

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

生体分子計測用 THz 帯 CARS 分光イメージング装置の開発

### 2. 氏名

谷 正彦

### 3. 研究のねらい

本研究課題ではタンパク質などの生体分子のテラヘルツ領域の分子動力学を探るための新規手法として、フェムト秒レーザーの線形チャープ光を用いたテラヘルツ帯の CARS(Terahertz Coherent Anti-Stokes Raman Scattering, THz-CARS)分光法を開発することである。またテラヘルツ帯の CARS スペクトルを用いて、生細胞等の生物・生体試料の顕微分光イメージングを目指す。

### 4. 研究成果

#### <背景>

テラヘルツ(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。しかしタンパク質分子の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。研究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精密な分光は、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。そこで研究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。

<新規手法の提案>

CARSでは振動モードをPump光及びStokes光で励起し、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  $10^4 \sim 10^5$  倍強い信号が得られる(励起光強度に依存), (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では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( $<1\text{cm}^{-1}$ )かつレーザ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, 研究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,  $\Delta\tau$ に応じた差周波数( $\delta\omega \sim$ 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

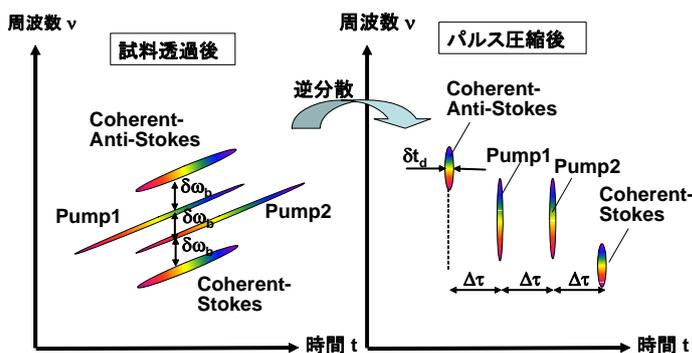


図 1. 周波数チャープした Pump 及び Stokes 光による Anti-Stokes 光の発生(左)および, 逆分散を加えることによる周波数-時間軸上での分離の様子。

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。

### <実験装置>

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 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 120 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 光は 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 $\Delta\tau$ 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, これを非線形光学結晶(BBO 結晶)中で Probe 光との和周波発生(SFG)により波長約 400nm の光に変換する。波長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, 波長変換された 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。逆ラマン分光では Pump1 を波長変換しなくても原理的には信号検出が可能だが, 波長変換により試料による散乱, 迷光による背景ノイズを低減することができる。

### <実験結果と考察>

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

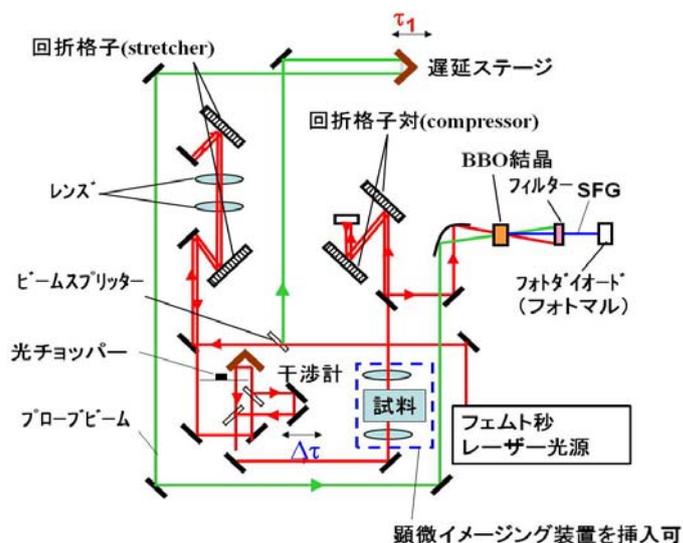


図 2. 周波数チャープしたフェムト秒レーザーを用いた THz 帯 CARS 装置の概念図。

近に GaSe の光学フォノン(c 軸に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 $\tau_1$ 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除去する。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明瞭に測定されていることが分かる。

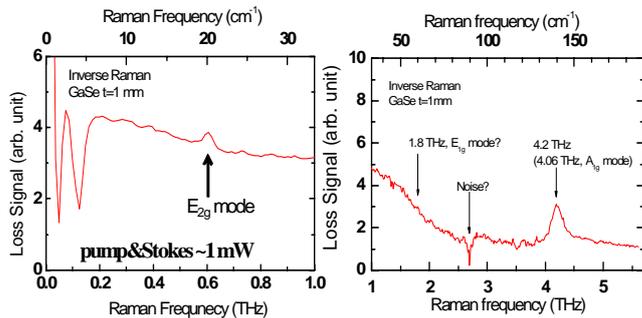


図3. GaSeの逆ラマンスペクトル

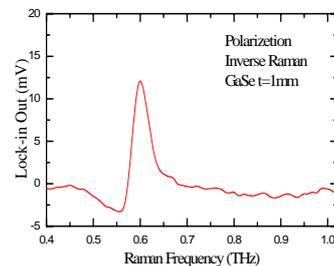


図4. GaSeの0.4~1THz領域の偏光逆ラマンスペクトル

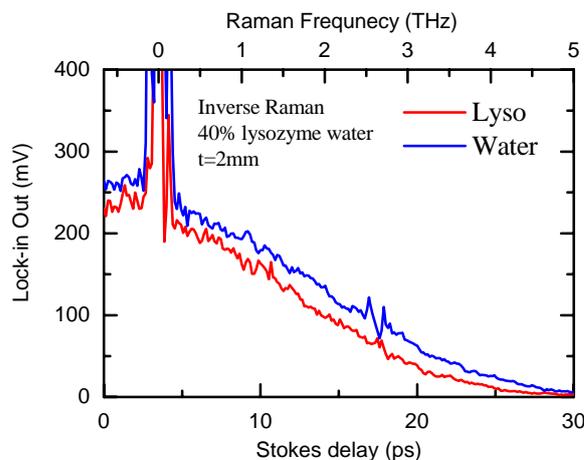


図5. トリ卵白リゾチーム濃厚水溶液(40重量%)と水の逆ラマンスペクトル

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[1], 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[2-3]。水溶液状態では 2.25THz( $75\text{cm}^{-1}$ )にバンドが観測されている[2]。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。

タンパク質水溶液のコヒーレントラマンスペクトルを得ることができたが, 明瞭なバンド構造は確認できていない。また信号強度が GaSe などの場合と比べて小さく, まだ定量的な議論をするために必要な SN 比は得られていない。コヒーレントラマン散乱および測定に用いた SFG の効率はその励起光強度の 3 乗, 2 乗に比例する。SN 比を今後改善するためには, 励起レーザーの強度揺らぎによる信号の揺らぎ(Noise)を抑制する必要がある。揺らぎを抑制するためにはレーザーパルス強度での規格化, 高繰り返しフェムト秒レーザーを用いて信号の平均化を行うなどの工夫が必要である。

## 参考文献

- [1] Brooks, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 4995 (1985).
- [2] Genzel, *et al.*, Biopolymers, **15**, 219 (1976).
- [3] Urabe, *et al.*, Biophysical Journal, **74**, 1533 (1998).

## 5. 自己評価

THz 帯のコヒーレントラマン測定を分光イメージング等, 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。残念ながら測定した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についても測定を試みているが, 測定の SN 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。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 SN 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。当初の目的である生体分子の分光イメージングには, まだまだ解決すべき課題は多い。しかしながら, 本手法で(1)THz 帯のコヒーレントラマンスペクトルが得られることが実証できたこと, (2)タンパク質の水溶液と純水の間有意なスペクトル差を確認できたこと, は評価に値すると思われる。

## 6. 研究総括の見解

測定法として困難な課題に挑戦しており, 技術上の問題点に遭遇しながらも何とか THz 帯

CARS 測定システムを開発出来たことは評価したい。しかしながら、S/N は極めて不十分であり、タンパク質における低波数ラマンシグナルが明確に観測されていないのは残念なところである。目的とするイメージングの達成にはまだ距離があるものの、技術的課題を克服して少なくともいくつかのタンパク質について明瞭なデータが出ることを期待したい。

## 7. 主な論文等

(A) さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文)発表 なし

(2) 特許出願 なし

(3) 学会発表

学会発表(国際)

・Masahiko Tani, T. Koizumi, H. Sumikura, M. Yamaguchi, and M. Hangyo: "Time-domain CARS signal detection for THz vibrational spectroscopy using chirped fs-pulses," pp.275-276, Proceedings of the XXI International Conference on Raman Spectroscopy ICORS 2008 (21st August 2008, Uxbridge, West London, UK)

・Masahiko Tani, Toshiyuki Koizumi, Hisashi Sumikura, Mariko Yamaguchi, and Masanori Hangyo: "Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Spectroscopy in Terahertz Region Using Chirped Optical Pulses," The 33rd International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves (IRMMW-THz 2008), M3B5.1197 (September 15-19, 2008, California Institute of Technology, Pasadena, CA, USA)

学会発表(国内)

・小泉俊幸, 角倉久史, Christopher Que, 谷正彦, 萩行正憲:「テラヘルツ帯の時間領域 CARS分光法の開発」応用物理学会テラヘルツ電磁波技術研究会(石川県加賀市, 2007年3月2日~3月3日)

・小泉俊幸, ケ・クリストファー, 高野恵介, 谷正彦, 萩行正憲

「周波数チャープパルスを用いた低周波数領域の CARS 信号検出」

日本分光学会テラヘルツ分光部会 シンポジウム「テラヘルツ分光法の最先端 II ~多様化と進歩~」(P-1, IPC 生産性国際交流センター, 神奈川県, 2007年11月21日~22日)

・小泉俊幸, ケ・クリストファー, 高野恵介, 谷正彦, 萩行正憲

「フェムト秒チャープパルスを用いた低周波数 CARS 信号の時間領域検出」

OPJ2007 シンポジウム (大阪大学コンベンションセンター, 2007年11月26日)

・小泉俊幸, ケ・クリストファー, 高野恵介, 山口真理子, 谷正彦, 萩行正憲:「フェムト秒チャープパルスを用いたTHz帯CARS信号の検出」2008年春季第55回応用物理学関係連合

講演会, 講演番号 30p-ZH-3 (日本大学工学部 船橋キャンパス, 2008 年 3 月 30 日)

・ M. Tani, H. Sumikura, T. Nagashima, and M. Hangyo: “Coherent Raman Scattering Spectroscopy in Terahertz Frequency Region Using Chirped Optical Pulses,”平成 20 年度日本分光学会年次講演会, 講演番号P30 (Poster) (東北大学片平さくらホール, 2008 年 11 月 19 日~21 日)

(4)招待講演

招待講演(国内)

・ 谷正彦:「生体分子計測用THz 帯CARS 分光イメージング装置の開発」(招待講演)テラヘルツ秋の学校in 信州 2008 / テラヘルツMMT 研究会 合同研究会 (セミナーハウス花村, 長野県安曇野市, 2008 年 11 月 7 日)

(B)その他の成果      なし