

チップ増強ラマン分光法 増加するバイオ分野での研究事例

Tip-Enhanced Raman Spectroscopy
Finds a Growing Number of Applications in Biology

Marc CHAIGNEAU

Maruda SHANMUGASUNDARAM

Fran ADAR

チップ増強ラマン分光法(Tip-enhanced Raman spectroscopy, TERS)は、ラマン散乱がもつ高い化学識別能力と走査プローブ顕微鏡(Scanning Probe Microscopy, SPM)がもつナノメートルレベルの高い空間分解能の双方の特徴を備えている。TERSを用いると、複数成分からなる材料表面を、20 nmを超える分解能で、かつラベルフリー(対象分子に標識をつけない)で分析することができる。この論文では、生体系の研究において、アミノ酸のような生体構成成分から、細胞表面のような複合環境に存在する細胞膜レセプターといった対象まで、TERSがいかにして応用されているかを解説する。

Tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS) combines the high chemical specificity of Raman scattering with the nanoscale spatial resolution of Scanning Probe Microscopy (SPM). It enables label-free detection of surface components in multi-component samples with ultra-high spatial resolution (better than 20 nm). This article describes how TERS can be applied to study biological systems ranging from pure components like amino acids to membrane receptors found in complex environments such as cell surfaces.

はじめに

ラマン分光法は、分子構造に対応する情報を物質の指紋として取得できるという特徴があるが、生物学、医学などの分野では、①ラマン散乱光の本質的な微弱さにより十分なS/N比が得られない、②光の回折限界(空間分解能 $\sim 0.5 \lambda^*$)に制約されるといった課題がある。実際、回折限界を超えるナノメートルレベルの高い空間分解能が必要なケースは多く、これが実現すれば分子一個を見分ける空間分解能で化学的情報を取得できる可能性がある。チップ増強ラマン分光法(TERS)と呼ばれる手法によって、こうした空間分解能の向上が実現できるようになった^[1]。

*1: $\sim 0.5 \lambda$: 散乱光の波長の半分程度の長さ

TERSはラマン散乱のもつ高い化学識別能力と走査プローブ顕微鏡(SPM)のもつナノスケールの空間分解能を組み合わせたものである。非常に高い空間分解能(最小10 nm)で試料の表面成分を検出することが可能で、ナノマテリアルやナノメートルレベルの対象物の分析に適している^[2-6]。また生体分子の分析において、TERSは他の分光法や顕微鏡分析手法と比べて以下のような利点がある。例えば、生体分析を難しくしているS/N比の低さを克服できるため、体

積の大きな試料を使用する必要がなくなる。これは、ナノメートルスケールの空間分解能が得られることに加えて、TERSでは表面増強ラマン分光法(SERS)と同様に増強されたラマン信号を得ることができるからである。これにより単一分子を対象とした分析の可能性も見出されている。他の手法として、汎用の電子顕微鏡分析(EM)も、SPMと共にナノメートルレベルの粒子観察に用いられてきた。しかしEMは、SPMと同様得られる化学情報が限られており、生体試料に重金属による染色を必要とする場合もある。また、他の回折限界を超える微細な化学情報を取得できる手法としては、超解像蛍光顕微鏡が開発されているが、依然として蛍光標識を必要とし、また、そのバンド幅が広くラマン分光法のような詳細な分子情報は得られない。ラベルフリー法では、標識と分析物の無用な相互作用がなく分析対象の機能を保持することが可能であり、標識からの信号もないことから、化学的同定に際して高い識別能力を実現できる。このようにナノメートルレベルの化学組成情報をラベルフリー法で提供する能力を持っているのがTERSである。本稿ではアミノ酸や核酸塩基の単分子層、タンパク質、多タンパク質複合体、核酸、細胞表面、および細胞表面相互作用など、数多くの生体システム研究へのTERS応用の可能性について述べる。

ラマンとAFMの組み合わせ

ラマン分析とAFM (SPMの一種である原子間力顕微鏡) 分析を同一の顕微鏡システム上に組み合わせる用いることができる。そこでは同じ試料表面から得られる物理的情報と化学的情報を総合することによって試料の組成や構造に関する新しい情報が入手できるため、今までにない興味深い知見を得られる可能性がある。実際、AFMとラマン分析を同一箇所 (co-localizedモード) で測定する場合には、SPM (走査プローブ顕微鏡) 測定とラマンマッピングを、交互に、あるいは同時並行で測定し、測定情報を重ねて画像化できる。AFMおよびその他のSPM法からは、形状分布・機械的特性・熱的特性・電気的特性および磁気的特性に関する情報が分子レベルの分解能 (ナノメートル) で、マイクロメートルレベルの対象面積に対して提供される。他方、共焦点ラマン分光分析およびそのラマンイメージからは、対象物に関する特定の化学情報が回折限界の空間分解能 (マイクロメートル未満) にて提供される。

