


図 3. GaSe の THz 帯 CARS スペクトル

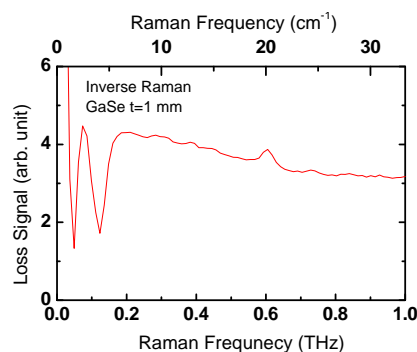


図 4. GaSe の THz 帯逆ラマンスペクトル

Domain Coherent Raman Spectroscopy, THz-TDCRS) と呼ぶことにする。

例として図 3 に GaSe の THz 帯 CARS スペクトルを示す。GaSe は III-VI 族の化合物半導体であり、結晶の対称性が低いことから、THz 帯に多くのラマン活性な光学フォノンバンドが存在し、THz 帯のラマン分光測定のための標準試料として適しているため、本研究における標準試料として用いている。図 3 の CARS スペクトルでは、非共鳴信号による一定のバックグラウンドの上に、0.6THz 付近に GaSe の光学フォノンモード ( $E_{2g}$  モード) に起因する分散型の共鳴ラマンバンドが観測されている。

また図 4 に GaSe の逆ラマンスペクトルを示す。逆ラマンスペクトルでは CARS スペクトルのように分散型ではなく、対称な共鳴ラマンバンドが 0.6THz 付近に観測されている。

しかし開発したフェムト秒チャープパルスを利用した THz 帯コヒーレントラマン分光法は非共鳴なコヒーレントラマン信号によるバックグラウンドおよびレーザーの強度ゆらぎ起因するノイズにより、その信号対雑音比は必ずしも高いとは言えなかった。したがって、水溶液中の生体分子の比較的弱いコヒーレントラマン散乱信号を精度良く測定するために、まず THz-TDCRS システムの

高精度化(検出感度の向上, 雑音および非共鳴信号の抑制)を行うことが, 必要になる。そこで, 信号対雑音比を上げるために, 以下の手法を試みた。

- (i) Pump レーザーの偏光制御による非共鳴信号の抑制
- (ii) 微分波形測定による非共鳴信号の抑制
- (iii) Pump レーザーパワーの最適化による信号の安定化

#### 4. 研究成果

<THz 帯時間領域コヒーレントラマン分光法の信号対雑音比の改善>

(i) Pump レーザーの偏光制御による非共鳴信号の抑制

CARS などコヒーレントラマン分光法において共通する問題であるが, 特定の振動モードに共鳴した共鳴信号(我々が得たい信号)は, 図3または図4のように常に非共鳴な信号とともに観測される。非共鳴な信号は分子の電子的な非線形応答に対応したもので, 周波数にほとんど依存せず, スペクトルのバックグラウンドとして観測される。また, 非共鳴信号は共鳴信号よりも大きいことが多い。したがって生体分子の振動モードによる共鳴信号を精度よく測定するためには非共鳴信号を抑制する必要がある。これには偏光 CARS (P-CARS) [4] と呼ばれる手法が有効である。P-CARS では Pump1 と Pump2 の偏光方向を制御して, 非共鳴信号と共鳴信号の偏光方向をずらしておいて, 偏光フィルターを用いて非共鳴成分を除去する。P-CARS と同様な手法をフェムト秒チャープパルスによる逆ラマン分光に適用(これを Polarized Inverse Raman, P-IRS と呼ぶことにする)して測定した GaSe の 0.4~1 THz におけるスペクトルを図5に示す。P-IRS では非共鳴信号が抑制された結果, 0.6 THz 付近の光学フォノンモード ( $E_{2g}$  モード) による共鳴信号が通常の IRS スペクトル(図4)の場合よりも明瞭に観測されている。

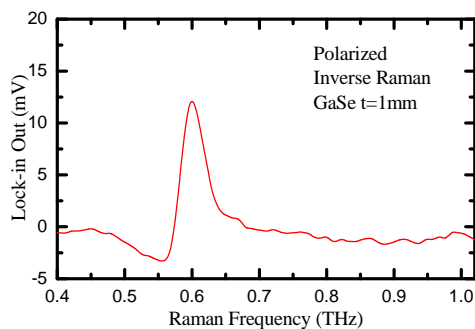


図5. GaSe の P-IRS スペクトル。0.6THz 付近の  $E_{2g}$  モードが観測されている。

(ii) 微分波形測定による非共鳴信号の抑制

共鳴信号は共鳴周波数付近で大きな変化を示すが, 非共鳴信号は周波数に対してほぼ一定であるので, 励起レーザーの差周波数(光ビート周波数)に変調を加えて共鳴信号の周波数微分成分をロックイン増幅器で検出することで共鳴信号をより高感度に検出することができる (THz-TDCRS では差周波数は Pump1 と Pump2 の相対遅延時間を変調することで THz-TDCRS のスペクトル微分波形を測定することができる)。

