

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24350010

研究課題名(和文) 高感度振動SFG分光による水溶液中の生体分子膜の研究

研究課題名(英文) Biological molecular layers in aqueous environments studied by high-sensitive vibrational SFG spectroscopy

研究代表者

石橋 孝章 (ISHIBASHI, Taka-aki)

筑波大学・数理物質系・教授

研究者番号：70232337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：水溶液中での生体分子膜の構造と機能の解明するための高感度振動和周波発生(SFG)分光法の要素技術の開発・検討と生体分子膜への応用研究を行った。開発・検討した要素技術は、(1)水晶薄膜を透過配置で使用した高感度ヘテロダイン検出振動SFG測定装置、(2)ナノ粒子増強振動SFG、(3)プリズム平行基板結合系による全反射配置振動SFG分光である。応用として、水上および基板上的脂質膜(L膜とLB膜)の構造の表面圧依存性、タンパク質水溶液表面のタンパク質および水分子の配向と構造についてヘテロダイン振動SFG分光によって研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Several techniques for high-sensitive vibrational sum-frequency generation (SFG) spectroscopy to investigate biological molecular layers in aqueous conditions have been developed or examined. The techniques include (1) high-sensitive heterodyne-detected vibrational SFG spectrometer with a very-thin quartz crystal as the local oscillator, (2) nano-particle enhanced vibrational SFG, and (3) prism-parallel substrate coupled systems for vibrational SFG at total reflection geometries. As applications, surface-pressure dependent structures of lipid layers on water and silica substrates (Langmuir and Langmuir-Blodgett monolayers) and molecular orientations and structures of proteins and water at surface of proteins aqueous solutions have been investigated.

研究分野：物理化学

キーワード：非線形分光 振動スペクトル 界面 生体分子 単分子膜

### 1. 研究開始当初の背景

振動和周波発生 (VSFG) 分光は、表面界面の振動分光である。VSFG 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。また、発光分光であるため検出感度が高く、良く配向し比較的強い信号を発生する系の場合、単分子層以下の密度の膜試料からも構造情報が豊富な振動スペクトルが得られる。このような VSFG 分光の特徴は、生体分子膜のモデル系や生体分子センサーの研究に特に適している。例えば、生体分子センサーではその分子認識がセンサー機能の要であるが、VSFG 分光の界面選択性を利用すれば、センサーに認識される被検出分子が溶液層にランダムな方向をもって分散している場合は VSFG 不活性であるが、センサー分子と結合して配向すると VSFG 活性となる。つまり、配向した分子のみを選択的に検出することができるのである。このように、VSFG 分光法は、生体分子センサーや生体膜のモデルを分子レベルで探求するのに適した有用な手法である。

我々はこれまで、VSFG 分光をより高感度化し、そこからできるだけ多くの情報を引き出せるように発展させることを目指し、手法開発のレベルからその応用まで総合的な研究を展開してきた。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、マルチチャンネル化と電子共鳴効果によって SFG スペクトルの測定時間を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。(電子共鳴条件下で VSFG は、電子共鳴増強効果のために信号強度が増大する。このような SFG を振動電子二重共鳴 SFG、DR-SFG と呼ばれる) 紫外領域への拡張の結果、核酸塩基や芳香族アミノ酸類などの重要な生体分子を、DR-SFG 分光の対象とすることができた。さらに、円偏光二色性の測定が困難な極薄膜試料からも電子共鳴条件下の VSFG の偏光測定を利用することでキラリティ情報が得られることも明らかにしてきた。以上のような状況をふまえ、水溶液中に存在する分子膜の VSFG スペクトルを高感度に測定する手法を開発し、生体分子センサーや生体膜のモデルなどの重要な系へと応用することを計画した。

### 2. 研究の目的

水溶液中での生体分子膜の構造と機能の解明するための、高感度振動和周波発生 (VSFG) 分光法を開発する。そのために、独自に開発したシリカ蒸着 CaF<sub>2</sub> 基板上に形成したシランカップリング膜を利用することで、これまで困難であった水溶液中での VSFG スペクトルの測定を実現し、また生体

