

Feature Article

堀場雅夫賞 受賞者論文

Masao Horiba Award

表面増強ラマン散乱の電磁増強機構の実証と生細胞表面タンパク質の単分子リアルタイム検出への応用 Clarification of Surface Enhanced Raman Scattering Mechanism and its Application to Real-time Analysis of Bio-related Molecules on Living Cells

伊藤 民武

Tamitake ITOH

細胞内や表面の多様な分子をリアルタイムで単分子分析するには、高感度でかつ分子識別能が高い手法が要求される。ラマン散乱分光では分子官能基の微細構造を反映したスペクトルが得られるため高い分子識別能を有する。しかし、感度が低いという問題がある。表面増強ラマン散乱(Surface Enhanced Raman Scattering : SERS)では、金や銀のナノ粒子に吸着した単分子のラマン散乱が計測できるためこの感度の問題を解決できる。SERSの問題点として、その機構が不確かなため、実用化への開発指標が得られないことが挙げられる。そこで本研究では、SERS機構の解明と細胞表面SERSリアルタイム分析への応用を行った結果を述べる。

Real-time analysis of bio-molecules of living cells requires sensitivity and high molecular discrimination ability for the methodology. Raman spectroscopy provides vibrational spectra reflecting detailed molecular structures. Thus Raman spectroscopy satisfies the high discrimination ability. However, a problem of Raman spectroscopy is its low sensitivity. Research of Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) has been carried out to resolve the problem. SERS occurs to the molecules on Au and Ag nanoparticle (NP) surfaces. Enhancement of SERS enables us single molecule detections. The important issue of SERS is unclearness of its enhancement mechanism. The unclearness prevents us from development of practical applications of SERS. Thus, in the present studies I carried out (1) Clarification of SERS mechanism and (2) Demonstration of application of SERS to real-time analysis of bio-molecules on living cells.

はじめに

細胞は多様なタンパク分子の相互作用でその生命機能を維持している^[1]。一細胞当たりのタンパク分子の発現量は通常は微量であり、また細胞周期とともに変化する。従って、細胞に発現しているタンパク分子をリアルタイム分析するための課題として次の3点が挙げられる。一つめは高精度な分子の識別能、二つめは単一分子レベルの高感度、3つめは測定の実験性と迅速性である。分光を用いた分子識別法はその簡便性、迅速性において他の

手法より優れている点が多い。従って、顕微分光法を用いてこれらの課題を解決し細胞発現タンパク分子のリアルタイム分析を目指す研究が盛んに行われている^[2]。そのための代表的な分光法として蛍光分光、可視紫外吸収分光、赤外吸収分光、ラマン散乱分光が挙げられる。蛍光と可視紫外吸収のスペクトルはブロードで単純な構造であるため生体分子を識別する能力は高くはない。蛍光分光は単分子感度を有するが、被識別分子に蛍光分子を結合させるという前処置が必要となる。また、蛍光エネルギー移動が起きるため複数種の分子の多重識別には

困難が伴う。赤外吸収とラマン散乱では、分子振動を反映してスペクトルは複雑な構造となり分子を識別する能力は高いが、蛍光法に比べ非常に感度が低いという問題点がある。例えば、ラマン散乱は、その断面積は約 10^{-29} cm^2 であり、この値は蛍光断面積の値、 $\sim 10^{-16} \text{ cm}^2$ と比べ10桁以上小さい。赤外吸収分光には水中に存在する分子に適用できないという問題点もある。これらの各問題点を整理すると、ラマン散乱の高感度化という解決法が導かれる。SERSはこの解決法の有効な候補である。SERSはラマン散乱の一種であるため高い分子識別能力を持ち、更に、ラマン散乱分光には無い高い感度を持つ。SERSは1977年にFleischmannによって銀電極に吸着したピリジン分子のラマン散乱強度の異常増強として発見された^[3]。1997年にKneipp, Nieは金や銀ナノ粒子2量体の間隙に色素分子が吸着した場合、ラマン散乱強度が 10^{14} 倍も増強されることを発見した^[4]。この増強は実効的なラマン散乱断面積が約 10^{-15} cm^2 、つまり蛍光断面積とほぼ等しくなったことを意味する。つまり分子識別能力が高く単分子感度の分光法の可能性を示している。1997年の単分子SERSの発見以来、SERS分野のアクティビティーが指数関数的に向上している。具体的には、2010年のSERS関連論文数は1340件と2000年の10倍に達している (ISI Web of Knowledgeの検索結果)。しかし、SERSはその発見以来続いている強度やスペクトルの揺らぎ、再現性の低さという問題を抱えているため、今後、死の谷に入っていくと予想される。この問題の原因は、SERSが最適化されておらず不安定な状態で分光測定を行っていることと考えられる。そこで、このSERSの問題を解決するために現在いくつかの方法が提案されている。一つは蛍光タグと同じ原理で、安定した色素のSERSスペクトルで抗原抗体反応などを検出する方法^[5]、二つめは不均一なコロイド系ではなく、電子線リソグラフィーなどで基板表面に均一に造られたナノ形状体を用いて、吸着分子のSERSスペクトルを平均測定する方法^[6]、三つめは、ランダムに吸着した分子を測定するのではなく、金属チップ先端を選択的に分子に近接させチップ増強ラマン散乱 (TERS) スペクトルを測定する方法である^[7]。しかし、これらのナノ形状体やチップにおいて、SERSの増強因子を最大化する普遍的な指標がないことが依然として問題として存在している。従って、著者はこの普遍的な指標を明らかにするためSERS機構解明に取り組み、その上で生細胞リアルタイム分析へのSERS応用を行った。

