

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 6月 8日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750008

研究課題名（和文） ラマン/ハイパーラマンハイブリッド顕微分光法の開発と溶媒環境の振動分光的計測

研究課題名（英文） Development of Raman/Hyper-Raman hybrid microspectroscopy and its application to vibrational analysis of solvent environment in the vicinity of solute

研究代表者

島田 林太郎 (SHIMADA RINTARO)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：70548940

研究成果の概要（和文）：顕微鏡下において試料中の単一の点から同時に発生するラマン散乱とハイパーラマン散乱を独立した2つの検出系で同時に計測できるラマン/ハイパーラマンハイブリッド顕微分光系を新たに制作した。溶液中の β -カロテンのハイパーラマンスペクトルに観測される溶媒由来の増強された信号から溶質分子近傍に存在する溶媒分子の距離、配向に関する情報を取得する方法を示し、新たな局所振動分光法の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：A microspectroscopic system which can simultaneously detect Raman and hyper-Raman signals from the same laser spot is developed. A possibility of new vibrational spectroscopy that enables us to extract the information of relative geometry of solvent molecules in the vicinity of solvent from the observed hyper-Raman signal of all-trans- β -carotene in solution is presented.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子分光学

科研費の分科・細目：基礎化学、物理化学

キーワード：溶液、顕微分光、ラマン分光、非線形ラマン分光、分子間相互作用、多極子相互作用

1. 研究開始当初の背景

(1)生細胞など複雑かつ不均質な系においては「溶媒効果」によって同じ分子が複数の異なる働きを示し得ることが知られている。このような溶媒の働きを分子レベルで理解するためには、標的分子近傍に存在する溶媒分子のみを他の溶媒分子と区別して観測することが必須である。しかしこのような要請を満たす手法はこれまで存在しなかった。

研究代表者らはそれまでに溶液中の β -カ

ロテンのハイパーラマン散乱における近傍溶媒分子のハイパーラマン散乱が 10^5 倍以上も増強される現象を発見しておりこれを「分子近接場効果」と呼ぶことを提案していた。この現象を応用することで溶質近傍の溶媒分子を選択的に観測する新たな振動分光手法を創出できると考えた。

(2)さらに研究代表者らはハイパーラマン過程を顕微分光法に応用し、顕微ハイパーラマ

ン分光装置をそれまでに開発していた。顕微ラマン分光法と顕微ハイパーラマン分光法を組み合わせることで、生細胞など不均一な試料中の標的分子の溶媒環境をマクロからミクロスケールまで同時に計測できる新たな振動分光法が可能であると考えた。

2. 研究の目的

ラマン散乱とハイパーラマン散乱を同時計測可能な装置を構築し、様々な分子環境で共鳴ハイパーラマン散乱の「分子近接場効果」を観測する。ラマン散乱で得られるマクロスコピックな溶媒の振動情報（溶媒-溶媒間の相互作用、溶媒構造など）、「分子近接場効果」によって得られるミクロスコピックな振動情報（溶質-溶媒間の相互作用、溶質近傍溶媒の分子構造）を同時に取得することで標的分子のおかれた溶媒環境とそれらの相互作用に関する情報を抽出、議論できるような理論の構築を研究の第一目的とした。

3. 研究の方法

(1) 【ラマン-ハイパーラマン-ハイブリッド顕微分光装置の製作】

ラマン散乱とハイパーラマン散乱との同時計測可能な顕微分光装置を開発する。信号損失の最も少ない光学配置の組み合わせや、対物レンズの種類等を検討する。

(2) 【モデル系での測定】

研究の方法(1)で製作した装置を用い、様々な分子環境で共鳴ハイパーラマン散乱の「分子近接場効果」を観測する。溶媒環境の違いによる近傍溶媒の分子構造変化や溶質-溶媒相互作用変化から「溶媒効果」の本質の解明を目指す。不均一系のモデル系として水中に分散させた自己会合閉鎖小胞（リポソーム）中に β -カロテンなどの標的分子を

