

生体分子計測用 THz 帯 CARS 分光イメージング装置の開発

谷 正彦

福井大学 遠赤外領域開発研究センター

1. 研究のねらい

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($= 200 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 25 \text{ meV}$)であるが、タンパク質などの生体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 領域で確認されている[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 pump-probe 的な手法 (Impulsive stimulated Raman scattering) で観測されている程度である[3]。一方、このような生体分子機能に関連した低振動数モードを中性子散乱分光により観測する試みが計画されている[4]。中性子散乱分光は波数 Q と周波数 ω をパラメーターとする動的構造因子(Dynamical structure factor) $S(Q, \omega)$ を観測することで、モード密度分布が直接得られる優れた手法であるが、大規模な施設を必要とするため、一般にマシンタイムが限られ、多くのデータを取得することが困難であり、必要とされる試料の量も一般に多い。

筆者は近年開発された 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、中性子散乱と同様、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、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。これらの結果は THz 帯の吸収スペクトル分光が中性子散乱分光と同様な情報を与えることを示唆している。しかし、THz-TDS のような赤外吸収分光では、より自然状態に近い水溶液中での生体分子の分光は、水の強い吸収のために容易ではない。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。ラマン分光ではプローブ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 ($\sim 1 \mu\text{m}$)。一方、自発ラマン散乱の強度は一般に小さいため、イメージングや迅速性が求められる計測には向かない。コヒーレントラマン散乱を利用すれば、信号強度を飛躍的に高めることができる。そこで筆者はコヒーレントラマン分光法のひとつである Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy (CARS)を THz 帯の生体分子計測に適用することで、タンパク質などの生体分子の THz 帯($< 6 \text{ THz} = 200 \text{ cm}^{-1}$)の振動モードの観測を通して、生体分子の低振動モードダイナミクスを探り、さらには生体分子の構造と機能との関連を調べることができるのではないかと考えた。また、もし THz 帯で生体分子固有のスペクトルが得られれば、それを利用した生体分子の分光イメージングも可能になるはずである。

CARS 分光では振動モードを Pump 光及び Stokes 光で励起し、エネルギーと波数保存則を満たす方向に放射されるコヒーレントラマン散乱を観測する。(i)通常のラマン散乱より $10^4 \sim 10^5$ 倍強

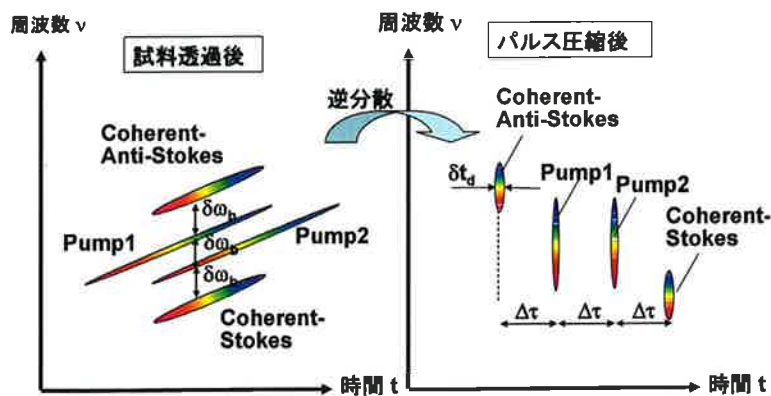


図 1. 周波数チャープした Pump 及び Stokes 光による Anti-Stokes 光の発生(左)および、逆分散を加えることによる周波数-時間軸上での分離の様子。

レーザー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。そこでこれらの問題を克服するために、筆者は周波数チャープしたフェムト秒レーザーを用いる以下のような手法を提案した。この手法は CARS 分光のみではなく他のコヒーレントラマン分光にも適用できる。