SERS電磁増強機構

SERS発現機構として電磁増強と化学増強が理論として提案されている^{[8], [9]}。電磁増強とは、金属ナノ粒子のプラズモンと共鳴し増強された光電場が、吸着分子と相互作用しラマン散乱強度が増大するという機構である^[8]。化学増強とは、金属表面に吸着した分子の電子準位が電荷移動相互作用によって安定化し励起光と共鳴することでラマン散乱強度が増大されるという機構 (つまり電荷移動共鳴ラマン散乱=SERS) である^[9]。電磁増強と化学増強は多くの研究によって検証され、両方を支持する実験結果が数多く報告されている。この結果はSERS発現機構解明を複雑にする要因となっている。従って、SERS機構解明に重要なことは、ある理論に着目し、その理論の因果関係の枠内で定量的にSERSを検証し、支配的な理論か否かを検証することになる。化学増強が電荷移動錯体形成を前提とするのに対し、電磁増強は原理的に全ての分子に働くので分子種に依存しない普遍性がある。従って、著者は電磁増強に着目しSERS機構解明の研究を行うことにした。電磁増強とは、プラズモンによるラマン励起効率とラマン散乱効率の増強である^[10]。励起光が金属ナノ粒子に入射すると励起光とプラズモンとの共鳴で生じた光増強場によって吸着分子のラマン励起効率が向上する (1段目の増強)。次に、吸着分子に発生したラマン散乱光とプラズモンの共鳴によるラマン散乱効率の向上が生じる (2段目の増強)。2段目の増強は、真空中に配置した励起分子からは、放射されないラマン散乱光がプラズモン共鳴という新しい経路を通ることで放射可能となるとも言える。この2重の効率向上によってSERSの増強因子 $M_{EM}(\lambda_L, \lambda, r)$ は式1の様に記述できる。

$$M_{EM}(\lambda_L, \lambda, r) = |E_{loc}(\lambda_L, r)/E_1(\lambda_L)|^2 \times |E_{loc}(\lambda, r)/E_1(\lambda)|^2 \dots \dots (1)$$

ここで、 E_{loc} はプラズモンと結合し増強した光電場振幅、 E_1 は増強が無いときの光電場振幅、 λ_L と λ は励起光と放射光の波長、 r は分子の吸着位置をそれぞれ示す。式1を実験的に検証することで電磁増強の検証が可能となる。