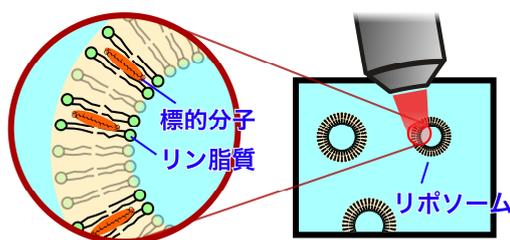


図1 リポソーム中に封入した標的分子近傍の分子環境観察の概念図

封入した系を用いる。

リポソームは1つの分子内に親水部と疎水部を持つ両親媒性のリン脂質が水中で自己会合し二重膜の閉鎖小胞を形成したものであり、生体膜のモデルとして用いられている。 β -カロテンなどの標的分子を二重膜中に封入し、標的分子近傍の分子環境を「分子近接

場効果」により観測する（図1）。

(3) 【分子環境の系統的な変更によるスペクトル変化の検出】

リポソーム構成分子や温度、標的分子濃度、水中のイオン濃度などをそれぞれ系統的に変更し、スペクトル変化を詳細に解析する。特に温度変化では膜の相転移を起こすことができるため、標的分子近傍の分子構造が劇的に変化すると考えられる。このような溶媒分子環境の変化は溶質-溶媒相互作用に大きな影響を及ぼすことが期待される。研究開始時点までの研究で、標的分子との分子間相互作用によって増強された近傍分子由来のバンドがピークシフトを示すことがわかっているが、どのような相互作用によるものかまだ解明されていない。分子間相互作用の大きな変化がピークシフトや信号強度（=増強の大きさ）にどのように影響を与えるか系統的に測定を行うことによって解析をさらに進める。

(4) 【モデルの構築】

研究の方法(1)-(3)により得られた結果を統一的に説明できる分子間相互作用モデルを構築する。

(5) 【生細胞、組織への応用】

植物細胞などカロテノイドが含まれていると知られている生細胞や生体組織に本手法の応用を試みる。

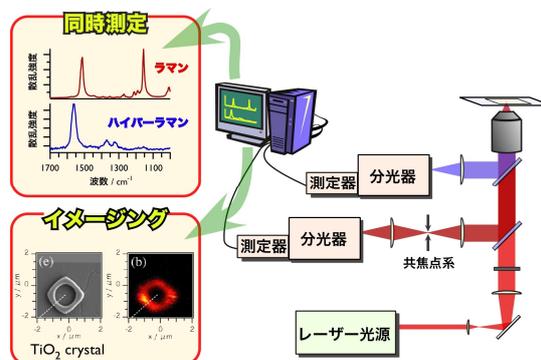


図2 ラマン-ハイパーラマン顕微分光装置の概念図。下部（後方散乱配置）にそれぞれハイパーラマン・ラマン検出部を有する。

4. 研究成果

(1) 【ラマン-ハイパーラマン-ハイブリッド顕微分光装置の製作】

顕微鏡下における試料中の単一の点に励起レーザー光線を集光し、焦点から同時に発生するラマン散乱とハイパーラマン散乱を独立した2つの検出系で同時に計測できるラマン/ハイパーラマンハイブリッド顕微

分光系を新たに制作した (図 2)。

ハイパーラマン散乱、ラマン散乱それぞれについて前方散乱および後方散乱配置を検討した結果、共に後方散乱配置の組み合わせの場合に信号損失が最少となり、高速にスペクトルを取得できると結論した。

(2) 【モデル系での測定】

研究成果(1)で製作した装置を用いてリポソームに封入した全トランス-β-カロテンの計測を行い、以下に挙げる2点について新たな知見を得ることができた。

(2)-①、リポソームに封入されたβ-カロテンは励起用近赤外レーザー光線の照射により、試料の変性が促進され、ハイパーラマンスペクトルの測定が困難となることが明らかとなった。さらに、この変性はリポソームを取り囲む水を窒素バブリングすることにより低減可能なことを明らかにした。水に溶解した酸素がβ-カロテンの変性に寄与していると考えられる。

(2)-②リポソーム中のβ-カロテンのハイパーラマンスペクトル中にはリポソーム構成分子であるリン脂質由来と考えられるバンドが増強されて観測され、リポソーム中においても「分子近接場効果」による増強効果が存在することを明らかにした (図 3)。