チップ増強ラマン分光法 (TERS) と組み合わせることによって、上述のAFMラマン装置において、ナノメートルの空間分解能でラマンイメージを取得できるようになる。この手法は金属製 (通常は金または銀) のチップを用いるもので、入射光をチップの最先端部に集中させ、これをナノメートルサイズの光源および局所的増幅装置として機能させることで、ラマン分析の感度を大幅に向上させ ($10^3 \sim 10^7$ 倍)、観測エリアをチップ先端の局所領域まで絞り込むことができる。

この組み合わせには2種類の光学配置が存在する。1つは透過型 (transmission)、もう1つは反射型 (reflection) で、それぞれ長所と短所がある (Figure 1)。

斜め方向から照明する方式の反射型の場合は多種類のSPMプローブを用いることが可能になり、さまざまな種類の (不透明あるいは透明な) 試料についてTERS測定ができるよう設計され、開口数 (NA) が大きく作動距離の長い対物レ

ンズ (NA最大0.7) が最適な角度 (60°) で配置されている。こうすることでTERSの増幅に最も適した偏光方向のレーザー光 (p偏光) をプローブ先端に照射し、かつプローブ先端が走査される際に生じる影を最小限に抑えることで、集光効率が最高となるようになっている。

透過型で測定する場合の倒立配置は透明試料に適しており、透明試料が多い生物系のアプリケーションに向いている。この配置によって油浸レンズ (NA最大1.45) のような非常に高いNAの対物レンズが使用できるので、焦点における光密度を高めることで高感度にラマン信号が収集できる。この透過型の配置においても偏光方向は適切に設定する必要がある。その際、プラズモンの励起およびプローブ先端周辺に誘導される電磁場の強度を高めるためには、(照射面に対して) 垂直方向に偏光したレーザー光線を用いなければならない。

TERS効果は、貴金属製の鋭いチップの先端部にレーザー光線が集束するように照射されて電磁場が局所的に増強された際に生じる。現在のところ、TERSチップは、標準的なAFMチップに (全体または部分的に) 金属皮膜を形成するか、あるいはすべて金属で作られたチップ (全体が金属の細線) に電気化学的エッチングを施して製造されている^[7]。金属細線のチップは、水晶振動子のフォーク部に取り付けられSTMやシアフォースモードAFMに使用されるものと同様である。今日もっとも一般的な方法は、標準的なAFM用カンチレバーに厚さ数十nmの金または銀の被膜を形成する金属化処理である。通常は蒸着^[8, 9]、スパッタリング^[10]、または電気めっき^[11, 12]を用いる。電磁場増強効果を高めるため被膜形成直後にこの層を集束イオンビーム (FIB) でエッチングすることもある^[13]。また、最終先端部の寸法形状をFIBによりナノメートルレベルの機械加工を施すことによって、プラズモンの共鳴波長に応じた調整が可能となり^[14]、こうした加工は、エッチング処理により作成される金属細線のチップにも適用することができる^[15]。

ナノメートルレベルの空間分解能

TERSは近接場分光イメージング (near-field spectroscopic imaging) 手法の一種であり、その意味では、散乱光-SNOM (走査型近接場顕微鏡) 技術とラマン分光器との組み合わせによる走査プローブ顕微鏡技術と同じ分類に属するものと言える。それでもやはりTERSは光学的イメージング技術の一種であり、空間分解能の概念は光学における一般的な定義に沿っていなければならない。

その場合、光学における分解能の厳密な定義とは画像として識別できる2つの物体の間の最小距離である。光学顕微鏡の場合、分解能は使用される照射光の波長の半分より小さくはならないとするレイリー基準に支配される。近接場

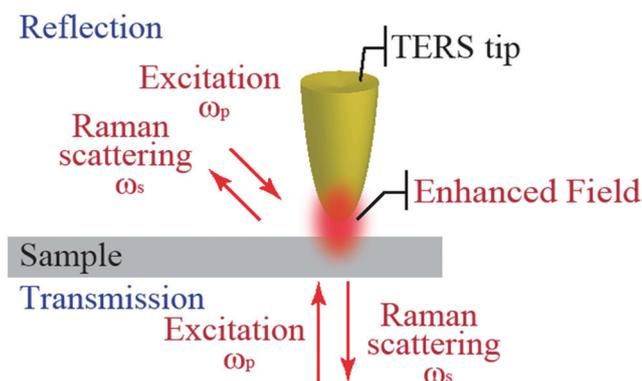


Figure 1 Reflection and transmission TERS configurations.

