

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：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24655006

研究課題名(和文)水溶液中において生体分子の赤外吸収スペクトルを測定する試み

研究課題名(英文)Trial to measure IR absorption spectrum of the biomolecule in the water

研究代表者

酒井 誠 (Sakai, Makoto)

東京工業大学・資源化学研究所・准教授

研究者番号：60298172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：水は極めて強い赤外吸収を有するため、通常の赤外分光測定で希薄な水溶液中の溶質分子の赤外吸収を得ることは不可能である。本研究課題において、赤外超解像顕微鏡法の高感度かつ高空間分解能の特性を利用して、水溶液中におけるローダミン6G色素の測定を行ったところ、観察赤外波長が1600 cm⁻¹において非常に強い過渡蛍光信号の観測に成功した。また、この過渡蛍光信号を観察しながら、空間分解能を極限(800 nm)まで最適化したところ、1100-1800 cm⁻¹の領域においてローダミン6G色素の赤外スペクトル測定にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Water intensely absorbs IR light. Therefore, IR light can penetrate only up to a few tens of micrometers and it is impossible to observe the IR absorption spectrum of solute molecules in the water by traditional IR spectroscopy. In this project, we applied a new detection system based on the TFD-IR microscopic technique. In this case, the visible and IR lasers are focused by an objective reflection lens and the transient fluorescence from the solute molecule in the water is collected by the same objective. Only the transient fluorescence near the focal point of the objective is observed, and we can monitor the IR absorption process of solute molecules located near the surface where a sufficient amount of IR light can penetrate even in the strongly IR absorbing solution. Using this system, we succeeded in monitoring TFD-IR signal of rhodamine 6G molecules in the water, and observing the TFD-IR spectrum that is corresponding to IR absorption spectrum in the 1100-1800 cm⁻¹ region.

研究分野：物理化学

キーワード：水溶液 赤外分光 生体分子 超解像 ローダミン6G

1. 研究開始当初の背景

周知の通り、水は極めて強い赤外吸収を有する。この影響により、水溶液中では、OH伸縮振動領域において赤外光はほとんど透過しない。例えば、厚さ 10 μm の特殊な溶液セルを使った場合の透過率は、OH伸縮振動バンドから遠く離れた 2632 cm^{-1} では赤外光はほとんど透過するが、バンドの裾である 3030 cm^{-1} になると赤外光の透過率は 0.43、 3226 cm^{-1} では 0.013 まで減少し、バンドのピークである 3400 cm^{-1} 付近では赤外光は全く透過しない(図 1)。

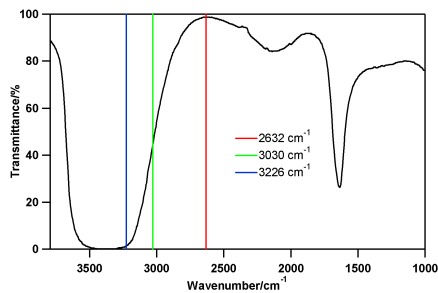


図 1. 10 μm 厚の水の赤外透過スペクトル

このような条件下では通常の赤外分光測定で希薄な水溶液中の溶質分子の赤外吸収を得ることは不可能である。これに対し、赤外超解像顕微鏡法を用いた場合は、その高い空間分解能から、試料セル表面のごく近傍 (< 5 μm) の領域に赤外光を集光し、さらに可視光を入射することで生じる過渡蛍光のみを集めることが可能となる。これにより、溶媒である水の強い赤外吸収に妨害される前に信号を抽出できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

以上の背景の中、本研究課題である「水溶液中において生体分子の赤外吸収スペクトルを測定する試み」を立案した。即ち、水の振動共鳴条件下における過渡蛍光(赤外情報に相当)の検出、さらには赤外光を波長掃引することによる赤外吸収スペクトル測定の実現を目指す試みである。具体的には、水溶液中において溶質分子の赤外スペクトルに相当するものを、過渡蛍光検出赤外分光法をもちいて実現しようというものである。蛍光性試料として知られているローダミン 6 G 色素の水溶液中における過渡蛍光検出赤外スペクトル、さらには、蛍光性生体分子として知られるフラビンの水溶液中における過渡蛍光赤外スペクトル測定を行い、分子構造に関する議論を行う事が目標である。