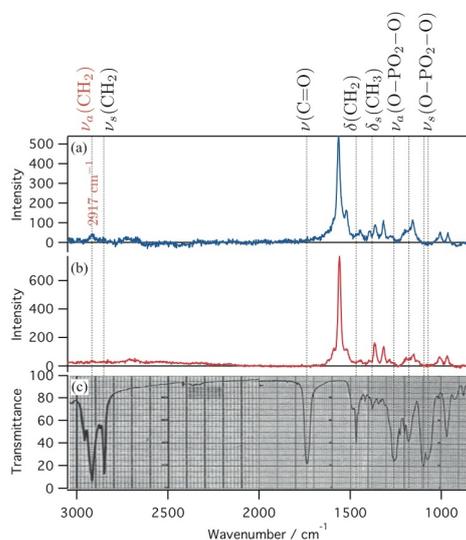


図 3 (a)DPPC リポソーム中のβ-カロテン、(b)固体β-カロテンのハイパーラマンスペクトル、及び(c)DPPC リポソームの赤外吸収スペクトル。赤外スペクトル及び書くバンドの帰属は[Mol. Biol. Biochem. Biophys., 31, 270 (1981)]より引用。

しかし、シクロヘキサンなどの有機溶媒を

用いた均一溶液中で観測される「分子近接場効果」に比べてリポソーム中では増強効果が小さく、赤外吸収強度と増強されたバンドの強度が対応しないなどの違いが見られた。均一溶液中に比べ、リポソーム中のβ-カロテン分子は近傍分子(リン脂質)に対して特定の配向をとりやすい傾向があると考えられるため、これらの違いは、β-カロテン分子と近傍分子の相対的な配向の違いに起因している可能性がある。

(3) 【分子環境の系統的な変更によるスペクトル変化の検出】

当初の予想と異なり、リポソーム中のβ-カロテンのハイパーラマンスペクトルにおいて観測された「分子近接場効果」の信号強度は小さく、詳細な解析が困難であった。このため、予定を変更し、通常溶媒と溶媒中の水素を全て重水素に置換した重溶媒を用い、溶液中のβ-カロテンのハイパーラマンスペクトルを観測した。得られた2種のスペクトルの差分を検出することにより、β-カロテンにより増強された近傍溶媒分子の分子振動を高感度に検出した (図 4 (a, b))。

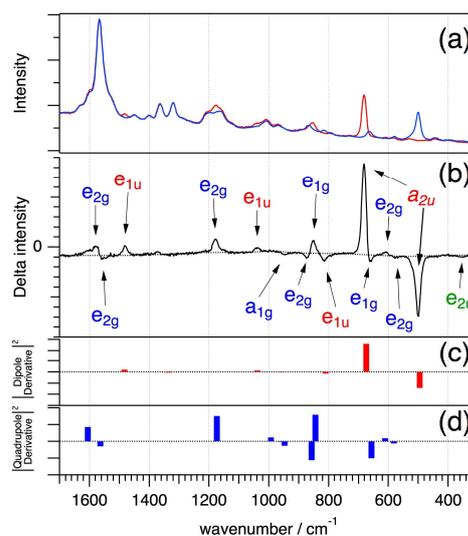


図 4 (a)全トランス-β-カロテン/ベンゼン溶液の共鳴ハイパーラマンスペクトル。溶媒はベンゼン(赤線)および重ベンゼン(青線) (b)差スペクトル。各バンドの対称種を図中に示す。赤字は赤外活性振動、青字はラマン活性振動、緑字は赤外・ラマン不活性ハイパーラマン活性振動を表す。(c) 双極子-双極子相互作用から予測される溶媒のハイパーラマン散乱の増強効果の大きさ。(d) 双極子-四重極子相互作用から予測される増強効果の大きさ。

検出された溶媒の信号を溶媒の赤外吸収、ラマン、およびハイパーラマンスペクトルと比較することにより、増強される溶媒の分子振動について以下に挙げる特徴を見いだした。

- (3)-①赤外活性振動は増強される。
- (3)-②非全対称ラマン活性振動も増強される。
- (3)-③全対称ラマン活性振動は増強されない(にくい)。
- (3)-④ハイパーラマンのみ活性な振動も増強されない(にくい)。