単一ナノ粒子分光によるSERS電磁増強の検証

従来の電磁増強研究の問題点と著者の解決法を述べる。従来の研究では、金属ナノ粒子の集団系を測定対象としてきたため金属ナノ粒子ごとのプラズモン共鳴スペクト

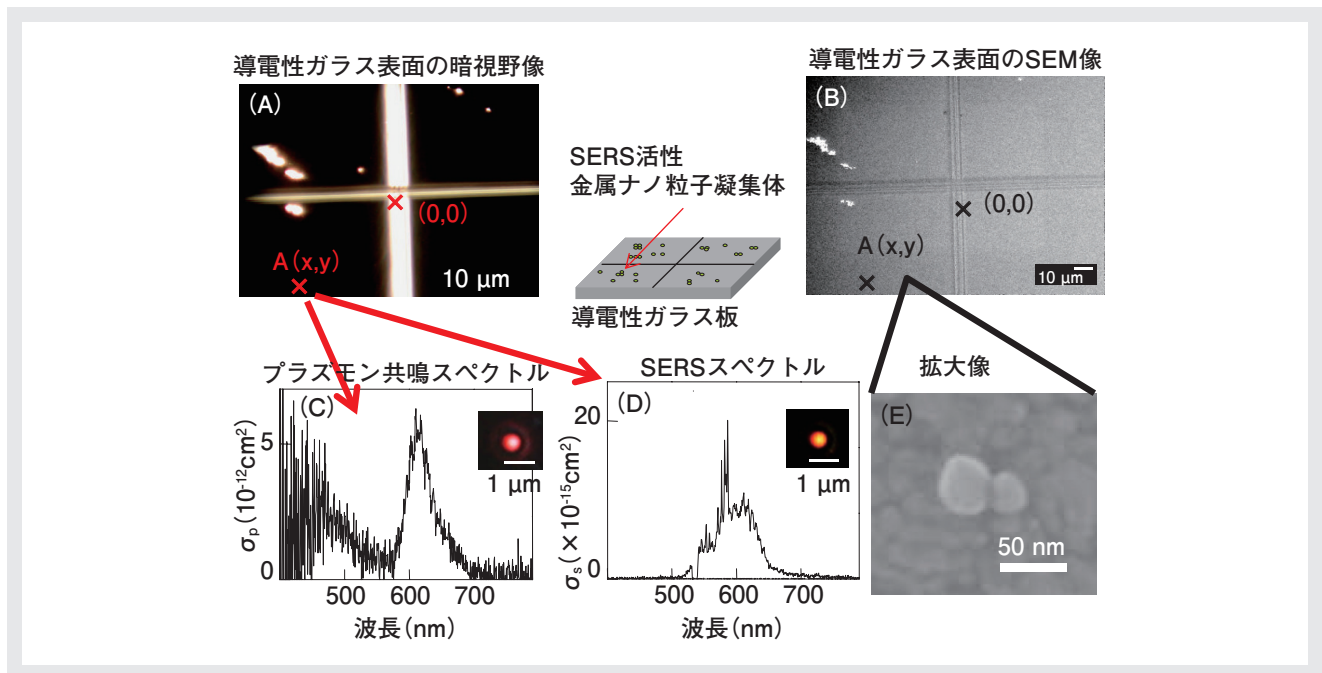


図1 導電性ガラス表面に配置した金属ナノ粒子凝集体(A(x,y))を白色光で暗視野照明しプラズモン共鳴光散乱像(A)を観察し、レーザー光を同じ凝集体に照射しSERS像(B)を観察した。光学像面にピンホールを設置することで単一金属ナノ粒子凝集体のプラズモン共鳴スペクトル(C)とSERSスペクトル(D)を測定した。その金属ナノ粒子凝集体を走査型電子顕微鏡(SEM)測定し凝集体形状(E)を測定した。

ルのバラつきが原因となり、SERSと「SERSを引き起こしている」プラズモン、そして「プラズモンを規定している」金属ナノ粒子形状との関係を捉えることが出来なかった。つまり電磁増強が想定している「SERS, プラズモン共鳴, 金属ナノ粒子形状」という因果関係の特定が出来なかった。その結果、電磁増強を定量的に検証できずにいた。著者はこの問題点を単一の金属ナノ粒子についてSERS, プラズモン共鳴, そして形状を測定する手法を確立することで解決した^[11]。

図1を用いてSERS増強機構の検証法を説明する。金属ナノ粒子として、単分子SERS測定に実績がある平均直径約40 nmの銀ナノ粒子を用いた。プラズモン共鳴は導電性ガラス表面に配置した銀ナノ粒子を白色光で暗視野照明し弾性光散乱像として観察した。そして、レーザー光を同じ銀ナノ粒子に再度照射しSERS像を観察した。光学像面にピンホールを設置することで選択的に単一銀ナノ粒子のプラズモン共鳴光とSERS光を分光測定した。そして、導電性ガラス表面の銀ナノ粒子の形状は、走査型電子顕微鏡(SEM)で測定した。これら一連の測定によって、単一ナノ粒子の「プラズモン共鳴, SERS, 銀ナノ粒子形状」の取得に成功し電磁増強が想定している因果関係の輪の中で、電磁増強の定量的検証を可能とした。この検証において重要な点は、双極子型のプラズモン共鳴

を有する銀ナノ粒子2量体を選択したことである。理由は、2量体近傍の電磁場は既存の電磁場解析で取り扱いが可能であり、2量体接点からSERS光が放射されることが実験的に確かめられているからである^[12]。次に電磁増強の評価法を説明する。図2(a)がSERS活性を有する銀ナノ粒子2量体のSEM像、図2(b)と図2(c-e)がその2量体のプラズモン共鳴と3種類の励起波長でのSERSスペクトルである。図2(g)が図2(a)の2量体の形状を境界条件(図2(f))としてFDTD(Finite Difference Time Domain)という電磁場解析法で計算したプラズモン共鳴スペクトルである。図2(h-j)にラマン散乱スペクトルと3種類の励起波長での電磁増強因子とを掛け合わせることで再現したSERSスペクトルを示す。実験と計算のSERSスペクトルを偏光特性^[13]、プラズモン共鳴Q値依存性^[14]、プラズモン共鳴波長依存性^[15]、分子共鳴波長依存性^[16]、励起波長依存性^[17]、周辺屈折率依存性^[18]、形状依存性^[11]について定量的に比較した。これらの計算スペクトルは、数倍の誤差の範囲で実験スペクトルと一致していた。この誤差は最大14桁に及ぶSERSの増強因子からすれば無視可能な程度である。従ってこの定量的一致は電磁増強がSERSを支配する増強因子であることを示している。この再現は、SERS発見以来30年以上の間の懸案だった増強機構を実証した成果であり、研究者がSERS増強因子を