フェムト秒レーザーのスペクトルはそのパルス幅に応じて、数 THz～数 10THz の帯域を持っている。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 ($\delta\omega$ ～ 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 $\delta\omega$ が小さければ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が、それぞれの周波数チャープ光に逆分散を加えることで、もとのフェムト秒のパルスに変換し、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 Coherent-Anti-Stokes 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。さらに、Pump2 の Coherent Stokes 光の検出により Coherent Stokes Raman Spectroscopy (CSRS) を行うことができる。また Pump1 と Pump2 のコヒーレントラマン散乱による強度変調を検出することにより、それぞれ逆ラマン 分光 (Inverse Raman Spectroscopy, IRS), 誘導ラマン利得分光 (Stimulated Raman Gain Spectroscopy, SRGS) を行うことができる。これらのコヒーレントラマン分光法を総合的に行うことにより生体分子の低振動数モードについてより多くの情報を得ることができる。

2. 研究成果

周波数チャープしたフェムト秒レーザーを用いた THz 帯 CARS 分光装置の概念図を図 2 に示す。光源には 1kHz 繰り返しのチタンサファイアレーザー再生増幅器 (中心波長約 800nm, パルス幅約 100 フェムト秒) を使用した。フェムト秒レーザーはまず、Pump 光と Probe 光に分けられたあと、Pump は Stretcher (回折格子とレンズ対で構成) により正の群速度分散が与えられ、約 20ps 程度にまで延伸した周波数チャープパルスとなる。周波数チャープした Pump 光はマイケルソン型の干渉計により Pump1 と Pump2 に分けられ、相対的な時間遅延 $\Delta\tau$ が与えられたあと、再び重ね合わせられる。これにより Pump 光は時間遅延 $\Delta\tau$ に対応した差周波で光強度が変調される。これはいわゆる「うなり」現象であり、光ビートと呼ばれることもある。この光ビートを試料に入射させたあと、Compressor で、もとのフェムト秒パルスに戻す。CARS 信号は時間領域で Pump1 に対して、Pump2 と反対側の時間領域に $\Delta\tau$ だけ離れたところに現れるので、これを BBO 結晶中で Probe 光を用いて 400nm の波長の光に Up-conversion (和周波発生=SFG による波長変換) する。

い信号が得られる、(ii) Anti-Stokes 光は Pump 及び Stokes 光よりも周波数が高いので生体分子特有の蛍光の影響を受けない、などの利点がある。一方で、従来の CARS 分光は Pump 及び Stokes 光用に 2 台のレーザー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 ($<30\text{cm}^{-1}$) 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 ($<1\text{cm}^{-1}$) かつレ

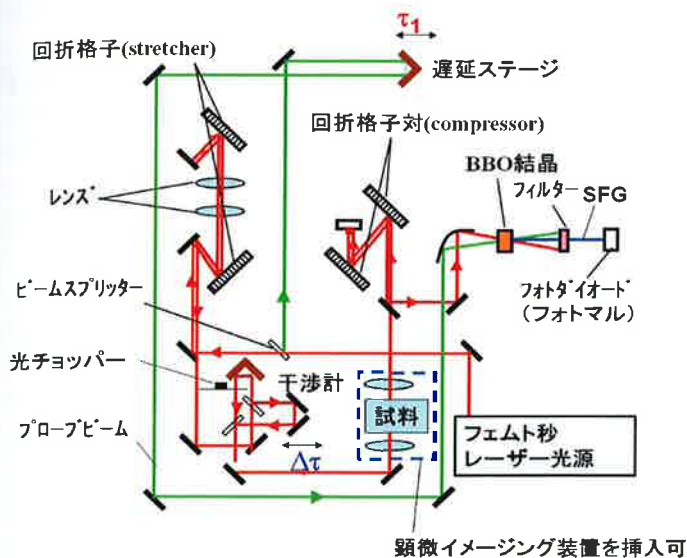


図2. 周波数チャープしたフェムト秒レーザーを用いた THz 帯 CARS 分光装置の概念図。

垂直な面のスライド振動に対応したモード)による共鳴が確認できた。その測定結果から分かったことは (i) 非共鳴 CARS 信号 (周波数にほとんど依存せず、電子励起が関与した応答) の寄与が大きい、(ii) 振動モードによる共鳴スペクトルはいわゆる「分散型」、すなわち共鳴周波数を中心に極小と極大を示すということである。これらは従来から知られていたことであるが、本手法においても、振動や緩和モードに対応した CARS スペクトルを得るためには非共鳴信号抑制が重要な技術課題であることが再認識された。