図4に Pump レーザーの光路に段差のあるガラス基板を挿入し, ガラス基板をシェーカー(電磁力で稼働部分を振動させる装置)で上下させ, 光路長を 100Hz で変調することにより測定した GaSe の逆ラマンスペクトルの微分波形を示す。ガラス基板の段差による時間遅延変調量は 0.23ps で, 対応するラマンシフト周波数は約 0.1THz である。微分波形では周波数 (Pump 光の相対時間遅延) に対してゆっくり変化する非共鳴な信号成分が抑制されていることが分かる。一方 GaSe の 4THz 付近の光学フォノンバンドに起因する共鳴信号は明瞭に観測されている。ただし, 共鳴信号の非共鳴信号に対するコントラストは改善されたものの, シェーカーの機械的な振動などのため雑音が増加し, 信号対雑音比はあまり改善がみられなかった。今後, 信号対雑音比を改善するためには振動対策を施し雑音を抑制する必要があることが分かった。

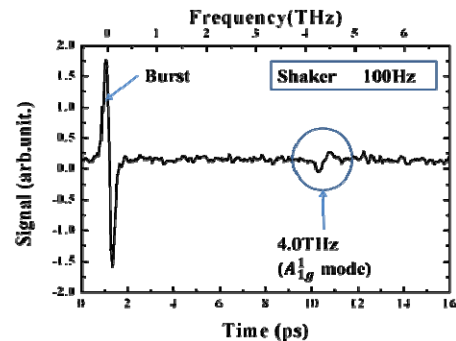


図6. GaSe の逆ラマンスペクトルの微分波形

(iii) Pump レーザーパワーの最適化による信号の安定化

コヒーレントラマン散乱は3次の非線形光学過程なので, 信号強度は Pump1 および Pump2 の総和強度の3乗に比例する。現在信号検出に用いている Up-conversion 法では検出信号は信号光強度と Probe 光強度の積に比例するので, 結果として, 検出信号はレーザー強度の4乗に比例することになる。したがってレーザー強度が揺らぐと, 検出信号強度はレーザー強度の4乗に比例して揺らぐ。現在主として用いている再生増幅器レーザーは繰り返し周波数が低い (~1kHz) ため, この強度揺らぎ



が十分平均化されず、コヒーレントラマン測定 of 信号対雑音比は信号強度そのものではなく、レーザー強度の揺らぎで制限されることになる。この高次の非線形過程が関与するコヒーレントラマン信号の安定化のためには、Pump レーザーのレーザーパワーを最適化することである程度抑制できることが分かった。

一方、THz-TDCRS の測定スペクトル帯域はフェムト秒レーザーのパルス幅の逆数（すなわちレーザーのスペクトル帯域）に比例する。これまで約 100fs のレーザーパルスを用いて測定を行ってきたが、よりパルス幅の狭いレーザーを使用して、測定スペクトルの広帯域化を行った。

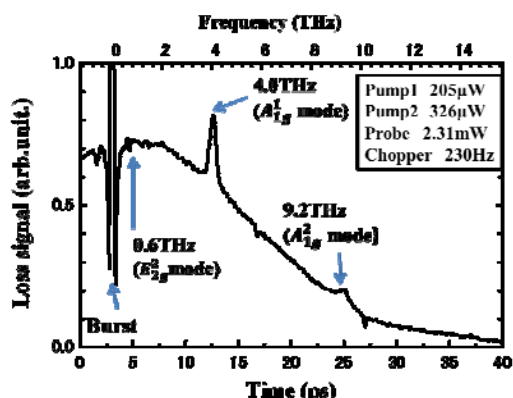


図 7. GaSe の広帯域逆ラマンスペクトル

図 7 にパルス幅 40fs 秒のレーザーパルス（繰り返し 1 kHz）を用い、Pump パワーを最適化した状態で測定した GaSe の広帯域逆ラマンスペクトルを示す。この測定では Pump1 および Pump2 のレーザーパワーをそれぞれ約 200µW, 320µW である。パルス幅が狭く、広帯域なスペクトルを持つレーザーで励起することにより、スペクトル測定帯域は約 15THz 以上が得られている。これまで観測されていなかった、9.2THz 付近の GaSe の光学フォノンモード ( $A_{1g}$  モード) に起因するラマンバンドが明瞭に観測されている。また、Pump パワーをやや抑制気味にすることで、信号の揺らぎが抑制され、信号対雑音比が改善している。

#### <溶液試料への THz-TDCRS の適用>

THz-TDCRS の信号対雑音比は P-IRS および Pump パワーの最適化で改善できることが分かったが、水溶液中の生体分子試料の測定のためには、GaSe のような固体試料ではなく、溶液試料の測定において十分な信号対雑音比を得ることが必要である。溶液試料の場合は固体結晶のようなシャープな（スペクトル幅が狭い）ラマンバンドではなく、液体分子のランダムな運動により一般にブロードなラマンバンドが観測される。バンドの拡がりの

