

[研究助成 (A)]

マルチモーダルナノ分光計測による材料認識ペプチドの機能解明

Multi-modal nanospectroscopy reveals biological functions of solid-binding peptides

2231010



研究代表者

徳島大学
ポストLED フォトニクス研究所

特任助教

加 藤 遼

[研究の目的]

材料認識ペプチドは固体材料に特異的に吸着し、その電子特性や分子修飾性を選択的に改変できるため、高性能バイオセンサーの実現に向けた応用が盛んである。吸着機能にはペプチドの立体構造と宿主材料の電子特性の相関が重要だと知られているが、その原理の詳細は解明されていない。そこで本研究は、ペプチドの立体構造と無機材料の電子特性を1分子レベルでマルチモーダル観察する技術を開発する。従来は独立に計測・議論されてきた物性を同時計測し、吸着機構の解明を目的とする学術的意義の大きい研究である。この吸着機構を解明できれば、感染症対策や食品検査など実社会に貢献できる多機能・高感度バイオセンサーの実現が期待される。

ペプチドの材料表面への吸着機能の原理は、ペプチドの立体構（2次構造）の変化と吸着する宿主材料の電子特性（バンドギャップ等）の局所的な変化の両方が重要であると予想されている。そのため、吸着機能の理解にはペプチドの化学構造と宿主材料の電子特性の両方の計測が必要不可欠である。1分子レベルで光計測ができる技術として、探針増強分光法がある。この手法は、ナノメートルサイズの金属探針の先端に生じるナノ局在光で励起した分子の光学応答を計測する。生体分子の2次構造は赤外光と生体分子の相互作用から生じる赤外吸収信号

から観察でき、無機材料の電子特性は可視光で励起したフォトルミネッセンスから分析できる。したがって、フォトルミネッセンスと赤外吸収の両方を同時にナノ計測することで、吸着機能を支配する化学・電子特性を包括的に理解できる。しかしながら、これら2つの計測を共立するシステムは未だ実現できていない。その理由は、可視域と赤外領域の異なる波長領域の光信号を同時に検出するためには、複雑な検出系を独立に必要とするからである。

そこで本研究では、赤外領域の光信号を検出せずに試料の赤外吸収を計測できる AFM-IR を利用することで、フォトルミネッセンス分光との共立を実現する（図1）。AFM-IR は赤外吸収に付随する分子の瞬間的な熱膨張を計測することで、赤外吸収を間接的に計測する。赤外領域の光信号の検出が不要なこの手法とフォトルミネッセンス分光を組み合わせることで、これまで独立に計測・議論されてきたペプチドと無機材料の化学・電子特性を同時にかつ1分子レ

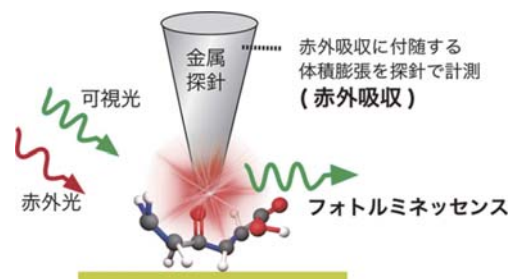


図1 探針増強フォトルミネッセンス・赤外吸収マルチモーダル計測の模式図

ベルで計測できる。固体材料とその表面上の生体分子それぞれの特性の変化が吸着機能とどのような相関があるかを明らかにすることを本研究では目指した。

〔研究の内容、成果〕

初めに、AFM-IR と発光分光の共立化を目指した顕微鏡開発を行なった。しかし、AFM-IR での感度があまり向上できず、1 分子計測が困難であることが分かった。一方ポジティブな要素として、相補的な技術であるナノラマン分光だけでも生体分子の機能を十分に議論できる有意なデータが得られた。そこで年度途中からは、ナノラマン分光を基軸とした手法開発と計測応用により、単一ペプチドの計測応用を行った。開発したナノラマン分光顕微鏡の外観を図2に示す。本装置は、共焦点のラマン顕微鏡と原子間力顕微鏡（AFM）の複合装置である。本装置をベースとしつつ、初めに、生体1分子からの微弱なラマン散乱光を高感度かつ、定量性高く計測する基盤を確立した。ナノメートルの精度で探針や試料を制御する必要があるナノラマン装置は、周囲の温度変化による熱ドリフトが測定に大きく影響する。時間の経過と共に、ドリフトの影響により探針が入射光の中心からズレたり、対物レンズの位置がズレたり



図2 ナノラマン分光顕微鏡の外観

する。そのため、従来のナノラマン装置は、経時測定した結果の定量性が低いことが課題であった。そこで、我々が近年開発した装置の熱ドリフトをリアルタイムかつナノメートルの高精度で補正する機構を導入しこれを解決した。実際には、金属探針と対物レンズのドリフトをそれぞれ補正する別々のシステムを導入した。ドリフト補正機能を使用した場合、ラマン測定の時間的な定量性が担保されている。つまり、経時記録したラマンスペクトルの定量性を担保でき、時間的に変化する分子の構造変化を精緻に計測することを可能にした。