3. 研究の方法

研究代表者らの開発した過渡蛍光検出赤外超解像顕微鏡法は、電子励起された S_1 状態からの蛍光を観測する通常のレーザー蛍光顕微鏡の長所を全く損なうことなく、赤外に対して超解像を実現したものであり、通常のレーザー蛍光顕微鏡と長所や利点は全く同じである。従って、本研究の「水溶液中において生体分子の赤外吸収スペクトルを測定する試み」を達成する手順としては、(1) 共焦点型赤外超解像顕微鏡の構築、(2) 試料セル表面のごく近傍 (< 5 μm) の領域に光を集光し、そこからの信号のみを検出、(3) 溶媒の振動共鳴条件下において、溶媒の赤外吸収に妨害される前の信号を抽出する、(4) 赤外光を波長掃引することにより赤外吸収スペクトル測定の実現を目指した。具体的な光学系レイアウトを図 2 に示す。

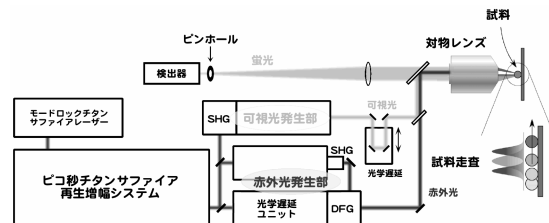


図 2. 共焦点型ピコ秒赤外超解像顕微鏡

4. 研究成果

平成 24 年度は、共焦点型ピコ秒赤外超解像顕微鏡の構築を行った。基本となるのは赤外超解像顕微鏡法であり、ピコ秒赤外光及び可視光を同軸・同方向からレーザー蛍光顕微鏡光学系に導入し、対物レンズを通して試料セルの表面近傍に集光した。対物レンズは中赤外波長領域の透過率を確保するために反射対物レンズを用いた。試料から生じる過渡蛍光は同じ対物レンズで集めて、共焦点光学系のピンホールを通した後に光電子増倍管で検出した。試料位置は 3 次元で走査され、蛍光強度を位置の関数として記録し、3 次元断層像を得ることが可能な装置とした。構築した共焦点型ピコ秒赤外超解像顕微鏡を用いて、水の振動共鳴条件下(3 μm 帯)におけるローダミン 6 G 分子の過渡蛍光(赤外情報に相当)の検出を試みたところ、過渡蛍光の検出に成功した。この装置の深さ方向の空間分解能は、およそ 2 μm 程度であり、セル表面ごく近傍のみの領域のみを赤外超解像顕微鏡観察することで、水の振動共鳴条件下においても溶質分子の赤外情報の抽出が可能であることが明らかになった。

平成25年度以降は、平成24年度までに構築した共焦点型ピコ秒赤外超解像顕微鏡を用いて、(1)赤外波長領域を生体分子の構造解析にかかせない6-9マイクロメートルの中赤外領域まで拡張する、(2)赤外スペクトルを測定する、ことに注力した。過渡蛍光検出赤外分光法は赤外波長が溶質分子の振動に共鳴した時のみ過渡蛍光が観測されるので、赤外光の波長を掃引することで赤外スペクトル測定が原理上可能である。試料にローダミン6G色素を用いて実験を行ったところ、赤外波長が 1600 cm^{-1} において非常に強い過渡蛍光信号を観測した。また、この過渡蛍光信号を観察しながら、空間分解能を極限(800 nm)まで最適化したところ、 $1100\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ の領域においてローダミン6G色素の赤外スペクトル測定にも成功した。これらの結果は、(1)赤外波長を中赤外領域まで拡張しても空間分解能の低下が起こらない、(2)中赤外領域の方が水の赤外吸収が弱いので妨害を受けにくい、ことが利点として作用したと考えている。この手法を生体分子に適用することで、これまで観察不可能であった水溶液中における生体分子の赤外スペクトルを直に観測することが実現でき、その構造/機能解析に役立つものと期待する。

なお、以上の成果の一部は、下記の雑誌論文、学会発表で報告を行った。

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) 酒井誠

赤外顕微鏡によるがん細胞の生体反応計測技術

光学(査読無), 印刷中

DOI:なし(URL:なし)

(2) 酒井誠, 藤井正明

STED, 蛍光ディップ手法における高解像度実現の共通原理

O plus E(査読無), **36**, 147-151 (2014)

DOI:なし(URL:なし)

(3) Makoto Sakai, Katsuya Kikuchi, Masaaki Fujii

Quaternary and secondary structural imaging of a human hair by a VSFG-detected IR super-resolution microscope

Chem. Phys. (査読無), **419** (2013) 261-265.

DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphys.2013.02.016>

[学会発表](計 12 件)

(1) Makoto SAKAI (招待講演)

Super-resolving IR imaging of biological

samples by using vibrational sum-frequency generation detection

Department lecture of Brookhaven National Laboratory

2015年1月13日

New York, USA

(2) 酒井誠 (招待講演)

赤外超解像イメージングによる生体分子のナノ空間機能解析

ナノマクロ物質・デバイス・システム創製アライアンス G3 分科会

2014年11月21日~2014年11月22日

九州大学西新プラザ、福岡

(3) 牛尾公平、渡瀬五常、石川春樹、藤井正明、酒井誠

赤外超解像イメージングによる毛髪 -ケラチンの分子配向観察

第52回日本生物物理学会

2014年9月25日~2014年9月27日

札幌コンベンションセンター、札幌

(4) 牛尾公平、藤井正明、酒井誠

赤外超解像イメージングによる毛髪 -ケラチンの分子配向観察~アミドIバンドの偏光依存性測定~

第6回SFG研究会シンポジウム

2014年8月2日~2014年8月3日

筑波大学、筑波

(5) 酒井誠 (招待講演)

赤外超解像顕微鏡を使って生体試料を観察する

第48回量子物理化学セミナー兼理数 GP セミナー

2014年7月23日

横浜市立大学、横浜

(6) 酒井誠 (招待講演)

赤外超解像顕微鏡で生体試料を観察する

分光イノベーション研究会第3回シンポジウム

2014年5月28日~2014年5月29日

理化学研究所、和光

(7) 酒井誠 (招待講演)

赤外超解像顕微鏡を使って生体試料を観察する -原理から実験まで-

平成25年日本分光学会生細胞分光部会シンポジウム

2014年3月7日

愛媛大学、松山

(8) 酒井誠、牛尾公平、長瀬忍、平野祐司、伊藤隆司、石川春樹、藤井正明

振動和周波検出赤外超解像顕微鏡による毛髪 -ケラチンの分子配向観察

第51回日本生物物理学会

2013年10月28日~2013年10月30日

京都国際会館、京都

(9) 酒井誠、牛尾公平、長瀬忍、平野祐司、伊藤隆司、石川春樹、藤井正明

VSFG 検出赤外超解像顕微鏡による毛髪 -
ケラチンの分子配向観察
第7回分子科学討論会
2013年9月24日～2013年9月27日
京都テルサ、京都

(10) Makoto Sakai (招待講演)
Observation of biological samples using an
infrared super-resolution microscope
Seventh International Conference on Advanced
Vibrational Spectroscopy
2013年8月25日～2013年8月30日

Kobe International Conference Center, Kobe
(11) Makoto Sakai and Masaaki Fujii
Secondary and quaternary structural imaging of
human hairs by using VSFG-detected IR
super-resolution microscope

The XVIth International Conference on
Time-Resolved Vibrational Spectroscopy
2013年5月19日～2013年5月24日
Beppuwan Royal Hotel, Beppu

(12) 田島朋樹、菊地克也、藤井正明、長瀬忍、
平野祐司、伊藤隆司、酒井誠
2波長分光法に基づく赤外超解像顕微鏡に
よる毛髪内部の分子構造解析
平成24年度日本分光学会年次講演会
2012年11月27日～2012年11月29日
東京工業大学大岡山キャンパス百年記念館、
東京

〔図書〕(計 0 件)

〔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://www.csd.res.titech.ac.jp/indexj.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 誠 (SAKAI, Makoto)
東京工業大学・資源化学研究所・准教授
研究者番号: 60298172

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し