ため、スペクトルのコントラストも小さくなる。したがって水溶液状態の生体分子の測定のためには、溶液試料のコヒーレントラマン信号を十分な信号対雑音比で得ることが必要である。そこで溶液試料としてヨードベンゼンを用いて測定を行った。ヨードベンゼンは約 5 THz と約 8.0THz にラマン活性な振動モードがある。図 8 にヨードベンゼンの逆ラマンスペクトルを示す。5THz 付近のラマンバンドは確認できないが、8THz 付近のラマンバンドは弱いながらも確認できる。

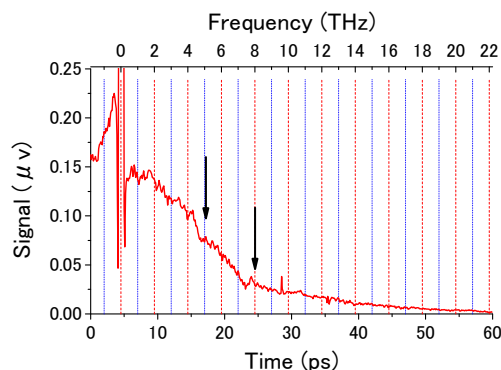


図 8. ヨードベンゼンの逆ラマンスペクトル

#### <生体分子の測定>

以上のように THz-TDCRS の信号対雑音比を改善し、有機溶媒のラマンスペクトルを確認することができた。そこでトリ卵白リゾチームなどの生体高分子のコヒーレントラマンスペクトルの測定を試みたが、残念ながら生体分子の振動モードに起因すると思われるラマンバンドを観測するに至っていない。水溶液状態での生体分子試料の測定では、水分子の非共鳴信号、および緩和モードによるコヒーレントラマン信号が大きなバックグラウンドを形成する。また生体分子の柔らかさに起因するさまざまなコンフォメーション（分子形態）のため不均一拡がり非常に大きい。このため、水溶液状態の生体高分子の振動モードに起因するコヒーレントラマンスペクトルはブロードで、かつバックグラウンドに埋もれてしまい検出が非常に困難になっていると推定される。したがって、タンパク質などの生体高分子の THz 帯コヒーレントラマンスペクトルの測定にはさらに信号対雑音比を改善する努力が必要と言える。

[4] Cheng, *et al.*, *Opt. Lett.* Vol. 26, pp.1341-1343 (2001).

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 3 件)

1. Masahiko Tani, Toshiyuki Koizumi, Hisashi Sumikura, Mariko Yamaguchi, Kohji Yamamoto, and Masanori Hangyo: “Time-Domain Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Signal Detection for Terahertz Vibrational Spectroscopy Using Chirped Femtosecond Pulses,” *Applied Physics Express*, Vol. 3, No. 7, 072401 (2010)  
DOI: 10.1143/APEX.3.072401
2. 谷 正彦・山本晃司・日比雅和・山口真理子: 「フェムト秒レーザーを励起光源に用いたテラヘルツ帯コヒーレント・ラマン分光手法の開発」, *光学* 第 40 巻 第 8 号, 特集号「極短パルスレーザーを用いた生体分光計測」, 解説, pp.402(16)-408(22) (2011 年 8 月)
3. 谷正彦: 「チャープ光パルスを利用したテラヘルツ帯のコヒーレントラマン分光」, 「分光研究」トピックス, Vol.60, No.5, pp.191-192 (2011 年 10 月)

[学会発表] (計 8 件)

1. Masahiko Tani: “Attempts for observation of low-frequency modes in biological macro-molecules by using terahertz vibrational spectroscopy,” (Invited) THz-Bio Workshop in Korea (March 9-10, 2010, Seoul National University).
2. 谷正彦: 「テラヘルツ帯振動分光で探る有機・生体分子のダイナミクス」(招待講演) N I C T 未来 I C T 研究所主催 ナノ・バイオ I C T シンポジウム ～バイオに学ぶ未来 I C T 型センシングテクノロジー～ (2012 年 2 月 15 日, 東京ビッグサイト)

[図書] (計 1 件)

1. Masahiko Tani, Masakazu Hibi, Kohji Yamamoto, Mariko Yamaguchi, Elmer S. Estacio, Christopher T. Que, and Masanori Hangyo: “Low-frequency Coherent Raman Spectroscopy Using Spectral-focusing of Chirped Laser Pulses,” *Vibrational Spectroscopy*, Chapter 7, pp.153-168 (ISBN 979-953-307-606-4, Edited by Dominique de Caro, published online in

February 2012 from InTech)

[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]  
ホームページ等

<http://fir.u-fukui.ac.jp/thzlab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 正彦 (TANI MASAHIKO)  
福井大学・遠赤外領域開発研究センター  
教授  
研究者番号: 0 0 3 4 6 1 8 1

(2) 研究分担者

山口 真理子 (YAMAGUCHI MARIKO)  
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学  
研究科・助教  
研究者番号: 5 0 5 2 1 7 3 8

山本 晃司 (YAMAMOTO KOHJI)  
福井大学・遠赤外領域開発研究センター・  
准教授  
研究者番号: 7 0 4 3 2 5 0 7

(3) 連携研究者

萩行 正憲 (HANGYO MASANORI)  
大阪大学・レーザーエネルギー学  
研究センター・教授  
研究者番号: 1 0 1 4 4 4 2 9