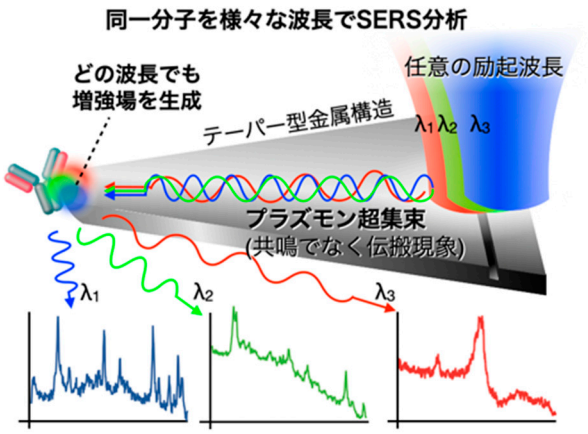
190　共鳴フリーSERS分析法の創出とタンパク質機能の解明	馬越　貴之

【目的】生体分子の化学結合状態を 1 分子レベルで分析・理解することは、生命科学において基礎的かつ重要なトピックである。1 分子化学結合分析には、金属ナノ構造上での局在プラズモン共鳴現象で生成する増強電場が有効である（SERS 分析法）。分子 1 つからでも分子結合に由来するラマン散乱光を検出できるため、生命科学のみならず様々な分野で用いられてきた。しかしながら、文字通り特定波長でのみ起こる現象であるため、動作波長が限られるという課題を抱えていた。様々な波長で同一分子を 1 分子 SERS 分析できれば、化学結合を網羅的に検出することができるようになる。本研究では、共鳴フリーなプラズモン超集束という現象を用いることによって、革新的な波長の自由度を持つ新規 1 分子 SERS 分析法を創出することを目的とした。プラズモン超集束は、テーパー型金属構造上を伝播するプラズモンによって先端に増強電場を生成する現象である。プラズモンの共鳴ではなく伝播に立脚した共鳴フリーな現象であるため、極めて広帯域に動作すると考えた。本技術を用いれば、生体分子を 1 分子レベルで波長スクリーニングして網羅的に化学結合分析できるため、分子内の結合状態を極めて詳細に解明できるようになる。

【方法】まずは、電磁場シミュレーションを用いて、共鳴フリーSERS 分析法に最適なテーパー型金属構造を模索した。金属の種類やテーパー構造の角度、膜厚など網羅的に計算した。また、実際に電子ビームリソグラフィでテーパー構造を作製し、実験的にも所望の特性が得られていることを確認した。テーパー構造の最適化の後、高波長自由度 SERS 分析装置の開発に取り組んだ。442 nm～785 nm にわたる様々な波長を同時入射、同時検出できる系を構築した。テーパー構造先端からのみのラマン散乱光を検出するため、共焦点系も導入した。また、開発途中で、構造的なドリフトによって、安定的に計測が行えない事案も見出したため、高安定化ステージなどを導入し、装置の安定化も図った。ある程度装置が完成した後、実際に色素分子を用いて高波長自由度 SERS 分析装置の特性を評価した。様々な波長で同一分子を計測するだけでなく、その計測感度や速度、安定性なども評価した。

【結果】電磁場シミュレーションより、532 nm、633 nm、785 nm などの比較的長波長な可視光では、テーパー構造の材料として銀を用いた方が良いことを見出した。一方で、442 nm など短波長も同時に用いる場合はアルミニウムが適していた。実験的にも、同様の結果を得ることができた。次に、上記に示した通り、442 nm、488 nm、532 nm、633 nm、785 nm の波長を同時に照射できる高波長自由度 SERS 分析装置の構築に成功した。有機分子 4-aminothiophenol を試料として、実際に同一分子を多波長で SERS 分析することに成功した。また、波長に応じて異なるラマンスペクトルが得られており、より詳細な分析が可能であることを示すこともできた。計測感度や速度など、まだまだ改善の余地はあるが、高波長自由度 SERS 分析技術を実現することができた。