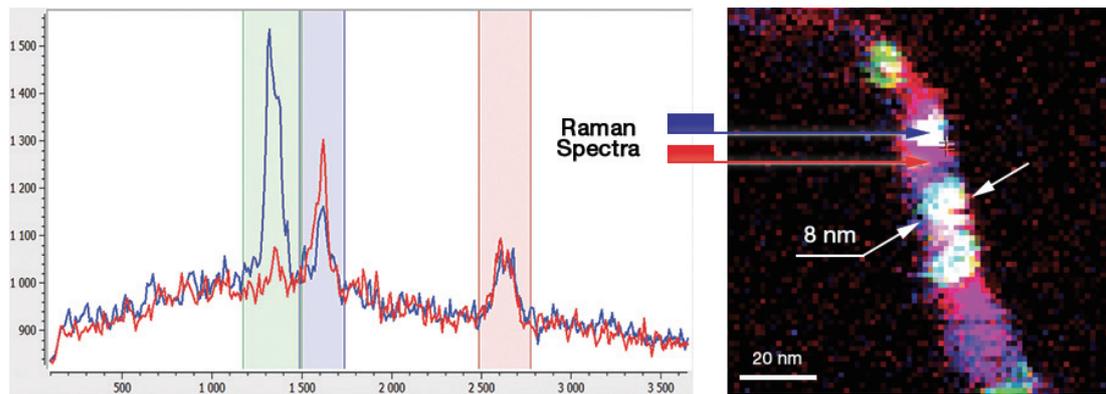


Figure 2 TERS image of 100 nm × 100 nm (75 × 75 pixels) of a carbon nanotube showing an optical spatial resolution down to 8 nm; total map acquisition time < 9 minutes.

光学すなわちTERSにおいても分解能はこの定義に従わなくてはならない。しかし、測定対象がこの必要条件(試料表面で2つのナノ物体が適当な間隔で十分に近接している)が満たされる状態になっていることは非常にまれであり、一般には、TERS(およびその他の近接場光学イメージング技術)における空間分解能は、ひとつのナノ物体を対象とする光学的セクショニング解析(対象の境界におけるラマンバンド強度変化形状から解析すること)によって定量化することが容認されている。

Figure 2の例に示すTERSイメージ(走査範囲100 nm × 100 nm, ピクセルあたりのステップ長1.3 nm, 総取得時間9分未満, ピクセルあたりの積分時間100 ms)は、一本のカーボンナノチューブ(CNT)についてのナノメートルレベルの化学組成情報をイメージ化したもので、その空間分解能はDバンド光(1360 cm^{-1})のセクショニング解析から8 nmと確認された。第一近似としては、この分解能はTERSチップの曲率半径によって決まるもので、この「8 nm」は実はチップの半径とナノチューブ形状の畳み込みである。したがって実現可能なTERS分解能を近似することが可能であり、それはTERSチップの曲率半径の1/2に等しいと考えら

れる。Figure 2に示される例のTERSマップは、Dバンドの強度(白と緑のピクセルで示されている)は格子構造の欠陥を示しており、これに対して赤色の領域はCNTの完全なグラファイト構造の配列を2Dバンドの強度を通して表している。局在的な格子欠陥の近傍ではステップが一段進むとDピーク強度が明らかに上昇しており、チューブに沿う方向の1.3 nmの範囲で化学組成感度あることが示されている。