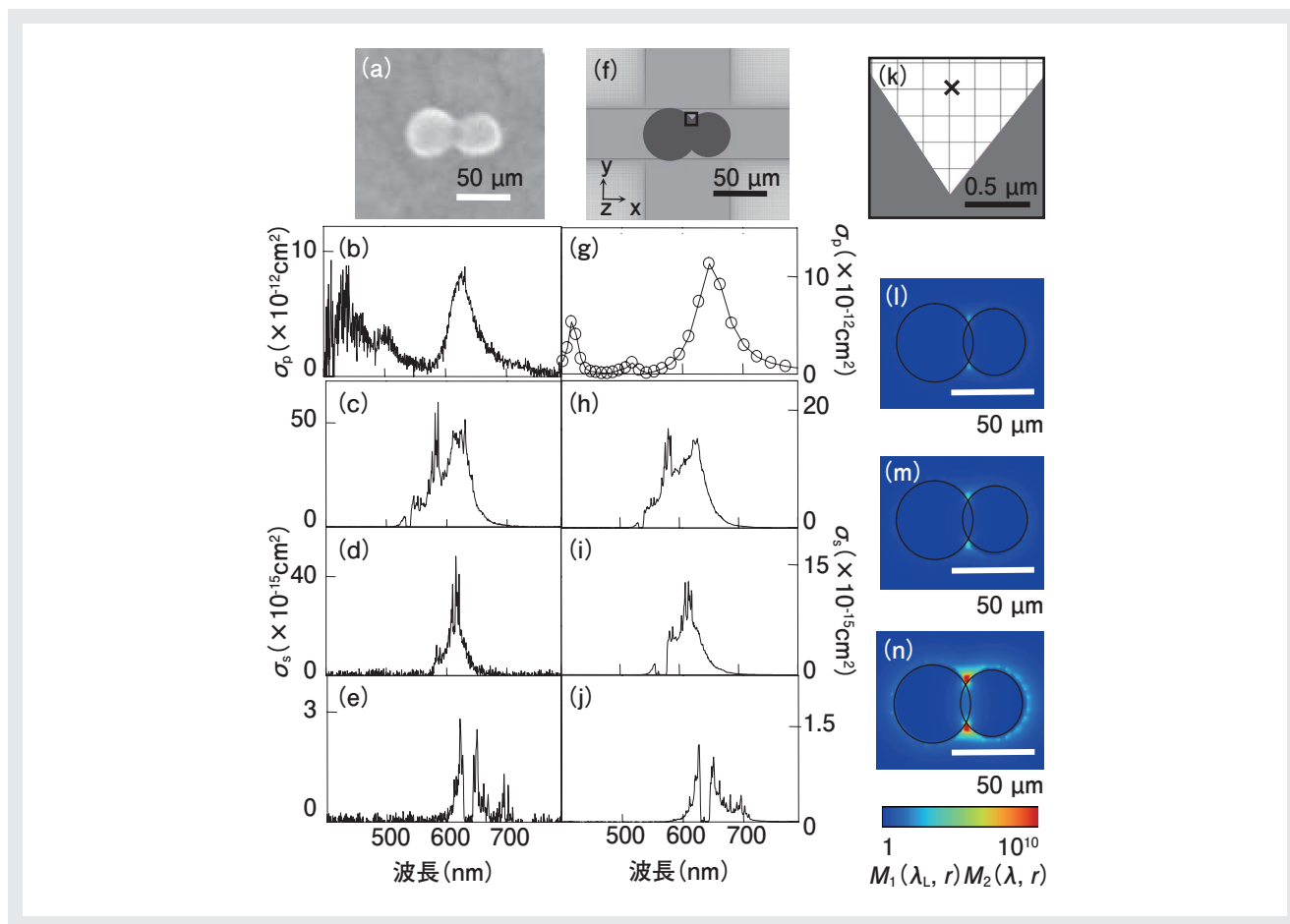


図2 SERS活性を有する金属ナノ粒子2量体のSEM像(a), その凝集体のプラズモン共鳴(B)とSERSスペクトル(c-e)。FDTD (Finite Difference Time Domain) という電磁場解析法の境界条件(f)で再現したプラズモン共鳴スペクトル(g)。分子の吸着位置(k)。式1に従いラマン散乱スペクトルと電磁場因子とを掛け合わせることで理論的に再現したSERSスペクトル(h-j)。各励起波長における電場の分布(l-n)。