分子センサーの使用条件や生理的条件下に低い低密度な試料に対応できるように、VSFG 分光法の高感度化を行う。高感度化の手法として、電子共鳴増強効果の利用、全反射配置 VSFG、検出のヘテロダイン化などに加えて、これまで例のないナノ粒子増強 VSFG にも挑戦する。開発した高感度 VSFG 分光技術を用いて、水と共存した状態における生体分子膜 (シランカップリング膜、LB 膜、L 膜等) の構造や配向を研究する。

### 3. 研究の方法

研究期間の前半は、VSFG 分光の高感度化技術の開発に主に取り組んだ。その際、試料としてシランカップリング法で芳香族低分子 (アミノ酸類や核酸塩基などの生体分子) を固定した分子膜の作製や利用の方法も研究対象とした。開発実装した技術は、(1)SFG 分光装置のヘテロダイン化、(2)シリカ蒸着 CaF<sub>2</sub> プリズムを使った全反射配置 SFG、(3)ナノ粒子増強 SFG、である。研究期間の後半に於いて、水共存条件下における脂質膜や高次構造 (ヘリックス、シートなど) をとり得るポリペプチドやタンパク質膜の VSFG 分光による構造の研究を行った。

### 4. 研究成果

#### [SFG 分光装置のヘテロダイン化]

**装置概要** (図 1) 製作したヘテロダイン (HD) 検出-振動 SFG 装置では、まず薄板水晶 (y-cut、厚さ 10 μm) に広帯域赤外光と狭帯域可視光を集光し、水晶からの広帯域 SFG 光を透過方向に発生させ、これを局所発振器 L0 光とする。続いて、薄板水晶を透過した赤外光と可視光を共通の凹面鏡で試料界面へ再集光し、試料からの広帯域 SFG 光を発生させる。このようにして同軸上に発生させた試料および薄板水晶からの SFG 光は、分光器で分散され CCD 検出器で検出される。このとき L0 光のみは溶融シリカ板 (厚さ 1.5 mm) を透過させることで、L0 光と試料からの SFG 光との間で約 2.5 ps の時間差をつけて干渉させ、波数軸上に干渉縞を発生させる。このスペクトル上の干渉成分のみをフーリエ変換を利用して抽出し、複素スペクトルを得る。試料部分に z-cut 水晶を設置して同様の測定を行うことで得た複素スペクトルを、位相と広帯域赤外光の強度の基準とし、最終的に試料の複素非線形感受率  $\chi^{(2)}$  スペクトルに変換する。

**試験測定結果** 製作した装置を用い OTS (octadecyltrichlorosilane) 膜の CH 伸縮領域を測定した。偏光条件は ssp (SFG 光と可視光

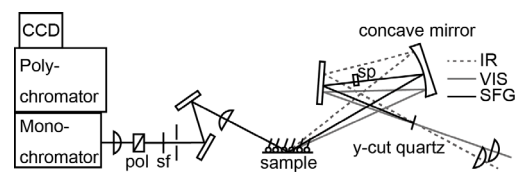


図 1. ヘテロダイン検出 VSFG 装置の試料部分

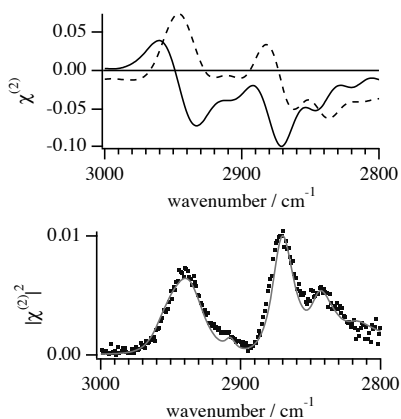


図 2. OTS 膜の二次非線形感受率スペクトル。上図 (点線：実部 実線：虚部)、下図 OTS 膜のホモダインスペクトル (点：実測、実線：実部と虚部から計算)