(4) 【モデルの構築】

上記の結果を説明するために、これまで提案していた共鳴ハイパーラマン散乱の理論をさらに拡張し、分子間の相互作用を多極子相互作用としてあらわに取り入れた理論を構築した。

(5) 【実験結果による理論の検証】

本理論により得られた表式を用いて、観測されたスペクトルパターンおよび強度を定量的に再現することに成功した(図4(c, d))。本理論により、赤外活性振動は溶質分子と溶媒分子の双極子-双極子相互作用により、また非全対称ラマン活性振動は双極子-四重極子相互作用により強度増大を得るものと判明した。多極子相互作用の大きさは分子間の距離や配向に依存するため、増強された溶媒の信号強度を定量的に評価することにより分子間の距離や配向に関する情報を引き出すことが可能であることを示した。

(6) 【生細胞への応用】

オオカナダモ (*Egeria Densa*) の葉緑素よりカロテノイドおよびクロロフィル由来と考えられるハイパーラマン信号を取得することに成功したが、信号ノイズ比が著しく悪いためその他の近傍分子由来と考えられる信号は検出できなかった。

(7) 【得られた成果のインパクトおよび今後の展望】

本研究は溶質-溶媒間に働く弱い多極子相互作用を実験的に検出、評価する新たな手法を提案するものである。また「分子近接場効果」による信号を定量的に評価するための理論を構築したことにより、今後、分子プローブを用い、標的分子のナノメートル近傍に存在する分子の振動情報 (=構造情報) と空間的情報を同時に取得する新たなナノメートル局所分析法の創出の可能性を示した。

本研究で開発したラマン/ハイパーラマンハイブリッド顕微分光装置を用いたマクロからミクロスケールまで同時に計測でき

る新たな振動分光法はすぐにでも可能であるが、十分なハイパーラマン強度の得られる試料系の選択が必要である。

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 島田 林太郎、ハイパーラマン分光法を用いた溶質-溶媒分子間相互作用の研究、分光研究、査読有、61巻、2012、35-43
- ② Korenobu Matsuzaki, Rintaro Shimada, Hiro-o Hamaguchi、Superresolution vibrational imaging by simultaneous detection of Raman and hyper-Raman scattering、Optics Letters、査読有、Vol. 36、2011、2545-2547
DOI: 10.1364/OL.36.002545
- ③ Rintaro Shimada, Hiro-o Hamaguchi、Solute-solvent intermolecular vibronic coupling as manifested by the molecular near-field effect in resonance hyper-Raman scattering、The Journal of Chemical Physics、査読有、Vol. 134、2011、034516-(1-9)
DOI: 10.1063/1.3512923

[学会発表] (計12件)

- ① 島田 林太郎、ハイパーラマン分子近接場効果によるナノメートル局所分析の可能性、分光学会ナノ分光部会シンポジウム、2011年12月16日、理研(和光)
- ② 島田 林太郎、Selection Rule of the Hyper-Raman Molecular Near-field Effect and Solute-Solvent Multipole Interactions、Asian Spectroscopy Conference、2011年11月30日、廈門(中国)
- ③ 島田 林太郎、ハイパーラマン分子近接場効果の選択律と溶質-溶媒間多極子相互作用、分子科学討論会、2011年9月23日、札幌コンベンションセンター(札幌)
- ④ Rintaro Shimada、Molecular Near-field Effect in Resonance Hyper-Raman Scattering: Excitation profile of all-trans- β -carotene in cyclohexane、International Conference on Raman Spectroscopy、2010年8月13日、ボストン(米国)
- ⑤ Rintaro Shimada、Solute-Solvent Intermolecular vibronic coupling observed by the Molecular Near-field Effect in Resonance Hyper-Raman Scattering、Advanced

Spectroscopy and Imaging in
Molecular Science、2010年7月12日、
新竹（台湾）

〔その他〕

ホームページ

[http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/users/s
truct/index_en.html](http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/users/s
truct/index_en.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 林太郎 (SHIMADA RINTARO)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：70548940

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし