

4P027

励起波長可変顕微ハイパーラマン分光装置の開発

(東大院・理) ○ 松崎維信、島田林太郎、濱口宏夫

【序】最近われわれは、「分子近接場効果」と呼んでいる新しい光分子現象を発見した。これは溶質分子の共鳴ハイパーラマン散乱において溶媒分子由来のハイパーラマン散乱が増強される現象であり、われわれはこれを溶質分子と溶媒分子の分子間振電相互作用により説明している[1, 2]。分子近接場効果は、プローブ分子となる溶質分子近傍のナノメートルスケールの局所構造に関する情報を選択的に検出できるという、従来の分光学的手法にはない特徴を持っており、生細胞のような様々な化学種の存在する複雑な系の分析に役立つ可能性を秘めている。この特徴を生かした応用を展開するためには、プローブ分子に対する適切な共鳴条件を選ぶための励起波長可変性と、サンプル中の目的の箇所を測定するための空間分解能が必要となる。そこで本研究では、720 nmから1 μ mの波長で励起可能な励起波長可変顕微ハイパーラマン分光装置の開発をし、生体膜のモデルであるリポソームの測定を試みた。

【実験】(装置)光源はcwモード同期Ti: Sapphire発振器 (Spectra Physics, Tsunami) およびサブナノ秒マイクロチップレーザー (JDS Uniphase, NanoPulse) を用いた。Ti: Sapphire発振器は、中心波長は720 nmから920 nmまで可変であり、繰り返しは82 MHz、パルス幅は約3 psである。マイクロチップレーザーは、中心波長は1064 nm、繰り返しは6.6 kHz、パルス幅は約800 psである。光源の切り替えは、ミラーを1枚追加し、色ガラスフィルターを交換するだけで行えるようにしてある。これらの光をフィルターで減光し、対物レンズ (x40, NA 0.60) でサンプル上に集光することで励起光とした。生じたハイパーラマン散乱光を同じ対物レンズで集め、ダイクロイックミラーとフィルターで励起光から分離した後、分光器で分散し、CCDカメラで検出した。得られたスペクトルは、多項式でフィットすることで二光子蛍光と思われるオフセットを除去した。

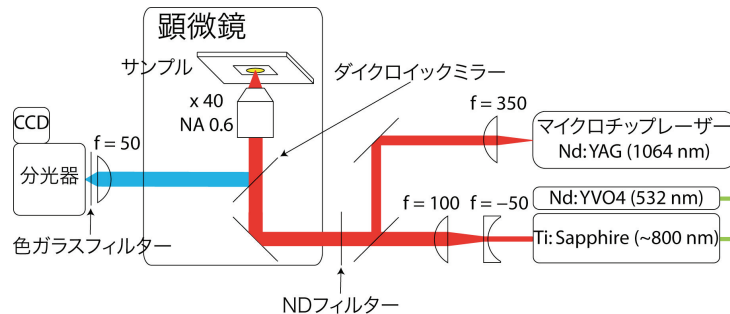


図1 装置図

(1) N,N-ジメチル-p-ニトロアニリンの励起波長可変測定

N,N-ジメチル-p-ニトロアニリンの1,4-ジオキサン溶液 (100 mM) を1064 nm、850 nm、800 nm、750 nmの各々の波長の光を励起光としてハイパーラマンスペクトルの測定を行った。サンプル位置での励起光強度および測定時間はそれぞれ6 mWで120分、20 mWで20分、20 mWで20分、20 mWで60分であった。

(2) β -カロテン含有リポソームの空間分解測定

β -カロテン含有リポソームは、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) と全トランス β -カロテンをクロロホルムに一度溶解した後、クロロホルムを減圧留去して薄膜を作