が s 偏光、赤外光が p 偏光)、可視波長は 630 nm である。図 2 に OTS 膜を HD 検出して得た  $\chi^{(2)}$  スペクトルおよびホモダイン検出して得た SFG 強度スペクトルを示す。強度スペクトル (図 2 下) では  $2940\text{ cm}^{-1}$  のピークは 1 つのバンドに見えるが、 $\chi^{(2)}$  の虚部スペクトル (図 2 上) から異なる符号の  $\chi^{(2)}$  を有する 2 つの振動バンドの重ね合わせであることがわかり、ヘテロダイン検出の優位性が示されている。また、 $\chi^{(2)}$  の絶対値 2 乗を計算して得たスペクトルは、ホモダイン検出した実測の SFG 強度スペクトルとよく一致しており (図 2 下)、製作した装置の高い測定精度が確認された。

**開発した装置の特徴** 局所発振器として y-cut 水晶を透過配置で使用した結果、L0 光強度を広い範囲で自由に変化させることができる。このため目的試料の SFG 信号に応じた最適な L0 光の選択が可能で高感度な分光装置を構築することができた。また対称中心を持たない水晶の体積部分から発生する L0 光は、アキラルな一軸性界面で許容でない偏光の組み合わせの SFG 信号も発生できる。このためバルクやキラルな系からのキヘテロダイン検出キラル SFG 分光への発展させる道筋をつけることができた。

#### [ナノ粒子増強 VSF の検討]

局在プラズモンの効果を利用したナノ粒子増強振動 SFG (以下 VSF) に関して、金上の有機自己組織化膜に金ナノ粒子層を重ねた試料系に関して振動 SFG 信号の増強度を定量的に検討した。試料の反射モードでの紫外可視消失スペクトル、VSF スペクトルおよび自発ラマンスペクトルの可視プローブ波長依存性を詳しく検討した結果、VSF および自発ラマン信号の増強度は、おおよそ VSF 信号波長とラマン励起レーザーの波長が試料の消失スペクトルのピークと一致すると大きくなり、信号増強はプラズモン共鳴の結果であることが示された。一方、自発ラマンの場合の増強度は最大で 10 の 4 乗程度の大きな値であるのに対して、VSF の場合は高々 5 程度であり、増強度に著しい差が見られた。

この違いは、ナノ粒子の大きさや粒子と分子の相対位置関係の不均一性が分極の位相のばらつきにつながり、コヒーレント分光である VSF の強度の低下を招いているためであると解釈した。

#### [シランカップリング単分子膜のプリズム平行基板結合系による全反射配置振動 SFG スペクトル測定の検討]

固体/液体界面に可視プローブレーザーを臨界角近くの角度で入射すると界面からの SFG 信号が増大し、高感度測定が実現する。(全反射配置振動 SFG) 一方、配向方向が定まった単分子膜を比較的容易に作る事ができるシランカップリング単分子膜の水溶液界面この全反射配置 SFG 分光を適用する為には、高価なプリズム表面に繰り返しシランカップリング単分子膜を形成する必要がある。試料作製のコストを削減するために、より安価な平面基板上に形成した単分子膜とプリズムを光学的に接触させたプリズム平行基板結合系 (図 3 上) による全反射配置振動 SFG スペクトル測定について検討した。

測定条件は可視プローブ波長が 530 nm、赤外プローブの中心波長が 3400 nm、空気中での可視プローブ入射角が 68.5-70.0 度、赤外プローブ入射角が 60 度である。測定試料にはシランカップリング法を用いて  $\text{SiO}_2$  基板 (厚さ 1.5 mm) 上に作製した OTS 単分子膜を使用し、OTS/水界面の振動 SFG 測定を行った。光学的接触は  $\text{SiO}_2$  基板と  $\text{CaF}_2$  半円筒プリズムを重ね合わせ、隙間に  $\text{CCl}_4$  を挟むことで実現した。実験は SSP 偏光条件で行い、CH 伸縮振動バンドの強度を比較した (実験 1)。増強度の基準として、非全反射条件となるプリズムを使用せず平行基板の背面からプローブ光を照射した場合 (図 3 下) の強度を使用した。また、プリズム平行基板結合系に関しては、SFG 光強度の試料面への入射角依存性も測定した。