最大化する普遍的な理論を得たことを意味している。

SERS生体分子分析の重要性

現在までのSERS応用の進捗が少ないのは、その増強機構が不明瞭だっただけでなく、SERSのキラーアプリケーションが発見されていないことも挙げられる。この発見には多くの試行錯誤が必要となる。著者は、キラーアプリケーションの創出される「場」として細胞表面を予想している。細胞表面には不均一に多種類のタンパク質が発現し細胞の生命機能を支えている^[1]。SERSでこれらのタンパク質を多重識別できれば細胞診断などの基礎、応用研究に大いに貢献すると考えられる。現在、下村博士がノーベル化学賞を受賞したGFPに代表されるように、蛍光法を使って細胞タンパク質の機能を生きたままで可視化し解明する研究が進んでいる^[19]。しかし、蛍光法には、(1)既知で標識可能な分子のみに限定され、(2)蛍光標識分子の退色、(3)多重染色の困難さなどの課題がある。SERSの非標識、非退色、多重測定の容易さなどの特徴

は、これらの課題を解決可能とするため、革新的な研究の進展をもたらすことが期待される。現在までのSERSを用いた細胞タンパク質の研究の進捗が少ないのはSERSでどの種類のタンパク質を測定しているか特定できないことが理由であった。そこで著者はゲノムが解読され、多くの発現タンパク質が既に識別されている酵母菌 (*Saccharomyces Cerevisiae*) をモデル細胞として表面タンパク質分子のSERS測定を試みた^{[20], [21]}。

単一酵母菌表面のSERS分光分析

生きた酵母菌の表面に銀ナノ粒子(平均直径40 nm)を自然吸着させてレーザー光(波長532 nm)を照射し発光像を観測した。図3(a, b)は銀ナノ粒子吸着前後の白色光の暗視野照明像である。プラズマ共鳴の発色により銀ナノ粒子が酵母菌表面へ吸着していることが確認できる。酵母菌表面と銀ナノ粒子表面の平均電荷は共にマイナスであり反発し合うため、銀ナノ粒子は酵母菌表面の親和性が高い場所を選択的に吸着していると考えられる。図3(c)

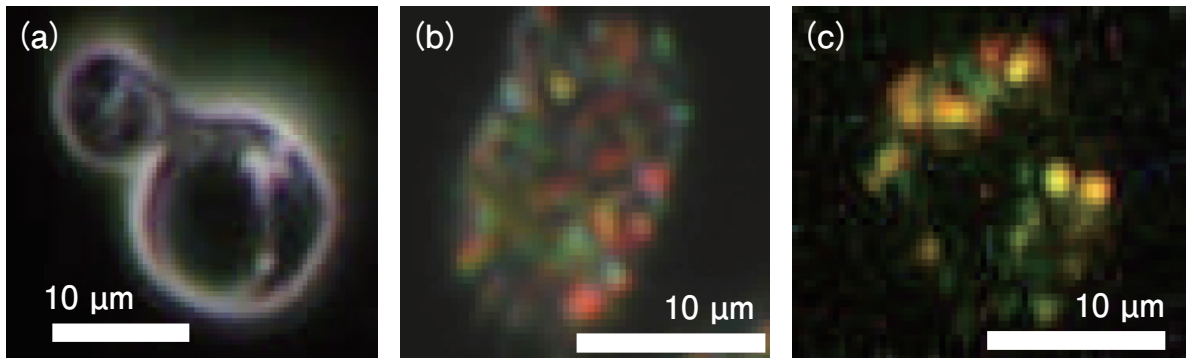


図3 銀ナノ粒子吸着前(a)後(b)の酵母菌の暗視野照明顕微鏡像。銀ナノ粒子のプラズモン共鳴散乱によって菌表面に様々な色の輝点が現れている。(c)酵母菌のSERS顕微鏡像。一つ一つの輝点が単一分子からのSERS光である。

はレーザー光励起(波長532 nm)による酵母菌の発光像である。多数の輝点が観測できる。図4はその発光点1つ1つの分光測定結果である。そのスペクトル形状からこの発光はSERSであることがわかる。酵母菌表面には、タンパク質や多糖類など様々な分子が存在している^[22]。