生物学におけるTERSの応用

生物学分野のTERSの研究は、当初、核酸塩基やアミノ酸などの純粋成分が対象であった。通常の核酸塩基すべてについてチップ増強ラマンスペクトルが報告されており、非近接場スペクトルに比べ信号が増強された特徴的なピークを示している。ラマン信号をプラズモンにより増幅することで、ピコモルレベルの核酸塩基をラベルフリーで検出することが可能となる^[16]。またTERSの研究により核酸塩基の相違に基づく明確なシグネチャー(識別遺伝子)をRNAとDNAから検出できることも示され、直接、核酸シーケンシング(塩基配列決定)をラベルフリーで実現できる可能性が見出されている(Figure 3)。原理上、この手法は紫外線

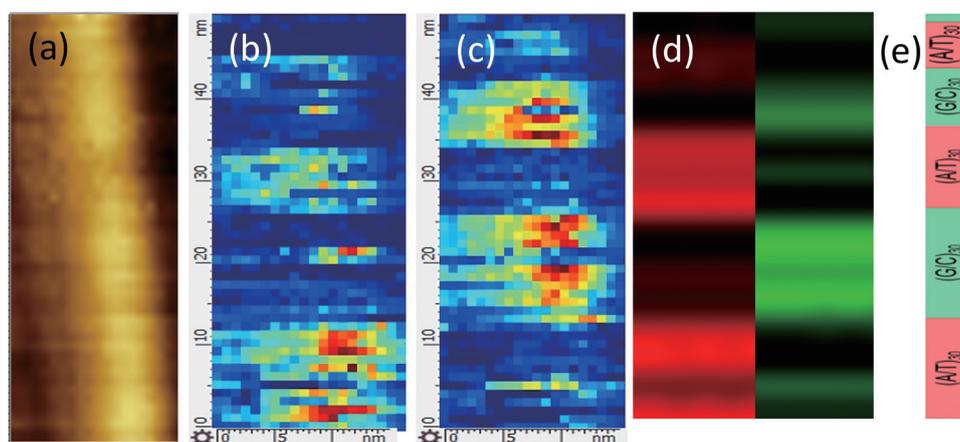


Figure 3 (a) AFM topography of engineered DNA, (b)-(c) corresponding TERS spectral mapping of over 50 × 20 nm² showing clear differentiation of spectral regions of pattern and size consistent with the expected (b) A/T and (c) G/C homopolymeric blocks, (d) horizontally averaged spectral map from the previous TERS maps, showing a good agreement with the (e) original sequence. (Data courtesy of Dr Noah Kolodziejski, Radiation Monitoring Devices.)

等の環境ストレスや遊離基等の代謝副産物によって生じうるDNAの化学修飾の検出に適用可能であり、これによってDNA修復機構について重要な理解がもたらされる可能性がある。シスチンおよびヒスチジンの単分子膜から得られたチップ増強ラマンスペクトルからそれらの表面に相異なるイオン化状態が存在することが明らかになり^[17]、このことがヒストン形成に関連している。同じような化学的特異性はタンパク質についても実証されている。シトクロムcのチップ増強ラマンスペクトルからは、アミノ酸および関連するヘム部分を示す明瞭なスペクトルに加え、これらの分子の向きの違いに起因する特性の違いも示された^[18]。これらの結果は、高感度ではあるが分析対象物から得られる情報が集合的であるSERSとは対照的であった。

さらに、神経変性疾患に関与する多タンパク質複合体であるアミロイド線維の表面分析研究にもTERSは応用された。その結果、原線維表面におけるアミノ酸組成と二次構造(コンフォメーション、立体構造)が解明されている。これによって、原線維の全体構造と比べてあまり理解が進んでいない原線維の表面構造の分析において、TERSのポテンシャルがはっきりと示された。最近ではTERSによってインスリン原線維の多形構造を識別する研究もされるようになってきているが、それも表面組成に基づいている。原線維多形体の違いによって毒性レベルが決まるため、それらの増殖機構がわかれば適切な阻害剤を設計できる可能性がある。ふたつのインスリン原線維多形体(「フラット型」と「ツイスト型」)の表面の化学組成がインスリンのプロトフィラメントの表面組成に関係することに基づいて、原線維成長過程においてこれらの多形体から増殖が進むことを特徴とするメカニズムが提唱されている^[19]。