共鳴フリーなプラズモン超集束と高波長自由度 SERS 分析法



190. 共鳴フリーSERS 分析法の創出とタンパク質機能の解明

馬越　貴之

大阪大学 大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻 ナノスペクトロスコピー領域

Key words : SERS, ラマン分光法, プラズモン超集束, 1 分子計測

緒　言

生体分子の化学結合状態を 1 分子レベルで分析・理解することは、創薬科学や医工計測装置開発など様々な分野に大きく貢献する。単分子レベルで化学結合状態を計測する手法としては、金属ナノ構造のプラズモン共鳴を用いた表面増強ラマン分光法（SERS 分析法）が長らく用いられてきた。プラズモン共鳴現象によって金属ナノ構造の表面近傍に増強電場が生成するため、それで生体試料を照明することによって、極めて高感度にラマン散乱光を検出することが可能である。しなしながら、プラズモン共鳴は文字通り特定の波長でのみ励起される共鳴現象であるため、SERS 分析法の動作波長は強く制限されていた。ラマン散乱光は、励起波長に応じて異なるスペクトルを示すため、特定波長でしか動作しない SERS 分析法は、感度こそ単分子レベルを実現できるものの、分析能が制限されていた。

そこで本研究では、共鳴フリーなプラズモン超集束という現象を用いて、高い波長の自由度を有する SERS 分析法を開発することを目的とした。プラズモン超集束は、テーパー型金属構造上でプラズモンを伝播させ、先端へと超集束させることによって増強電場を生成させる現象である［1〜3］。プラズモンの共鳴ではなく伝播現象であるため、極めて広帯域に動作すると考えた［4, 5］。同一分子を様々な波長で同時計測できる新たな SERS 分析法は、生体分子を 1 分子レベルで波長スクリーニングして網羅的に化学結合分析できるため、分子内の結合状態をこれまでにない深度で詳細に解明できると考える。

方　法

1.　最適なテーパー型金属構造の作製

波長自由度 SERS 分析法の実現を目指し、まずはテーパー構造の最適化に取り組んだ。電磁場シミュレーション（有限差分時間領域法）を用いて、テーパー型金属構造の金属材料や、頂角、膜厚などのパラメータ依存性を網羅的に検証し、広帯域かつ高強度な増強電場を生成できるテーパー構造を模索した。また、電子ビームリソグラフィを用いて、実際にテーパー型金属構造も作製し、所望の特性が得られていることも確認した。

2.　高波長自由度を有する SERS 分析装置の構築

次に、高波長自由度 SERS 分析装置の開発に取り組んだ。様々な波長を同時入射、同時検出できる系を構築した。テーパー構造先端からのみのラマン散乱光を検出するため、ピンホールを用いて共焦点系も導入した。また、開発途中で、構造的なドリフトによって、安定的に計測が行えない事案も見出したため、高安定化ステージなどを導入し、装置の安定化も図った。その他にも、テーパー構造の先端にのみ試料が接触できるよう、先端に検出口を作製するなど工夫した。

3.　高波長自由度 SERS 分析法の装置特性計測

実際に色素分子を用いて、開発した高波長自由度 SERS 分析装置の特性を評価した。様々な波長で同一分子を同時計測できることを確認した。多波長同時計測だけでなく、その計測感度や速度、安定性などの装置特性も評価した。

結果および考察

1. テーパー型金属構造の広帯域生検証

金・銀・アルミニウムなどのテーパー構造材料や、テーパー構造の厚さ、頂角、さらにはプラズモンカップラ構造など、あらゆるパラメータを網羅的に検証した。様々なパラメータの中で、広帯域性に最も影響するのはテーパー構造材料であった。図 1 にテーパー材料として金・銀・アルミニウムを用いた場合の、テーパー構造先端の増強電場スペクトルを示す。基本的には、どの材料でも近赤外域にまで渡って広帯域に増強電場を生成できていることが確認できた。アルミニウム・銀・金の順に、短波長側まで増強電場を誘起できることが分かった。波長 600 nm 以下の可視光領域ではアルミニウムで、600 nm 以上では銀や金で高い電場強度が得られた。波長全域に渡って銀の方が金より高い電場強度が得られているが、金は電場強度以外で化学的安定性など優れた特長を有しているため、用途に応じて使い分けられると考える。その他にも、テーパー構造の厚さ、頂角、プラズモンカップラ構造など網羅的に検証したが、大きな依存性は見られなかった。

