

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20503

研究課題名（和文）生体試料の分子結合を網羅計測する超解像ラマン・赤外分光技術の創出

研究課題名（英文）Super-resolution Raman and IR hybrid vibrational spectroscopy

研究代表者

加藤 遼（KATO, Ryo）

徳島大学・ポストLEDフォトンクス研究所・特任助教

研究者番号：90910513

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：生命機能は生体分子の化学構造変化により発現する。その発現機構を理解するには、化学構造を分子レベルで計測する必要がある。超解像ラマン分光法と赤外分光法は分子結合情報を計測できるが、分子内の全ての結合情報を把握するためには、その両方の分光法で得られる情報を分析する必要がある。本研究は、超解像ラマン分光法と超解像赤外分光法を両立する新奇な超解像ハイブリッド分光法の開発を行なった。赤外吸収に基づく分子特性の変化を可視光の光学応答で検出することで、赤外吸収情報を計測し、ラマン散乱と赤外吸収を同時に計測することに成功した。原理実証として、生体組織の測定を行い、相補的な分子物性情報の取得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ライフサイエンス分野では、これまで計測技術と計算科学の発展により、生体試料の基本的な化学構造が解明されてきた。本技術は、生命機能を統合的に理解するための次のステップである「その基本構造がどのように変化して機能を発現させるのか、分子内部の結合状態の相互作用が機能にどう影響するのか」を明らかにする基盤技術として位置づけられる。

研究成果の概要（英文）：Biological functions and phenomenon are triggered by chemical reactions or change of chemical structures of molecules in biological samples. Herein, we developed novel hybrid vibrational spectroscopies combining Raman spectroscopy and IR spectroscopy. We developed novel IR spectroscopic systems, in which IR absorption of molecules were probed by visible light, hence Raman scattering and IR absorption of molecules can be obtained simultaneously. We observed complementary vibrational information of biological tissues using our technique.

研究分野：振動分光法

キーワード：ラマン分光 赤外分光 チップ増強分光 光熱効果

1. 研究開始当初の背景

タンパク質などの生体分子は、化学反応を繰り返してその分子構造を局所的に変化させることで、生命機能を発現する。この発現機構を理解するためには、生体分子の化学構造変化を分子レベルで解析することが必要不可欠である。これまでに、X線結晶構造解析などにより、生体分子の基本構造は明らかになっているが、生命機能を発現する前後及び維持する間の段階的な分子構造の変化は明らかになっていない。化学結合情報を分子レベルでかつ、その場計測する技術として、プローブ顕微鏡と光の局在効果(局在共鳴プラズモン)を利用した超解像ラマン分光法と超解像赤外分光法がある[Kawata et al., Nature Photon., 2009 / Hillenbrand et al., Nature Mater., 2006]。これらの手法では、先鋭化した金属探針に光を照射し、先端に生じるナノサイズの局在光により励起されたラマン散乱、または赤外散乱信号を検出する。どちらの手法も試料の結合状態を一分子レベルで計測できるが、ラマン分光法と赤外分光法で計測できる分子結合は互いに異なり、相補的である。ゆえに、多種多様の化学結合を有する生体分子の化学構造変化を解析するには、ラマン分光法と赤外分光法でそれぞれ得られる分子結合情報を同時に計測する必要がある。しかし、その2つの分光法を両立する超解像分光技術は開発されていない。その理由は、ナノ局在光を効率よく生成する金属探針の条件(形状・金属種)が、可視域と赤外領域で異なるからである。つまり、波長領域の異なる高強度のナノ局在光を同じ金属探針によって生成できない。また、波長領域が異なる散乱信号を同時に取得するために、複雑な検出系を要することも複合化の弊害である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体試料の分子結合を網羅的に計測する新奇な超解像ハイブリッド分光技術を創出し、生命機能を制御する化学構造変化を解明することである。

3. 研究の方法

ラマン分光と赤外分光の相補的な振動分光計測技術を両立する新たな分光法の開発を行う。開発したマルチモーダル装置で生体試料、薄膜試料のマイクロ・ナノ物性を観察し、これまで観察できなかった物性情報を議論する。

4. 研究成果

まず、赤外光の信号取得を必要とせずに、赤外活性の分子結合の測定が可能である技術の開発を行ない、ラマン測定と赤外分光測定の両立を試みた。赤外吸収に基づく分子特性の変化を可視光の光学応答で検出することで、赤外吸収情報を計測した。具体的には、分子が赤外光を吸収した際の微小な温度上昇・体積膨張(光熱効果)を可視の散乱光により検出することで、赤外吸収情報を間接的に計測する。自作のラマン分光装置に赤外パルスレーザーの入射系と可視の散乱光の検出系を増設した。赤外光の照射時に、試料からのレイリー散乱光(可視光)をフォトディテクターで検出する。可視の入射光はナノラマン測定における励起光の役割も兼ねている。検出系ではフィルターによってラマン散乱光とレイリー散乱光を分割し、散乱光を赤外パルス光の周波数でロックイン検出、ラマン散乱光を分光器と CCD カメラで検出する。これにより、ラマン散乱と赤外吸収を同時に計測することに成功した。原理実証として、ポリマー薄膜のハイブリッド分光測定を行い、相分離現象に係る新たな知見を得ることに成功している。また、ベンゼン分子試料や、生体