複雑な生体システムへのTERSの応用

TERSは核酸やアミロイド原線維といった多成分試料に関する研究の他にも複雑な生体システム、例えばウイルスの表面、細菌、ヒト細胞などの生化学的組成の研究にも応用されてきた。タバコモザイクウイルスから取得されたチップ増強ラマンスペクトルは、ウイルス外被タンパク質とRNAからの明確な化学物質信号を示す。最近の研究で水痘帯状疱疹ウイルスと豚テッショウウイルスを区別するのにTERSが用いられたが、その際は2つのウイルスの表面のタンパク質と脂質の組成の違いが利用された^[20]。特に注目すべき点は、ヒト赤血球に含まれる膜タンパク質をチップと分析対象の両方を浸した水溶液中で検出したことである^[21]。この試みはまだ探求途上であるが、生体物質を自然環境下で分析することが可能であり、レーザー照射による温度上昇に伴う試料の分解や酸素の介在による光退色を最低限に抑えられるという利点がある。大型で、複雑、かつ不均質な細胞表面を対象とする場合、ナノメートルレベルの形状特性に関わる課題に直面する可能性がある。この対処

として、暗視野顕微鏡法により観察可能な抗体結合性ナノ粒子を標的とする手法が提案されている^[22]。この場合、細胞表面と抗原の間で起こる特殊な相互作用をTERSで探ることができる。この方法によって、損傷を受けていないきれいな細胞膜表面上でのインテグリン受容体の検出ができるようになった^[23]。

おわりに

TERSは特徴的な化学的信号をナノメートルレベルの分解能で取得する新技術であり、表面の化学状態や組成分析に適用できる。それゆえ、TERSは超高解像の化学イメージング技術と言える。さらに良く言えば、ラベルフリーの超高解像のイメージング技術でもある。本稿で述べた生物学的応用の進歩と同時に測定装置の設計も向上している。現在では、一点をTERS測定する装置としてではなく、試料表面の形状プロファイルとTERSハイパースペクトラルイメージング(スペクトル計測に基づくイメージング技術)とを組み合わせた装置として市販されている。空間分解能は当初50 nmだったが、現在は~10 nmも達成できている。最近では水溶液中での測定例も報告されており、元来の条件下における生体物質のラベルフリー検出という、TERSの可能性を実現するものとして期待される。