シミュレーションと同等の構造を、金・銀・アルミニウムを用いて電子線リソグラフィで作製した（図 2a）。各構造のプラズモンカップラ（単スリット構造）に白色光を照射すると、テーパー構造の先端で広帯域な白色発光を確認することができた（図 2b）。先端からの白色発光の散乱スペクトルを計測すると、実際に可視光域全域に渡って広帯域であることが確認できた（図 2c）。また、シミュレーション結果とも比較的良い一致を示していることが確認できた。

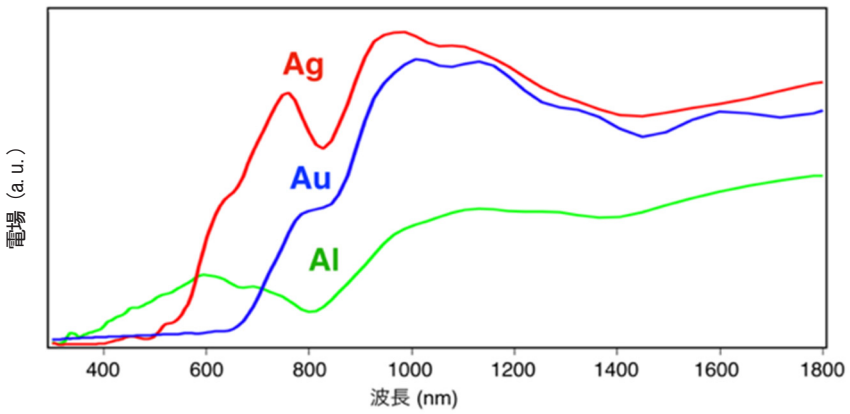


図 1. 金・銀・アルミニウムを用いた場合のプラズモン超集束の電磁場シミュレーション結果
どの材料でも近赤外域にまで渡って広帯域に増強電場が生成された。アルミニウム・銀・金の順に、短波長側まで増強電場を誘起できた。