図4のSERSスペクトルには、アミド基に起因する分子振動バンドが多く確認できた。これらのバンドはタンパク質に特有で、多糖類には余り現れない。従って、このSERSスペクトルは酵母菌表面のタンパク質分子からのものだと考えられる。従来の平均的な細胞のラマン測定レーザー照射条件(照射光強度 $\sim 10^5$ W/cm², 測定時間 ~ 300 s)

に比べて、今回の照射条件(10 W/cm², 1秒)は、遥かに微弱で短時間であり菌にとってマイルドであった。図5はSERSを示している菌表面の原子間力顕微鏡(AFM)像である。多くの銀ナノ粒子が、2量体を形成し菌表面に吸着していることが確認できる^[20]。電磁増強機構ではこの様な2量体接点の約1 nm³の領域で単分子SERSが観測可能になる^[10-12]。実際、この接点に入り込めるタンパク質分子は1個程度である。従って、図4は2量体接点に入り込んだ単分子のSERSスペクトルだと予想できる。この様な系では電磁増強が2量体接点の1 nm³に局在するため熱揺らぎによる分子の数オンゲストロームの位置変化に

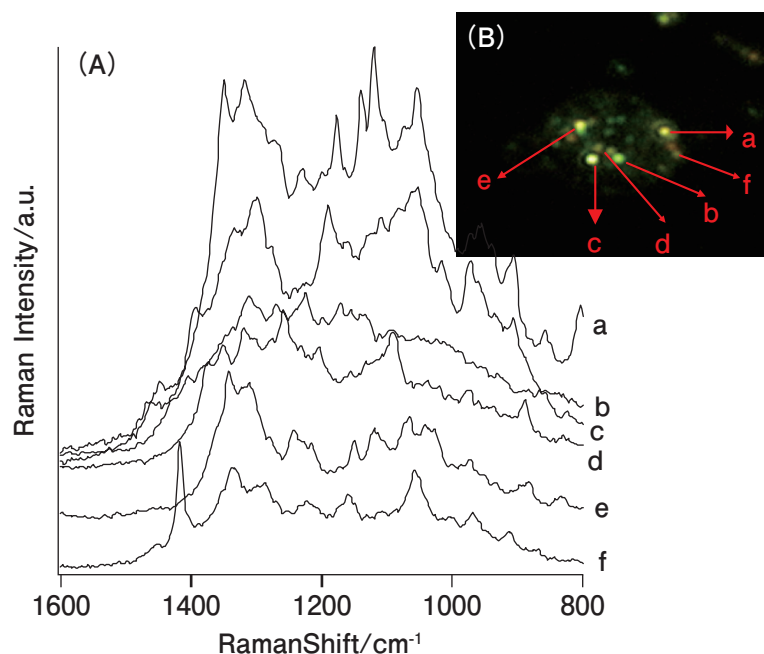


図4 酵母菌表面の各輝点からのSERSスペクトル(A)と銀ナノ粒子自然吸着後の酵母菌表面のSERS像(B)。(A)のスペクトルaからfは(B)の輝点からaからfに対応。

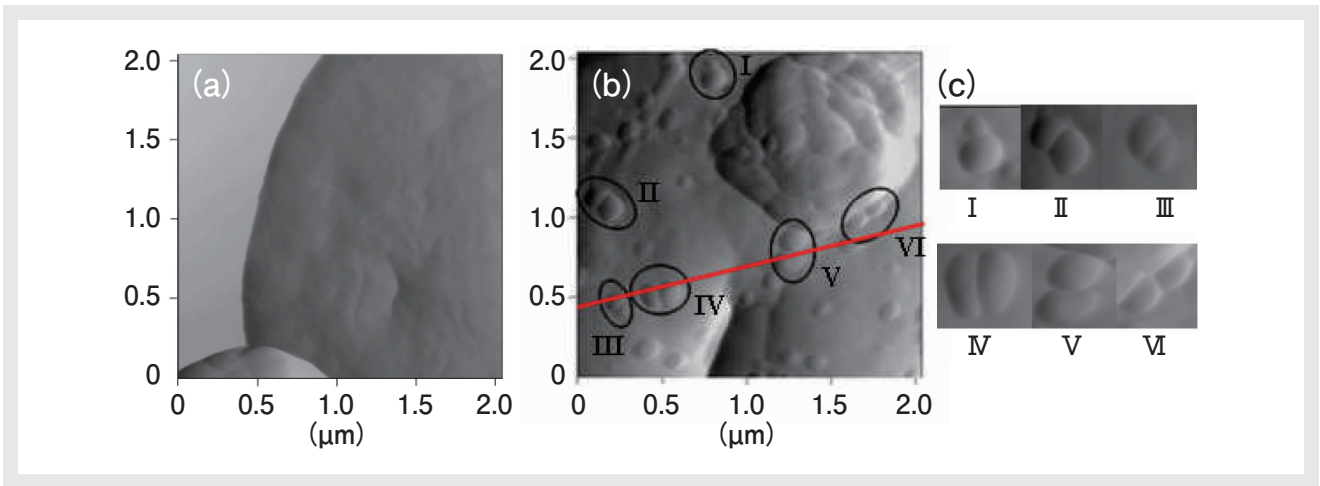


図5 銀ナノ粒子を自然吸着以前の酵母菌表面(a)と自然吸着後の酵母菌表面(b)のAFM像。銀ナノ粒子の吸着が確認できる。自然吸着した銀ナノ粒子の拡大像(c)。銀ナノ粒子が2量体を形成していることが分かる。(b)のIからVIIは(c)のIからVIIに対応。

