

I型コラーゲンのチップ増強ラマン散乱

(関学大院・理工) ○南 聡史, 鈴木 利明, 平井 洋平, 佐藤 英俊, 尾崎 幸洋

【序論】 チップ増強ラマン散乱(TERS:tip-enhanced Raman scattering)法は, 金属ナノ探針の先端に励起光を照射することにより, 局在表面プラズモン共鳴を誘起して増強電場を発生させ, 光の回折限界を超えたナノ領域のラマン散乱を増強する測定法である. 近年, 微量物質の高感度検出分野に応用が期待されている中, 生体分子や細胞, 生体組織の直接測定への研究が多く試みられている. 中でも, I型コラーゲンは生体内で最も多く存在するタンパク質の一つであり, 骨や皮膚を形成するのに用いられる. I型コラーゲンは生体内で三重らせん構造をした棒状の分子(図1)が互いに会合して周期構造を持った繊維を形成していることが知られている.

本研究では, 調製方法を変えたコラーゲンについて, 銀ナノ粒子を用いた表面増強ラマン散乱(SERS:surface-enhanced Raman scattering)を測定し, コラーゲンの構造の違いによるSERSの変化を詳しく検討した. さらに, 基板上に固定したTERS測定を行い, 得られたスペクトルをSERSスペクトルの帰属¹⁾と比較しながら解析を試みた.

【実験】 SERS測定ではAl容器上にクエン酸還元にて作成した銀ナノコロイド分散液²⁾を滴下して乾燥し, I型コラーゲン溶液を滴下して乾燥した. さらにその上から銀ナノコロイド分散液を再度, 滴下して乾燥した(図2). コラーゲン溶液の乾燥方法については加熱乾燥したものと, 非加熱で真空乾燥したものとを作製し, 試料が熱によって変性した場合及び, 変性しないよう調製を行った場合のサンプルとした. 励起波長は514 nmのレーザーを用いてSERSスペクトルを測定した. また, TERS測定に関して, 銀蒸着された雲母基板上に0.5%-I型コラー

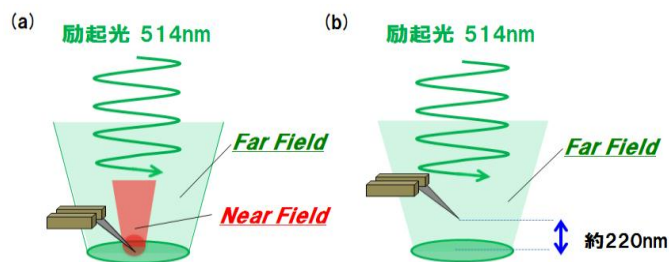


図3. TERSプローブ(a)接近時及び, (b)離脱時

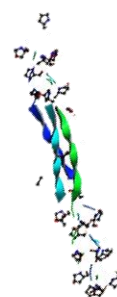


図1. I型コラーゲン分子の三重らせん構造 (PDB, 1KBV)

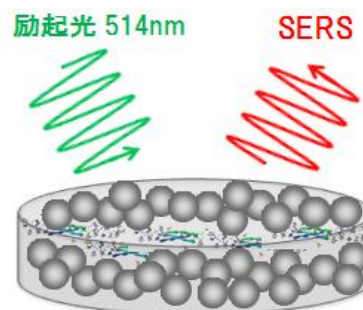


図2. 調製方法の異なるSERS測定

ゲン酢酸緩衝液を滴下して十分に真空乾燥を行ったサンプル基板を準備した. そこに, 銀蒸着されたタングステンニードル(先端半径:約100 nm)を非接触モードで試料に接近させて, 励起波長514 nmを照射して測定を行った[図3(a)]. 次に, 接近させたプローブを約220 nm離脱させて針先端による増強ラマンが観測されない条件で測定し[図3(b)], 2つの測定の差分によって得られた増強信号をTERSスペクトルとして得た.