次に逆ラマン 分光により GaSe を測定した。その結果を図3に示す。0.6THz 付近、および4THz 付近に光学フォノンによる共鳴ピークが観測されていることが分かる。逆ラマン信号は CARS 信号よりも約一桁大きく(理由は不明)、CARS 測定の場合のように Probe 光の光学遅延 τ_1 を $\Delta\tau$ と同時に走査する必要がないので、CARS 測定よりも高い SN 比が得られ、かつ簡便である。また、逆ラマン 分光では 3 次の非線形感受率の虚部に対応する信号が得られるため、共鳴スペクトルも CARS の場合のように分散型の反対称スペクトルではなく、対称型となる。しかし、非共鳴信号と思われる大きなバックグラウンドが CARS 同様支配的になるため、この非共鳴バックグラウンドの抑制が生体分子分光やイメージングを行う際には必要となる。この非共鳴バックグラウンドを抑制するために偏光 CARS (p-CARS と略称されることが多い) と呼ばれる手法を試みた。すなわち、Pump1 と Pump2 の相対的な偏光角を制御することで、非共鳴信号の偏光方向と共鳴信号の偏光方向をずらしておき、偏光フィルターで非共鳴信号に対応する偏光成分をカットする。このようにすることで、共鳴信号そのものも強度がいくらか抑制されるが、非共鳴信号の大部分を抑制することができる。そのようにして測定した GaSe の 0.6THz 付近の逆ラマンスペクトルを図4に示す。非共鳴成分が抑制された結果、0.6THz 付近の光学フォノンによる共鳴ピークが顕著に、

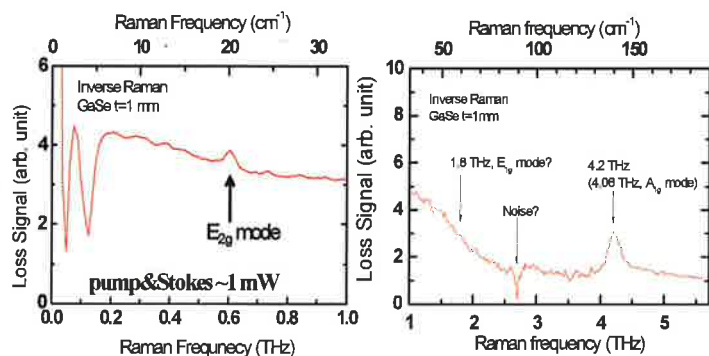


図3. GaSe の逆ラマン スペクトル

400nm に変換された信号光は GaP フォトダイオードまたはフォトマルで検出する。測定の感度を高めるため、Pump1 または Pump2 を光チョッパーで変調し、検出器からの信号をロックイン検波する。逆ラマン信号を検出する場合は、Up-convert された Pump1 の Pump2 による強度変化を、Pump2 を変調することで差分検波する。

生体分子を測定するまえに、原理実証と装置特性の評価を行うため、まず特性がよく知られている半導体を試料に用いて測定した。評価用に用いたのは THz 帯に光学フォノンモードが観測されている GaSe 単結晶 (c 軸カット, 厚さ 1mm) である。CARS スペクトルを測定した結果、0.6THz 付近に GaSe の光学フォノン(c 軸に