よってSERS光の大きな強度変化(点滅現象)が生じることが知られている^[14]。

実際、図4(B)のSERS輝点も頻繁に点滅現象を示した^[20]。図6は様々な細胞周期における酵母菌のSERS像である。SERS発現と細胞周期との間に関係があることがわかる。親細胞から出芽直後の娘細胞にはSERS輝点が現れていない。しかし、娘細胞が成長し細胞質の分裂が起きると同時に娘細胞にもSERS輝点が出現している。酵母菌表面のタンパク質研究からこの様な発現挙動を示すタンパク質は数種類知られている^[23]。著者は酵素法やアルカリ溶出法による表面タンパク質の選択的切断解離やソックアウト法とSERS発現との比較を行うことで、このタンパク質の特定を試みた。その結果、このタンパク質がPirという熱応答に関与する表面タンパク質の一種であることが分かってきた。本研究はSERSを用い細胞周期に依存した細胞表面発現タンパク質分子の分析を成功させた世界初の結果である。

終わりに

本論文ではSERS増強機構を電磁増強理論に基づき検証した。単一ナノ粒子分光法を用い電磁増強の因果関係、即ち、「金属ナノ粒子形状、プラズモン共鳴、SERS」の関係を因果関係の輪の中で電磁増強を用い検証し、SERSを定量的に再現できることを示した。この結果は、SERS発見以来の懸案だった増強機構を解明した重要な成果である。また、SERSのキラーアプリケーション探索のため細胞表面タンパク質のSERS観察を行った。観察の結果、細胞周期に依存した細胞表面発現タンパク質分子のSERS分析に成功した。この成果は細胞表面がSERSのキラーアプリケーションの「場」となる可能性を示唆している。

著者は今後、SERS増強機構の研究は「プラズモンと分子との強結合」の研究に展開していくと予想している。強結合によりプラズモンと分子とがコヒーレントにエネルギー

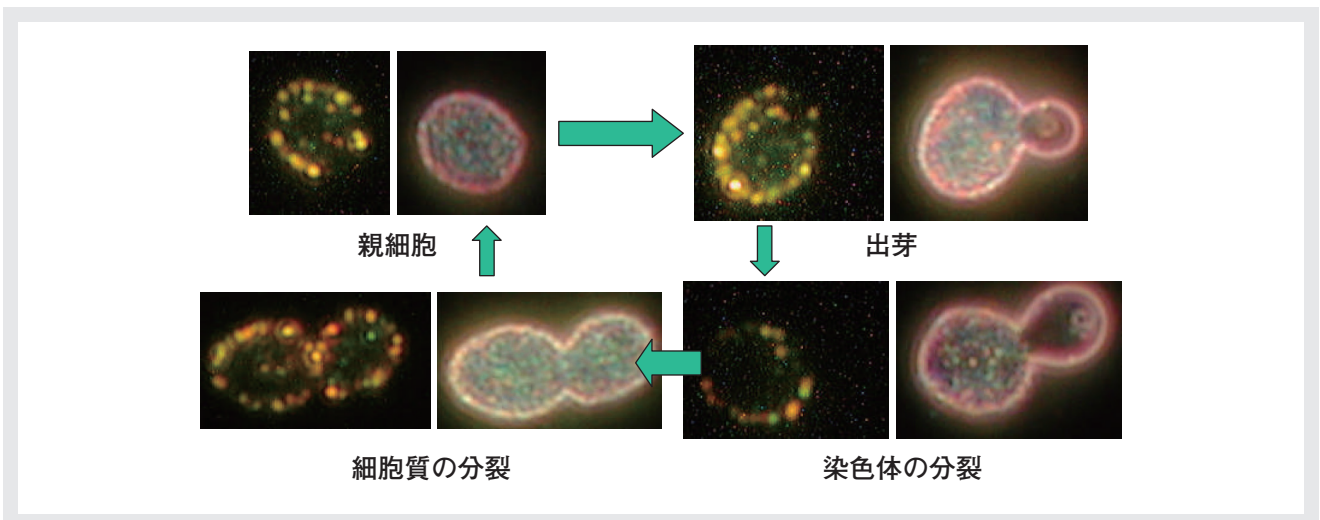


図6 各出芽細胞分裂周期における銀ナノ粒子の吸着状態(各パネルの右図)とSERS発現状態(各パネルの左図)の変化。

を交換し新しい量子状態が形成される。この分野は量子電磁力学(QED)と言われる。この分野でSERS研究は、ナノ領域での単分子量子状態制御技術として展開するかもしれない。