開発した手法を用いて、ペプチド分子のラマン散乱スペクトルの取得に成功した。得られた図3のスペクトルより、ペプチドに含まれるヒスチジンやセリン、スレオニンなどのアミノ酸情報を解析することで、ペプチドの吸着機能の解析を行なった。構成するアミノ酸の内、セリンなどの極性型のアミノ酸由来のラマン散乱が強く観察されたことから、金属との相互作用によるラマン散乱の増強が得られたと考察した。現在は、再現性を確認する実験を行っており、得られたスペクトルの定量性を確かめた上で、このペプチドの生物学的機能の解明に向けた解析を行なっている。また、本研究を起点として、単一のタンパク質のナノラマン分析に関する研究も展開している。材料上に自己組織化するタンパクの構造解析を行い、その材料としての機能・性質を明らかにすることを目的としている。得られたスペクトルの解析手法についても現在検討している。アサインできていないピークがどのアミノ酸のどの結合由来なのかを、リファ

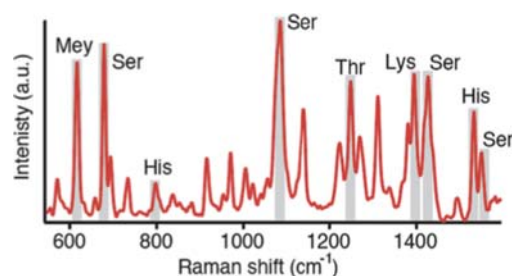


図3 ペプチド分子のラマンスペクトル

レンスのラマンスペクトルを計測しつつ、分子軌道を量子化学計算の結果とともに解析する。スペクトル内の全てのピークをアサインすることで、さらなる分子構造・機能情報を得ることができると考えている。

また、材料の局所領域からの発光スペクトルの取得も同時に行うこともできている。材料のバンドギャップに応じて発光の励起波長が異なるため、532 nm, 594 nm, 671 nm の3つの波長で発光スペクトルを計測できる分光システムの構築を行なった。また、同時にそれらのラマン散乱も計測できるシステムにすることで、化学的なラマン散乱の増強効果も検証できる基盤を構築し、生体分子だけでなく材料側の物性も広く計測することを目指した。MoS₂やWS₂の発光スペクトルもナノ計測し、局所的な電子準位の変化や層数の変化、表面の物理構造の有無などを発光スペクトルの強度とピーク位置から同定することもできている。本成果は、ナノ材料の電子特性の局所解析に関する研究として、論文化を進めている。

本研究の開発過程において、発光をさらに高感度化できる可能性を見出した。そこで、発光スペクトルを高感度計測するための要素技術開発にも着手した。具体的には、金属の電場増強効果を利用せずに、誘電体ナノ構造に誘起される Mie 共鳴を利用する。一般的には、金属と発光体が近接すると発光エネルギーが金属に移動するクエンチングが生じる。しかし、誘電体ナノ構造であれば、クエンチングが生じずに電場増強効果を最も効率的に受けることが可能である。そこで、本原理を実証すべく、誘電体ナノ構造を用いた発光分光のデモンストレーション

を行った。まずは、基板上に誘電体ナノ構造を作製し、試料の蛍光が増強するかどうかを検証した。誘電体ナノ構造の作製には、レーザーアニーリング法を用いた。基板上にシリコンを蒸着し薄膜を形成した後に、波長 532 nm の連続光を照射することで誘電体ナノ構造を作製した。光の照射時間やパワーを変えながら、増強分光に最適なナノ構造を作製するパラメーターを探索した。最適化したナノ構造を用いることで、基板表面の蛍光分子のシグナルを 30 倍以上増強することに成功した。今後は基板上に作製した誘電体ナノ構造を探针上に作製することで、高感度の発光分光を実現することを目指す。

[成果の発表, 論文など]

1. Tatsuya Fukuta, Ryo Kato, Takuo Tanaka, Taka-aki Yano, "Fabrication of Mie-resonant silicon nanoparticles using laser annealing for surface-enhanced fluorescence spectroscopy", *Microsystems and Nanoengineering*, 10, 45 (2024)
2. 加藤遼, "高安定探针増強ラマン分光システムの開発", 光学, 第 53 巻第 8 号
3. Dominic R Whittall[§], Ryo Kato[§], Akari Okimura, Rio Takizawa, Kazunori Motai, Hiroki Maeda, Yui Yamazaki, Taka-aki Yano, Eriko Takano, and Yuhei Hayamizu*, "Synthetic spider silk forming highly-aligned nanoarchitectures on 2D-material surfaces", bioRxiv.

招待講演

1. 加藤遼, "先端ラマン・赤外分光技術で拓く 1 分子から微生物までの化学分析", 日本農芸化学会 2024 年度大会, シンポジウム「環境とバイオテクノロジーから紡ぐ農芸化学の未来」, 2023. 3. 26
2. 加藤遼, "中赤外光熱変換計測を用いたラベルフリー生体化学分析", レーザー学会学術講演会第 44 回年次大会, 東京, (2024 年 1 月 17 日)