その結果、可視プローブ光の入射角を 69.5

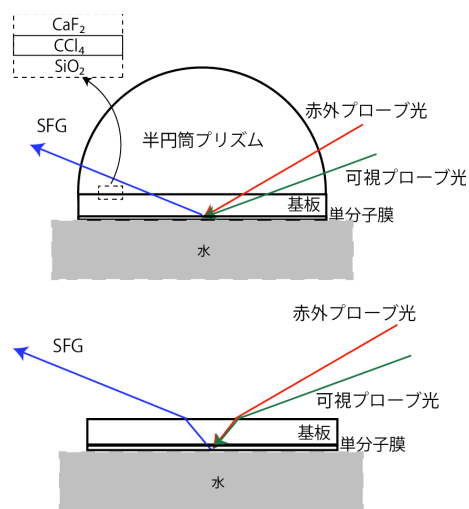


図 3. プリズム平行基板結合系 (上図) および参照系 (下図)。

度にしたとき約 130 倍の最大の増強度が得られた。本検討によってプリズム平行基板結合系は、通常の平行基板に形成したシランカップリング単分子膜を使用して、膜/水溶液界面の振動 SFG スペクトルを全反射条件下で高感度に測定できる有用な手法であることが示された。

[飽和脂肪酸および脂質分子の水上単分子膜の VSFG 分光]

ヘテロダイン検出 VSFG に関して、水上単分子膜 (L 膜) の測定をおこなった。特に、ステアリン酸や基本的な脂質である DPPC に関して、L 膜のスペクトルの表面圧依存性を詳細に検討した。また L 膜を基板に移し取った LB 膜についても測定を行い、L 膜の結果と比較した。(図 4) 分子面密度を補正し分子当たり感受率としたスペクトルは、表面圧の上昇にともない  $\text{CH}_2$  伸縮振動のピーク強度が減少し、 $\text{CH}_3$  伸縮振動のピーク強度が増加した。前者はゴーシュ形を多く含む構造から全トランス形へとアルキル鎖がコンフォメーション変化を、後者は配向性が向上を示している。LB 膜のスペクトルは L 膜と定性的には対応しているが、定量的に評価すると LE 相の L 膜より、対応する LB 膜が高い配向性を持ち、基板上で配向変化を起こしていることがわかった。

[タンパク質水溶液表面の VSFG スペクトル]

多くのタンパク質は両親媒性を持ち、気水界面や生体二分子膜界面に集積する傾向を持っている。このような水溶液表面にタンパク質が作る自発的に作る分子膜に、我々が開発した高感度なヘテロダイン振動 SFG 分光法を適用した。溶液中での構造が既知のポリペプチドやタンパク質について測定データを蓄積し、二次構造と振動 SFG スペクトルの相関関係をスペクトルの位相 (符合情報) を含めて検討した。測定は溶液中の構造の研究が進んでいる牛血清アルブミン、ペプシン、コンカナバリン A の 3 種類のタンパク質についておこない、タンパク質の  $\text{CH}$  伸縮振動およびアミド I 振動、水の  $\text{OH}$  伸縮振動に関して

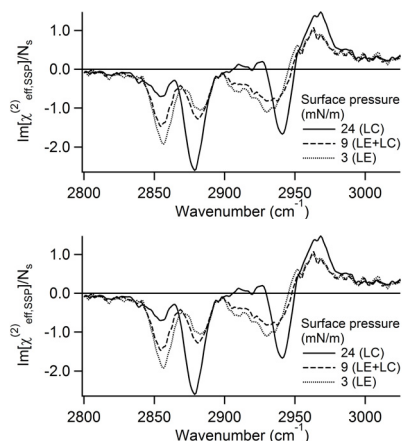


図 4. DPPC の (a) L 膜と (b) LB 膜の分子当たりの  $\text{Im}[\chi^{(2)}]$  スペクトル (偏光配置 SSP)。縦軸の単位は  $10^{-16} \text{ m}^4 \text{ V}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ 。

