

チップ増強ラマン分光法による脂質膜の振動スペクトル測定

(千葉大院工・共生応用化学¹, 東大院・総合文化²)野本 知理¹, 中田 惇¹, 豊田 太郎², 藤浪 真紀¹Observation of vibrational spectra of lipid membranes
by tip-enhanced Raman spectroscopy(Chiba University¹, The University of Tokyo²)Tomonori Nomoto¹, Atsushi Nakata¹, Taro Toyota², Masanori Fujinami¹

【序】

生体膜は様々な生理機能を発現する場である。生体膜の機能解明を分子レベルで進めるにあたって、膜中に存在する様々な分子の構造・化学結合を反映した振動スペクトルの解析は重要となる。生体膜中にはタンパク質分子や脂質によるドメイン等、100 ナノメートル以下の構造があることが知られているが、通常の顕微鏡下の赤外・ラマン分光法では空間分解能の制約から判別が困難である。チップ増強ラマン分光法 (TERS) は金属ナノ粒子によるプラズモン共鳴を利用して探針先端のラマン散乱を著しく増大させる手法であることから、より高い空間分解能ので生体膜中の振動スペクトル測定の可能性が期待される。一方、TERS による生体膜の *in situ* 観測のためには、水中においても増強を得られることが必要となる。そこで本研究では脂質膜からなる生体膜の振動スペクトルを高空間分解能観測することを目指し、TERS を液中で行うに適した探針作製法の検討を行った。また得られた探針を生体膜モデルである脂質 2 分子膜の水中測定に応用することで、膜の状態変化に伴うスペクトル変化の観測を行った。

【実験】

大気中の TERS 測定では、誘電体層をコートした後に金や銀を蒸着することでプラズモン共鳴波長の制御を行い、ラマン散乱光の高い増強度を得られることが知られている [1-3]。誘電体層を蒸着により作製した場合、水中で使用すると誘電体層と金属ナノ粒子層の剥離が多発することが多い。そこで本研究ではタングステンを電解研磨した探針に Al を蒸着した後、陽極酸化により表面酸化処理を施し、さらに銀を蒸着することで、水中でも誘電体層が剥離することのない安定な探針を得ることができた (図 1, 図 2)。試料はベシクル融合法によりガラス上に展開した脂質 2 分子膜であり、倒立顕微鏡上