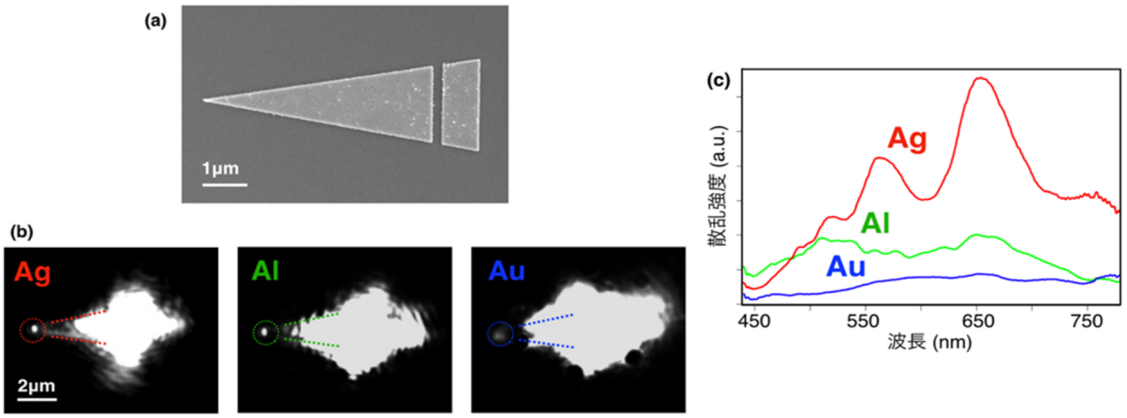


図 2. 広帯域性の検証

a) 作製したテーパー型銀構造の電子顕微鏡像。

b) 金・銀・アルミニウムで作製したテーパー型構造のプラズモンカップラに白色光を照射した時の光学像。先端でプラズモン超集束による発光を確認。

c) テーパー構造先端からの発光のスペクトル。

2. 高い波長の自由度を有する SERS 分析装置の構築と装置特性

図 3 に開発した高波長自由度 SERS 分析装置の写真を示す。442 nm、488 nm、532 nm、633 nm、785 nm の波長を同時に照射できるよう、ラマン分光用シングルモードレーザーを設置した。また、テーパー構造先端からのみのラマン散乱光を検出するため、ピンホールを導入し、共焦点検出できるようにした。また、顕微鏡などの構造的なドリフトが、安定した計測の妨げとなることが分かった。数秒程度の計測であれば、問題なく測定できるが、長時間にわたって生体分子の化学結合変化ダイナミクスを追跡する場合には問題となる。そこで、テーパー構造及び試料を設置する顕微鏡上に、高安定ステージを設置した。その他、ピエゾを用いた高精度な位置制御機構も導入した。まだまだ改善の余地はあるが、装置特性を検証する上では十分再現性高く測定できるまでに安定性を高めることができた。その他、テーパー構造の先端にのみ試料を配置できるよう、集束イオンビームで先端に検出口を作製するなど、工夫を施した。

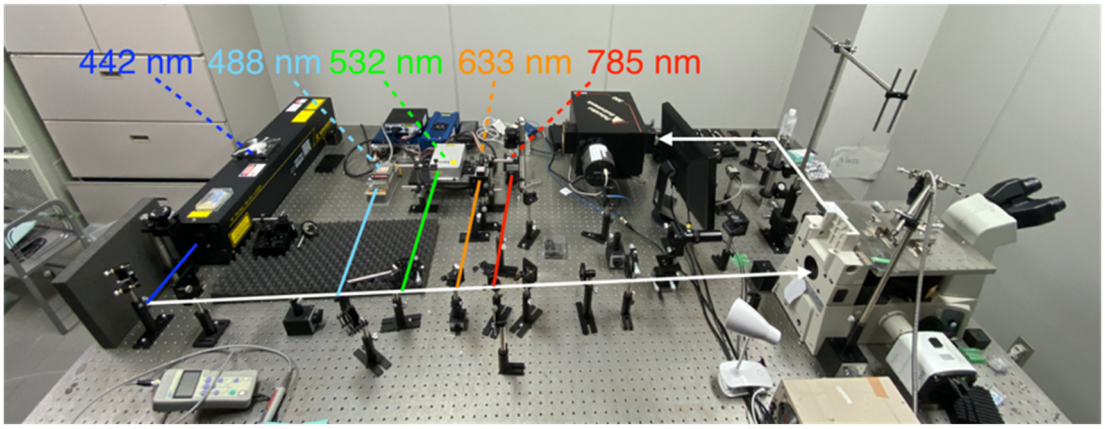


図 3. 構築した高波長自由度 SERS 分光装置

様々な波長のラマン分光用シングルモードレーザーを搭載した高波長自由度 SERS 分光装置。

波長自由度 SERS 分析装置を構築できたので、その装置特性を検証した。プラズモン超集束を用いた SERS 測定を行うために、強い増強電場を得られるテーパー銀構造を用いた。5 mM の 4-aminothiophenol（4-ATP）溶液をテーパー銀構造に 1 時間インキュベートし、エタノールで洗浄した。プラズモンカップラに波長 532 nm のレーザーを照射することによって、先端でプラズモン超集束による発光を確認した。ピンホールを用いて先端からのラマン散乱光のみを分光検出した（図 4a）。4-ATP に一致するラマン散乱ピークを観察することができ、プラズモン超集束を用いた SERS 分析法を実装することに成功した。入射偏光の強度依存性を検証することにより、取得したラマンスペクトルがプラズモン超集束に由来するものであることも確認できている。また、1 秒でも十分明瞭なラマンスペクトルを測定できており、さらに高速化によって高速ダイナミクス観察の可能性も見出すことができた（図 4b）。そして、高波長自由度 SERS 分析装置の広帯域性を活かした 2 波長 SERS 計測も行った。図 4c に示す通り、同一 4-ATP 分子を 532 nm と 633 nm の波長で SERS 計測すると、異なるスペクトル応答を示すことが確認できた。選択則に波長に応じて異なる分子振動の特徴を検出できていると考えられ、今後さらに波長を増やし分析能を高めることによって、生体分子の化学結合分析に貢献できると考える。