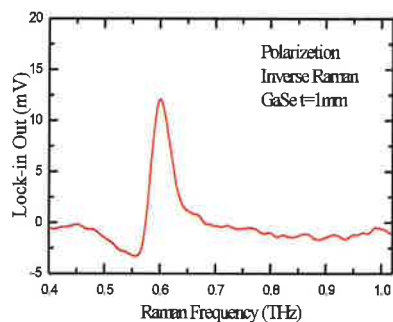


図4. GaSe の 0.4~1THz 領域の偏光逆ラマンスペクトル

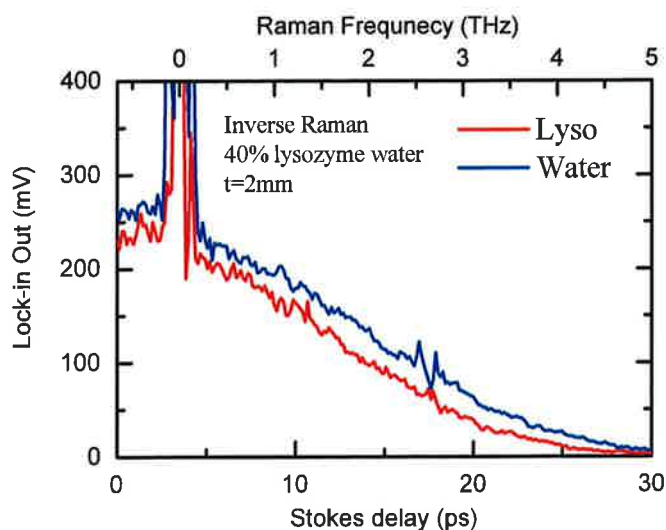


図5. トリ卵白リゾチーム濃厚水溶液(40重量%)と水の逆ラマンスペクトル

対強度は光学系の調整により上下するが、定数を一方のスペクトルに乗じても他方とは一致しない。このスペクトルの違いの原因としては、(a) リゾチーム分子の電子的応答（非共鳴信号に相当）、(b) バルクの水分子とリゾチーム分子に水和した水分子の緩和時間による違い、(c) リゾチーム分子の骨格的な振動モード、などが考えられる。THz帯のコヒーレントラマン測定を分子イメージング等、生体分子計測に応用するには、生体分子が固有のTHz帯バンドあるいはスペクトル構造を持つか、他のタンパク質と信号レベルにおいて明らかな差が見いだされることが必要である。残念ながらトリ卵白リゾチーム水溶液のコヒーレントラマンスペクトルにはリゾチーム固有のバンドやスペクトル構造は確認できなかった。また他のタンパク質分子（PYPなど）についても測定を試みているが、測定のスナ比が十分ではなく、定量的な比較ができるまでには至っていない。スナ比が上がらない原因は励起レーザーの強度揺らぎで高次の非線形効果による信号が大きく揺らぐことである（コヒーレントラマン散乱および測定に用いたUp-conversion効率はその励起光強度の3乗、2乗に比例）。今後は本手法によるコヒーレントラマン測定のレーザーの強度揺らぎによる雑音を抑制するなどしてスナ比を改善し、生体分子間のスペクトル定量比較を行う予定である。最終目的の生体分子の分光イメージングにはまだ道半ばであるが、着実に歩を進めていきたいと思う。

3. 主な論文

Tani, *et al.*: "Time-domain CARS signal detection for THz vibrational spectroscopy using chirped fs-pulses," p.275-276, Proceedings of the 21st International Conference on Raman Spectroscopy (21st August 2008, West London, UK)

参考文献

- [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).
- [4] Joti, *et al.*, Physica B **350**, E627 (2004).
- [5] Genzel, *et al.*, Biopolymers, **15**, 219 (1976).
- [6] Urabe, *et al.*, Biophysical Journal, **74**, 1533 (1998).

しかも高いスナ比で測定されていることが分かる。

次にトリ卵白リゾチームの濃厚水溶液(40重量%)の逆ラマンスペクトルと純水のそれを図5に示す。トリ卵白リゾチームについては基準モード計算により蝶番(ちょうつがい)屈曲型の振動モードがTHz周波数域にあることが示されており[2], また実験的には結晶状態で複数の振動モードがラマン分光により確認されている[5-6]。水溶液状態では2.25THz(75cm⁻¹)にバンドが観測されている[5]。図5からトリ卵白リゾチーム水溶液と純水の逆ラマンスペクトルの間にはわずか

ではあるが違いが見て取れる(相