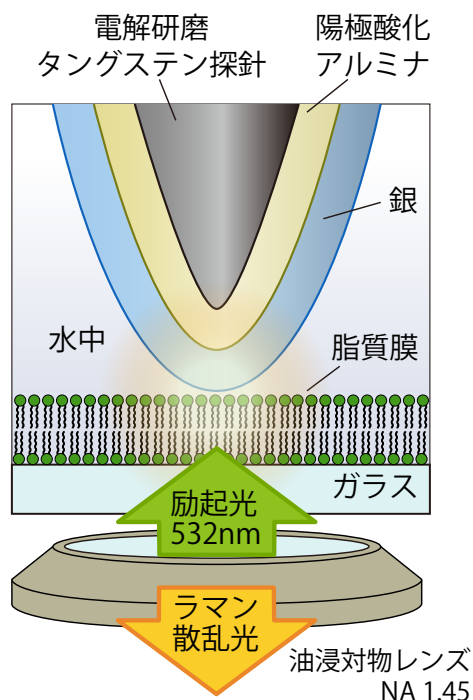


図1：水中で TERS 測定を行うため本研究で作製した探針の構造と TERS の測定光学系の概要

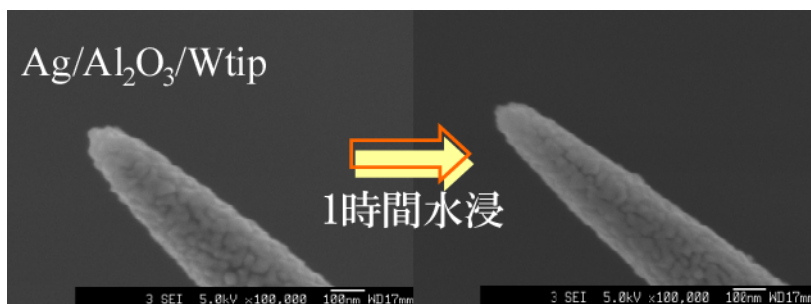


図2：本研究で使用したプローブ探針の水中における安定性の評価。

左：作製後の探針のSEM画像，右：1時間水中に浸した後の探針のSEM画像

の試料に集光した 532nm の励起光スポットに前述の Ag/Al₂O₃/W 探針をを近接させることでTERS スペクトルを取得した(図2)。探針は水晶振動子に取り付けられており、試料との距離制御はシアフォースの検出により行った。

【結果と考察】

多重膜状態の DPPC(1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) 膜のラマンスペクトル、水中の DPPC 膜の TERS スペクトル、および探針が試料に近接していない場合のラマンスペクトルを図3に示す。探針が近接していない状態ではガラスのラマン信号のみが得られるのに対し、探針を近接させた状態では多数のピークが観測された。得られた TERS スペクトルには多重膜の DPPC のラマン信号と同じ 1300cm⁻¹, 1450cm⁻¹ 付近のピークが観測されたことから、これらのピークは脂質分子の TERS

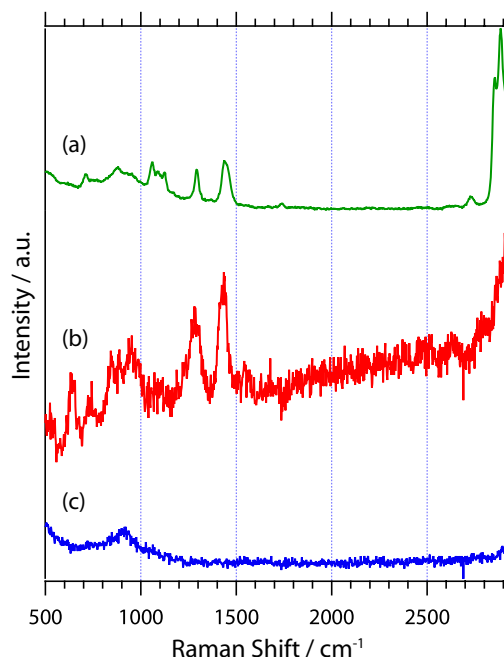


図3：(a) 多重脂質膜のラマンスペクトル (b) 水中の DPPC 膜の TERS スペクトル (露光時間:3 秒) (c) 探針が試料に近接していない場合のラマンスペクトル (露光時間:3 秒)

信号であると考えられる。不飽和結合を持たない DPPC 膜は、室温では流動性の低いゲル相を形成しているのに対し、不飽和結合を持ち室温で液晶相となる DOPC(1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) 膜の場合、得られたスペクトルに時間変化が観測された。DPPC 膜の測定からはこのような時間変化が観測されなかったことから、探針近傍の微小な領域における脂質分子の局所的な立体配座・構造変化と化学変化によるスペクトル変化が、流動性が高い液晶相膜の流動・ゆらぎに伴った時間変化として観測された可能性が高い。これらの結果は、脂質の相分離や膜タンパク質を含んだ生体膜モデルの挙動などの応用への可能性を示すものである。発表では TERS で実際に観測している空間サイズなどについても議論する。

【References】

[1] B.S. Yeo, T. Schmid, W. Zhang, R. Zenobi, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387 (2007) 2655.
 [2] X. Cuil, W. Zhang, B.S. Yeo, R. Zenobi, C. Hafner, D. Erni, *Optics Express*, 15 (2007) 8309.
 [3] A. Ono *et al.*, *Chemistry Letters*, 37 (2008) 122.