参考文献

- [1] "Nanoscale chemical analysis by tip-enhanced Raman spectroscopy", R. M. Stöckle, Y. D. Suh, V. Deckert, and R. Zenobi, *Chem. Phys. Lett.*, **318**, 131(2000).
- [2] "Improving resolution in quantum subnanometre-gap tip-enhanced Raman nanoimaging", Y. Zhang, D. V. Voronine, S. Qiu, A. M. Sinyukov, M. Hamilton, Z. Liege, A. V. Sokolov, Z. Zhang and M. O. Scully, *Scientific Reports*, **6**, 25788(2016).
- [3] "Nanoscale imaging and identification of a four-component carbon sample" E. Sheremet, R. D. Rodriguez, A. L. Agapov, A. P. Sokolov, M. Hietschold, D. R.T. Zahn, *Carbon*, **96**(2016)588-593.
- [4] "20-nm-Resolved Stress Profile in SiGe Nano-stripes Obtained by Tip-Enhanced Raman Spectroscopy", M. Chaigneau, G. M. Vanacore, M. Bollani, G. Picardi, A. Tagliaferri and R. Ossikovski, *Handbook of Enhanced Spectroscopy*, Chapter 13, (Pan Stanford Publishing 2014).
- [5] "Simultaneous topographical, electrical and optical microscopy of optoelectronic devices at the nanoscale", N. Kumar, A. Zoladek-Lemanczyk, A. A. Y. Guilbert, W. Su, S. M. Tuladhar, T. Kirchartz, B. C. Schroeder, I. McCulloch, J. Nelson, D. Roy and F. A. Castro, *Nanoscale*, **9**(8), 2723-2731 (2017).
- [6] "Side-illuminated tip-enhanced Raman study of edge phonon in graphene at the electrical breakdown limit", Y. Okuno, S. Vantasin, I. S. Yang, J. Son, J. Hong, Y. Y. Tanaka, Y. Nakata, Y. Ozaki, N. Naka, *Appl. Phys. Lett.*, **108**, 163110(2016).
- [7] "Preparation of gold tips suitable for tip-enhanced Raman spectroscopy and light emission by electrochemical etching", B. Ren, G. Picardi, B. Pettinger, *Rev. Sci. Instruments.*, **75**, 837-841 (2004).
- [8] "Enhancement of Raman signals with silver-coated tips.", B. S. Yeo, W. Zhang, C. Vannier, R. Zenobi, *Appl. Spectrosc.*, **60**(10), 1142-1147(2006).
- [9] "Highly reproducible tip-enhanced Raman scattering using an oxidized and metallized silicon cantilever tip as a tool for everyone", N. Hayazawa, T. Yano, S. Kawata, *Journal of Raman Spectroscopy*, **43**(9), 1177-1182(2012).
- [10] "The controlled fabrication of "Tip-On-Tip" TERS probes", Y. Yang, Z. Y. Li, M. Nogami, M. Tanemura, Z. Huang, *RSC Advances*, **4**(9), 4718-4722(2014).
- [11] "Rational fabrication of a gold-coated AFM TERS tip by pulsed electrodeposition", L. K. Yang, T. X. Huang, Z. C. Zeng, M. H. Li, X. Wang, F. Z. Yang, B. Ren, *Nanoscale*, **7**(43), 18225-18231 (2015).
- [12] "Facile Fabrication of Spherical Nanoparticle-Tipped AFM Probes for Plasmonic Applications", A. Sanders, L. Zhang, R. W. Bowman, L. O. Herrmann, J. J. Baumberg, *Particle & Particle Systems Characterization*, **32**(2), 182-187 (2015).
- [13] "Nano-Raman spectroscopy with metallized atomic force microscopy tips on strained silicon structures", L. Zhu, C. Georgi, M. Hecker, J. Rinderknecht, A. Mai, Y. Ritz and E. Zschech, *J. Appl. Phys.*, **101**(10), 104305(2007).
- [14] "Optical antennas for tunable enhancement in tip-enhanced Raman spectroscopy imaging", I. Maouli, A. Taguchi, Y. Saito, S. Kawata, P. Verma, *Applied Physics Express*, **8**(3), 032401(2015).
- [15] "Tuning Localized Surface Plasmon Resonance in Scanning Near-Field Optical Microscopy Probes", T. L. Vasconcelos, B. S. Archanjo, B. Fragneaud, B. S. Oliveira, J. Riikonen, C. Li, D. S. Ribeiro, C. Rabelo, W. N. Rodrigues, A. Jorio, C. A. Achete, L. G. Cancado, *ACS Nano*, **9**(6), 6297-6304(2015).
- [16] "Tip-enhanced Raman spectra of picomole quantities of DNA nucleobases at Au(111)", K. F. Domke, D. Zhang, and B. Pettinger, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 6708(2007).
- [17] "Spectroscopic imaging of biological samples using near-field methods", L. Langelüddecke, T. Deckert-Gaudig, and V. Deckert, *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*, Chapter 11, Wiley-VCH, (2014).
- [18] "Tip-enhanced Raman spectroscopy can see more: The case of cytochrome C", B-S. Yeo, S. Mädlar, T. Schmid, W. Zhang, and R. Zenobi, *J. Phys. Chem. C* **112**, 4867(2008).
- [19] "Surface characterization of insulin protofilaments and fibril polymorphs using tip-enhanced Raman spectroscopy(TERS)", D. Kurouski, T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, and I. K. Lednev, *Biophys. J.* **106**, 263(2014).
- [20] "A manual and an automatic TERS based virus discrimination", K. Olschewski, E. Kämmer, S. Stöckel, T. Bocklitz, T. Deckert-Gaudig, R. Zell, D. Cialla-May, K. Weber, V. Deckert, and J. Popp, *Nanoscale*, **7**, 4545(2015).
- [21] "Tip-enhanced Raman spectroscopy - Its status, challenges and future directions", B-S. Yeo, J. Stadler, T. Schmid, R. Zenobi, and W. Zhang, *Chem. Phys. Lett.* **472**, 1(2009).
- [22] "Tip-enhanced Raman detection of antibody conjugated nanoparticles on cellular membranes", K. D. Alexander and Z. D. Schultz, *Anal. Chem.* **84**, 7408(2012).
- [23] "TERS detection of $\alpha_v\beta_3$ integrins in intact cell membranes", H. Wang and Z. D. Schultz, *Chem. Phys. Chem.* **15**, 3944(2014).

**Marc CHAIGNEAU**

AFM/Raman Product Manager
Sales & Marketing Division
HORIBA FRANCE SAS
Ph.D.

**Maruda SHANMUGASUNDARAM**

Application Scientist
HORIBA Instruments Inc.

**Fran ADAR**

Raman Principal Scientist
HORIBA Instruments Inc.
Ph. D.