SERSのキラードアプリケーション探索の研究の今後は予想できない。しかし、トライ アンド エラーの自由度が高い研究の枠組みが求められるだろう。著者は現在、細胞表面タンパク質のSERS観察の適応範囲を、病原性細菌である大腸菌(*Escherichia Coli* JM109)やピロリ菌(*Helicobacter Pylori*)の分析・識別、糖尿病指標分子である糖化ヘモグロビン(HbA1c)の超高感度識別などに拡張しキラードアプリケーションの探索を続けている^[24-26]。

参考文献

- [1] J-L. Popot and D.M. Engelman. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 881 (2000).
- [2] A. K.Kenworthy, M. Edidin, *Methods in molecular biology* **116**, 37 (1999).
- [3] M. Fleischmann *et al.* *Chem. Phys. Lett.* **26**, 163 (1974).
- [4] K. Kneipp *et al.* *Phys. Rev. Lett.* **78**, 1667 (1997). S. Nie and S. Emory, *Science* **275**, 1102 (1997).
- [5] J. P. Xie *et al.*, *ACS NANO* **2**, 2473-2480 (2008).
- [6] J. F. Li, *et al.*, *Nature* **464** (2010) 392; E. M. Hicks *et al.* *Nano Lett.* **5**, 1065 (2005); and K. Ueno, *et al.*, *Adv. Mater.* **20**, 26 (2008).
- [7] B. Pettinger *et al.* *Phys. Rev. Lett.* **92**, 096101 (2004); T. Ichimura *et al.* *Phys. Rev. Lett.* **92**, 220801 (2004); and E. Bailo and V. Deckert, *Chem. Soc. Rev.* **37**, 921 (2008).
- [8] M. Moskovits, *Rev. Mod. Phys.* **57**, 783 (1985).
- [9] J. R. Lombardi, *et al.*, *J. Chem. Phys.* **84**, 4174 (1986).
- [10] D. Wang and M. Kerker, *Phys. Rev. B*, **24**, 1777 (1981); M. Inoue, K. Ohtaka, *J. Phys. Soc. Jpn.* **52**, 3853 (1983); and P. Johansson, *et al.*, *Phys. Rev. B* **72**, 035427 (2005).
- [11] K. Yoshida, T. Itoh, *et al.* *Phys. Rev. B* **81**, 115406 (2010); T. Itoh *et al.*, *J. Photochem. Photobio. A* **219**, 167 (2011).
- [12] K. Imura *et al.*, *Nano Lett.* **6**, 2173 (2006).
- [13] T. Itoh *et al.*, *Appl. Phys. Lett.* **83**, 2274 (2003).
- [14] T. Itoh *et al.*, *J. Chem. Phys.* **124**, 134708 (2006).
- [15] T. Itoh *et al.*, *Phys. Rev. B* **76**, 085405 (2007).
- [16] K. Yoshida, T. Itoh *et al.*, *Phys. Rev. B* **79**, 085419 (2009).
- [17] T. Itoh *et al.*, *Chem. Phys. Lett.* **389**, 225 (2004).
- [18] K. Yoshida, T. Itoh *et al.*, *Appl. Phys. Lett.* **95**, 263104 (2009).
- [19] O. Shimomura *et al.*, *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**, 223 (1962).
- [20] A. Sujith, T. Itoh *et al.*, *Appl. Phys. Lett.* **92**, 103901 (2008).
- [21] A. Sujith, T. Itoh *et al.*, *Anal. Bioanalchem.* **394**, 1803 (2009).
- [22] P. N. Lipke and R. Ovalle, *J. Bacteriol.* **180**, 3735 (1998).
- [23] P.W. De Groot *et al.*, *Fungal Genet. Biol.* **42**, 657 (2005) and A Toh-e *et al.*, *Yeast* **9**, 481 (1993).
- [24] Y. Kitahama, T. Itoh *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (inpress)
- [25] H. Kudo, T. Itoh *et al.*, *J. Photochem. Photobio. A* **221**, 181 (2011)
- [26] M. S. Kiran, T. Itoh *et al.*, *Anal. Chem.* **82**, 1342 (2010).



伊藤 民武

Tamitake ITOH

独立行政法人産業技術総合研究所 主任研究員
工学博士