良好なスペクトルが測定した。測定された複素感受率スペクトルを図 5 に示す。

測定されたスペクトルから主に次のようなことがわかった。(1) メチル基は平均的には水素原子を空気側に向けて配向している。これは空気/水界面においてタンパク質の一部が疎水性のメチル基を空気側にむけるようにコンフォメーションを変化させていることを示唆している。(2) タンパク質の周りの配向した水分子は、水素原子を空気側に向けている。このことから、配向した水分子は負に帯電したタンパク質の下側 (水溶液側) に存在する分子であると考えられる。(測定したタンパク質の等電点は 7 より小さく、測定はリン酸緩衝液中 pH 7 の条件で測定した。) (3) 観測されたアミド結合は、カルボニル基の酸素原子を下側 (水溶液側) に向けている。この配向方向は、これらのアミド結合部位が配向した水分子との水素結合を形成していることを示唆している。(4) 測定したタンパク質の溶液中の二次構造の量の分布が大きく異なるにもかかわらず、アミド I モードの振動数に大きな違いが見られなかった。

(1)~(3) から、界面付近の試料の構造として、タンパク質は空気側に空気-メチル基を空気側に突き出し、水溶液側ではタンパク質がアミド結合のカルボニル酸素を下側に突き出し、そのカルボニル基が水素分子を上側に向けた水分子と水素結合しているというモデルをたてることができる。

通常、アミド I モードの振動数は、二次構造に依存して変化する。今回、測定したタンパク質の二次構造の主成分は、牛血清アルブミンでは  $\alpha$  ヘリックス、ペプシンとコンカナバリン A では  $\beta$  シートである。しかし (4) で示したように、3 つのタンパク質のアミド I モードの振動数の違いは小さく、振動数が溶液中の二次構造の分布を反映していない。これは、空気/水界面に自発的に形成される膜中のタンパク質が、溶液中の構造と異なってい

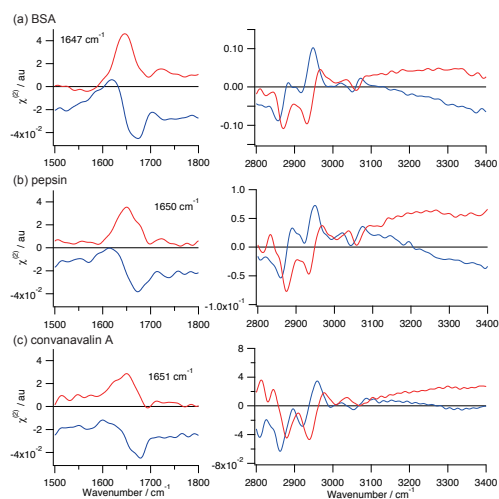


図 5. 空気/タンパク質水溶液界面のヘテロダイン VSFG スペクトル (赤: 虚部、青: 実部)

るからだと考えられる。この構造変化がタンパク質の全体に及ぶような変化であるかもしれないが、二次構造の分布はほぼ保存しているが、構造の一部が変化してその部分だけが（アキラル）振動 SFG 分光で観測されているという状況も考えられる。この点を明らかにするためには、より多くのタンパク質について、今回行ったアキラル VSFG 分光に加え、二次構造に関して鋭敏であると言われているキラル VSFG の測定を併せて進めることが有効であると予想される。現在、この方向にそった研究を進めている。

#### 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 6 件）

①“Salt-induced water orientation at a surface of non-ionic surfactant in relation to a mechanism of Hofmeister effect”, Mafumi Hishida, Yohei Kaneko, Masanari Okuno, Yasuhisa Yamamura, Taka-aki Ishibashi, and Kazuya Saito, *Journal of Chemical Physics*, 142, 171101 (2015).  
DOI: 10.1063/1.4919664

②“Heterodyne-detected Achiral and Chiral Vibrational Sum Frequency Generation of Proteins at Air/Water Interface”, Masanari Okuno and Taka-aki Ishibashi\*, *Journal of Physical Chemistry C*, 119, 9947 (2015).  
DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b01937

③“Chirality Discriminated by Heterodyne-detected Vibrational Sum Frequency Generation”, Masanari Okuno and Taka-aki Ishibashi\*, *Journal of Physical Chemistry Letters*, 5, 2874-2878 (2014).  
DOI: 10.1021/jz501158r

④“Time-resolved IR Spectroscopy of 1,3-Dicyanophenylcyclopentane-1,3-diyl Diradicals: CN Stretching Wavenumber as a Vibrational Signature of Radical Character”, Akihiro Maeda, Takehide Oshita, Manabu Abe\*, Taka-aki Ishibashi\*, *Journal of Physical Chemistry B*, 118, 3991-3997 (2014).  
DOI: 10.1021/jp500636j