【結果・考察】 調製方法の異なる SERS スペクトルの測定結果を図 4 に示す. 加熱したサンプルの結果[図 4(a)]に関して, 非常に鋭いピークを持ったスペクトル形状をしており, タンパク質の残基に由来するピークが観測された. これは, コラーゲンを加熱したことにより三重らせん構造が崩れてランダムコイル状となり, 銀コロイド表面に密着しやすい条件にあるため[図 5(a)], 粒子間の接点近傍に位置した部分から鋭敏な SERS シグナルが得られたと考えられる. 加熱を行わなかったサンプルの結果[図 4(b)]に関して, 図 4(a)と比較するとピークの線幅が広く, タンパク質の構造に由来するピークが観測された. これは, 試料に熱を与えないようにタンパク質の変性を抑え, 比較的, 穏やかな条件にあるため, 三重らせん構造を保持していると考えられ, 銀コロイド表面に試料が限られた部分に位置し[図 5(b)], それを反映した SERS スペクトルとなったと考えられる. したがって, コラーゲンの構造の違いの様子を SERS 法で捉えることが可能であると考えられる. 次に, TERS 測定に関して針接近時, 針離脱時及び, 差分したときのスペクトルを図 6 に示す. 針の接近時と離脱時との差分を取ることで得られた増強シグナルが主に 653, 944, 1213 cm^{-1} に観測された. これらピークは Phe(1213 cm^{-1}), C-C 結合(944 cm^{-1})に由来するシグナルと帰属された. この結果より, コラーゲンの微小領域の情報を得ていると考えられる.

【参考文献】

- 1) S.Stewart, P.M.Fredericks, *Spectrochimica Acta Part A*, **55** (1999) 1615-1660
- 2) P. C. Lee. D. Meisel. *J. Phys. Chem.* **86**, (1982), 3391

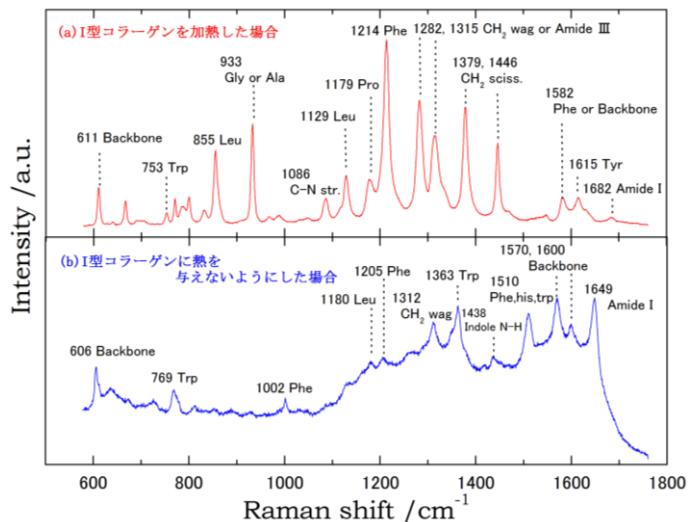


図 4. 調製方法の異なる I 型コラーゲンの SERS スペクトルの比較

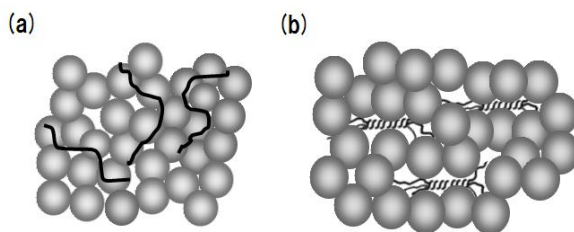


図 5. 予想される I 型コラーゲン分子の(a)三重らせん構造が崩壊, (b)三重らせん構造を保持

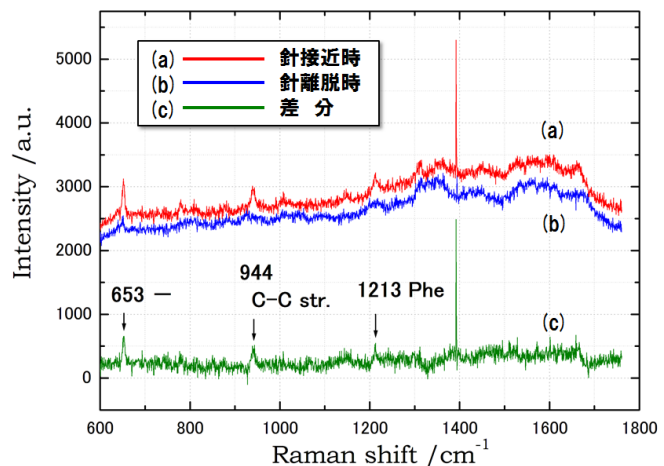


図 6. TERS プロブ接近時と離脱時における I 型コラーゲンのラマンスペクトル及び, その差スペクトル(TERS スペクトル)