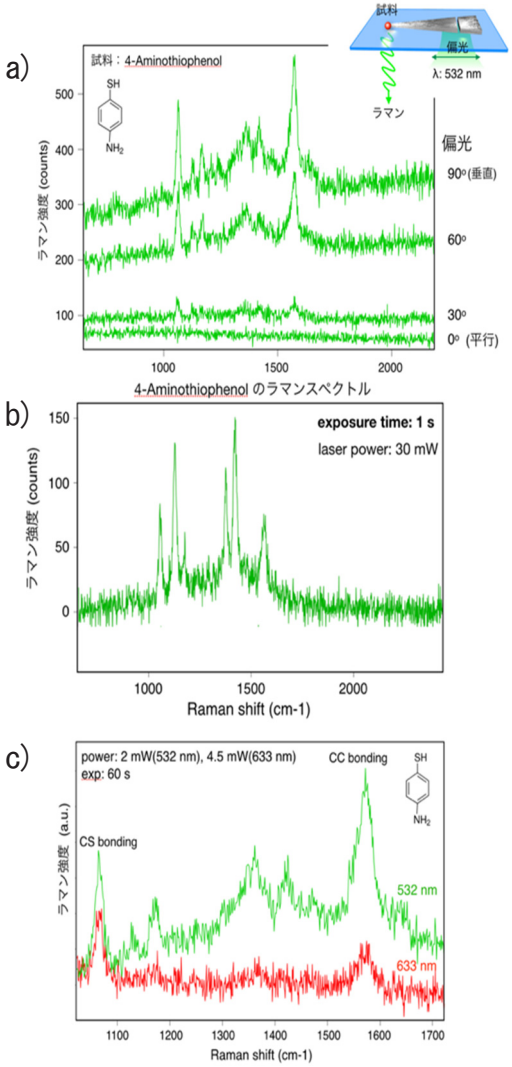


図 4. 高波長自由度 SERS 分析装置で計測した 4-aminothiophenol のラマンスペクトル

a) 4-aminothiophenol のラマンスペクトルを、プラズモン超集束を適応した高波長自由度 SERS 分析装置で計測することに成功した。

b) 当該装置を用いて 1 秒で取得したラマンスペクトル。サブ秒オーダーのダイナミクス分析の可能性も示唆。

c) 当該装置を用いて、同一分子のラマンスペクトルを波長 532 nm と 633 nm で取得した結果。波長による違いが見られており、詳細な分析が可能であることを示唆している。

共同研究者・謝辞

本研究は、公益財団法人上原記念生命科学財団のご助成により、遂行することができました。ここに深く感謝の意を表します。

文　献

1) A. J. Babadjanyan, N. L. Margaryan, Kh. V. Nerkararyan, Superfocusing of surface polaritons in the conical structure, J. Appl. Phys. **87**, 3785 (2000); DOI: 10.1063/1.372414

2) M. I. Stockman, Nanofocusing of Optical Energy in Tapered Plasmonic Waveguides, Phys. Rev. Lett. **93(13)**, 137404 (2004); DOI: 10.1103/PhysRevLett.93.137404

3) C. Ropers, C. C. Neacsu, T. Elsaesser, M. Albrecht, M. B. Raschke, C. Lienau, Grating-Coupling of Surface Plasmons onto Metallic Tips: A Nanoconfined Light Source, Nano Lett. **7(9)**, 2784-2788 (2007); DOI: 10.1021/nl071340m

4) T. Umakoshi, Y. Saito, P. Verma, Highly efficient plasmonic tip design for plasmon nanofocusing in near-field optical microscopy, Nanoscale **8**, 5634-5640 (2016); DOI: 10.1039/c5nr08548a

5) T. Umakoshi, M. Tanaka, S. Yuika, P. Verma, White nano-light-source for optical nanoimaging, Science Advances (in press).