試料の測定も行い、相補的な分子物性情報の取得に成功した。生体組織内の構成分子を高感度に赤外分光法にて高感度に検出した。ラマン分光法では、脂質物性を詳細に議論できるため、生体内の脂質・タンパク質物性を包括的に解析できている。今後は、新たな赤外量子カスケードレーザーを導入し、測定対象を拡張することを視野に入れている。現行の装置で観察可能な波長帯域は、 $1000\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ であり、アミノ酸や DNA、タンパク質の赤外吸収信号は計測できるが、カルボニル基や C-H 結合由来のモードの計測はできないため、脂質の議論や多糖類の同定は難しい。そこで、異なる波数を発振する赤外パルスレーザーを新たに導入し、観測帯域を拡張することで、様々な生体機能の解析に対応できるように計測基盤を整える。

その他にも、金属探針の新たな構造を設計したり、溶液中の測定に向けたポリマー保護膜の開発も並行して行なってきた。ポリマー保護膜の開発では、合成の簡便さを意識し、ワンポットで厚さ数ナノメートル程度の保護膜が均一に生成できる手法も確立した。その保護膜を利用し、増強分光も実証している。

相補的な分子結合情報は、これまで個別のシステムで独立に計測されていたため、同じ時間で、同じ局所領域における、分子結合情報を網羅的に計測することは困難であった。開発した技術は、分子内の多数の分子結合を一挙に解析し、その化学構造を分子レベルで特定することができる。本手法は、生体 1 分子の分子振動情報を一網打尽に分析し、機能を支配する化学構造変化を特定できる点で独創的であり、タンパク質機能の解明に資する光ナノ計測技術として位置づけられ、医療・創薬分野の発展に大きく貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kato Ryo, Yano Taka-aki, Tanaka Takuo	4. 巻 118
2. 論文標題 Multi-modal vibrational analysis of blend polymers using mid-infrared photothermal and Raman microscopies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vibrational Spectroscopy	6. 最初と最後の頁 103333 ~ 103333
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vibspec.2021.103333	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Ryo, Yano Taka-aki, Minamikawa Takeo, Tanaka Takuo	4. 巻 38
2. 論文標題 High-sensitivity hyperspectral vibrational imaging of heart tissues by mid-infrared photothermal microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1497 ~ 1503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s44211-022-00182-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Ryo, Yano Taka-aki, Tanaka Takuo	4. 巻 148
2. 論文標題 Single-cell infrared vibrational analysis by optical trapping mid-infrared photothermal microscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 1285 ~ 1290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D2AN01917E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Taka-aki Yano, Ryo Kato, Takuo Tanaka
2. 発表標題 Ultrasensitive plasmonic sensing of single biomolecular complexes
3. 学会等名 SPIE Optics+Photonics 2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo KATO, Taka-aki YANO, Takuo Tanaka
2. 発表標題 Visualizing Optical Fields of Dielectric-Based Metamaterials via Mid-Infrared Photothermal Imaging
3. 学会等名 Global Nanophotonics 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taka-aki Yano, Ryo Kato Takuo Tanaka
2. 発表標題 Active plasmon-enhanced Raman microscopy for nanoscale control of chemical reactions
3. 学会等名 SPIE Optics+Photonics 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹一憲太郎, 加藤遼, 伊田百美香, 井内智貴, 米倉和秀, 田中拓男, 保坂啓一, 矢野隆章
2. 発表標題 中赤外フォトサーマル顕微鏡の開発とバイオメディカル応用
3. 学会等名 2022年日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沖村 あかり, 加藤 遼, 矢野 隆章, 田中 拓男
2. 発表標題 ギャップモード探針増強ラマン分光法を用いた無機材料認識ペプチドの単一分子分光
3. 学会等名 2021年日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryo Kato, Toki Moriyama, Takayuki Umakoshi, Taka-aki Yano, Takuo Tanaka, Prabhat Verma
2. 発表標題 3D drift-corrected tip-enhanced Raman microscopy for long-duration nano-imaging of large-sized materials
3. 学会等名 TERS8 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Kato, Taka-aki Yano, Takuo Tanaka
2. 発表標題 Optical field mapping of nanostructures by means of vibrational spectroscopic techniques
3. 学会等名 SPIE Optics + Photonics 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------