⑤“Stabilization and Modification of Gold Nanocube Surfaces with Layered Silicate”, Miharuru Eguchi, Masae Ito, and Taka-aki Ishibashi, *Chemistry Letters*, 43, 140-142 (2014).  
DOI:10.1246/cl.130922

⑥“Time-resolved IR observation of a photocatalytic reaction of pivalic acid on platinumized titanium dioxide”, Akihiro Maeda and Taka-aki Ishibashi\*, *Chemical Physics*, 419,

167-171 (2013).

DOI: 10.1016/j.chemphys.2013.02.001

〔学会発表〕（計 13 件）

①江口美陽・石橋孝章、色素修飾された金属ナノ粒子の光学特性、2014 年光化学討論会、2014/10/13、北海道札幌市（北海道大学）。

②立野雄也・奥野将成・石橋孝章、シリカ基板上色素単分子膜-水溶液界面の振動電子二重共鳴和周波発生、分子科学討論会、2014/09/24、広島県東広島市（広島大学）。

③深谷和玄・奥野将成・勝本之晶・力山和晃・石橋孝章、立体規則性の異なる PNiPAm 薄膜のヘテロダイン検出振動和周波発生分光、分子科学討論会、2014/09/24、広島県東広島市（広島大学）。

④奥野将成・石橋孝章、ヘテロダイン検出キラル振動和周波発生分光法、分子科学討論会、2014/09/21、広島県東広島市（広島大学）。

⑤奥野将成・石橋孝章、ヘテロダイン検出振動和周波発生による分子キラリティー決定（招待講演）、第 6 回 SFG 研究会、2014/08/03、茨城県つくば市（筑波大学）。

⑥奥野将成・時本泰地・江口美陽・石橋孝章、アップモードプラズモン共鳴による振動和周波光増強の検討、平成 26 年度日本分光学会年次講演会、2014/05/28、埼玉県和光市（理研）。

⑦石橋孝章、振動電子二重共鳴和周波分光（招待講演）、2013 年真空・表面学術合同講演会：第 33 回表面科学学術講演会・第 54 回真空に関する連合講演会 2013 Vacuum/Surface Science joint meeting、2013/11/26、茨城県つくば市（つくば国際会議場）。

⑧背山信・三島愛・安倍学・石橋孝章、カルボニル基を持つシクロペンタン-1,3-ジイル型一重項ビラジカル種の振動解析、分子科学討論会、2013/09/24、京都府京都市（京都テルサ）。

⑨Taka-aki Ishibashi, A New Chiral Vibrational SFG Detection Scheme with a Variable Retarder, Seventh International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS-7), 2013/08/27, Hyogo, Kobe (Kobe Convention Center).

⑩ Taka-aki Ishibashi, Akihiro Maeda, Takahide Oshita, and Manabu Abe, Time-resolved IR spectroscopy of cyclopentane-1,3-diyl biradicals, XVIth International Conference on Time-Resolved

Vibrational Spectroscopy (TRVS 2013),  
2013/05/23, Oita, Hayami-gun (Beppuwan  
Royal Hotel).

⑩石橋孝章、振動 SFG 分光による有機物界面の研究—埋もれた界面観測の試み (招待講演)、第 1 回分光イノベーションシンポジウム、2012/11/30、東京都目黒区 (東京工業大学).

⑪石橋孝章・三好和哉、液晶可変位相板を用いたキラル振動和周波分光、分子科学討論会、2012/09/18、東京都文京区 (東京大学).

⑫背山信・三島愛・前田晃宏・安倍学・石橋孝章、カルボニル基を持つシクロペンタン-1、3-ジイル型一重項ビラジカル種の時間分解赤外分光、分子科学討論会、2012/09/18、東京都文京区 (東京大学).

[その他]

ホームページ

<http://www.chem.tsukuba.ac.jp/ishibashi/researches.html#VSFG>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石橋 孝章 (ISHIBASHI, Taka-aki)

筑波大学・数理物質系・教授

研究者番号 : 70232337