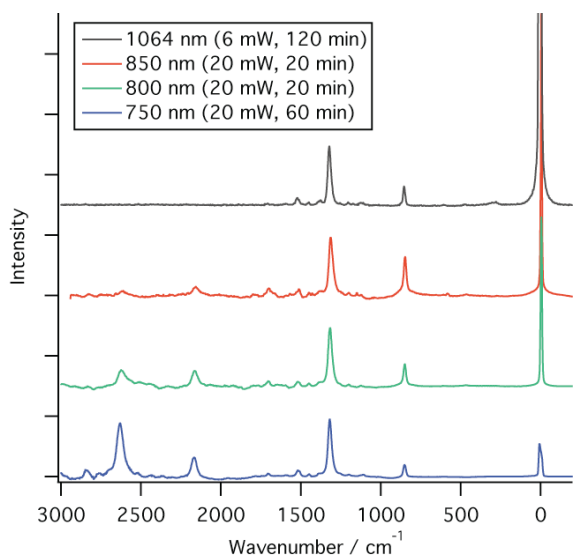


図2 N,N-ジメチル-p-ニトロアニリン/1,4-ジオキサン溶液のハイパーラマンスペクトル。括弧内はサンプル位置での励起光強度および測定時間である。

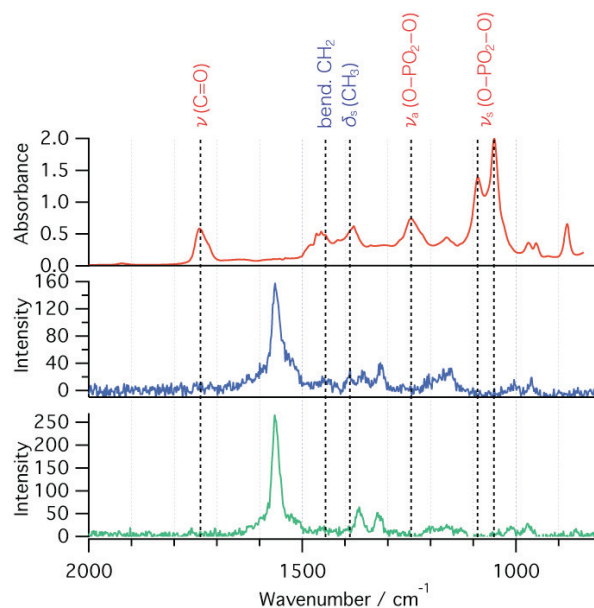


図3 上から順にDPPCの赤外吸収スペクトル、 β -カロテン含有リポソームのハイパーラマンスペクトル、粉末状 β -カロテンのハイパーラマンスペクトル

り、そこに純水を加えて超音波処理することで調整した。測定は、顕微鏡観察下で単一のリポソームに励起光が当たるようにして行った。励起波長は810 nm、サンプル位置での励起光強度は50 mW、測定時間は15分であった。

【結果と考察】

(1) N,N-ジメチル-p-ニトロアニリンの励起波長可変測定 (図2)

854 cm^{-1} と1321 cm^{-1} にそれぞれ NO_2 の変角振動および NO_2 の対称伸縮振動[3]に由来する特徴的なバンドが観測された。また、励起波長が短くなるにつれ、2174 cm^{-1} と2634 cm^{-1} に結合音および倍音と考えられるバンドが新たに現れてきた。これは短波長になるほど真正共鳴に近づいていることを示しており、またその共鳴の機構がA項[4]であることも同時に意味している。

(2) β -カロテン含有リポソームの空間分解測定 (図3)

1391 cm^{-1} と1446 cm^{-1} に粉末状 β -カロテンのハイパーラマンスペクトルには存在しないバンドが現れた。DPPCの赤外吸収スペクトルとの比較により、これらはDPPCの CH_3 および CH_2 の変角振動[4]に帰属されるバンドが分子近接場効果により観測されたものと考えられる。これに対し、赤外吸収スペクトルにおいて強く観測されている $\text{C}=\text{O}$ の伸縮振動や $\text{O}-\text{PO}_2-\text{O}$ の対称および反対称伸縮振動のバンドは、 β -カロテン含有リポソームのハイパーラマンスペクトルでは観測されなかった。この結果は、リポソーム中の β -カロテンは、DPPCの親水性の部分ではなく疎水性の部分の近くに存在することを示唆する。

[1] R. Shimada, H. Kano, H. Hamaguchi, *J. Raman Spectrosc.* **37**, 469-471 (2006)

[2] R. Shimada, H. Kano, H. Hamaguchi, *J. Chem. Phys.* **129** (2), 024505 (2008)

[3] M. Harrand, *J. Raman Spectrosc.* **4**, 53-73 (1975)

[4] Y. C. Chung, L. D. Ziegler, *J. Chem. Phys.* **88** (12), 7287-7294 (1988)

[5] S. Krishnamurty, et al. *J. Phys. Chem. B*, **112**, 13433-13442 (2008)