

非線形ラマン分光干渉法を用いたキラル分子の立体構造解析

Stereochemical analysis of chiral molecules by nonlinear Raman spectral interferometry

(分子科学会推薦)

代表研究者 筑波大学

加納 英明

University of Tsukuba

Hideaki KANO

協同研究者 東京大学

平松光太郎

The University of Tokyo

Kotaro HIRAMATSU

We aimed at developing a new Raman-based spectroscopic method for studying chiral molecules. Based on a coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) process, which is one of the third-order nonlinear Raman effects, we developed a new Raman optical activity (ROA) spectroscopic system. With the use of supercontinuum in visible generated with a photonic crystal fiber pumped with both 532 nm and 1064 nm, multiplex CARS-ROA spectrum covering the whole fingerprint region was obtained. In the visible excitation, CARS-ROA spectrum of (-)- β -pinene showed higher contrast ratio of the chirality-induced signal to the achiral background than that of the previously reported near-infrared CARS-ROA spectrum.

研究目的

物質のキラリティーは、生命の発生、タンパク質の機能発現、サリドマイドの催奇作用など、化学・薬学・生命科学の分野を横断する非常に重要な分子の構造情報であり、これまで様々な方面から研究が行われている。キラリティーを識別する一般的な分光手法として、可視及び近紫外領域の円偏光二色性 (Circular Dichroism: CD) 及び旋光性 (Optical Rotation: OR) が挙げられる。しかしながら、これらの方法は分子の構造情報に乏しく、間接的な知見しか得ることが出来ない。これに対して、赤外領域の CD (Vibrational Circular Dichroism: VCD) 及び旋光分散 (Vibrational Optical Rotatory Dispersion: VORD)、また、ラマン分光を用いた光学活性測定 (Raman Optical Activity: ROA) は、振動スペクトルに基づいた分子レベルの構造情報を得ることが出来る。特に、ROA は、小さなキラル分子の絶対立体配置の決定が可能だけでなく、DNA、RNA、タンパク質、多糖類などの生体分子の水溶液中での豊富な構造情報を与える

数少ない手法として近年急速に発展してきている。振動スペクトルは可視、近紫外領域の電子スペクトルに比べ、分子振動に対応した数多くのピークをもつため、ROA や VCD では分子レベルの豊富かつ詳細な構造情報が得られる。しかしながら、ROA の信号強度は、測定されるラマン散乱光強度の 1/1000 程度と非常に小さい。そのため、タンパク質水溶液のような試料では、測定に 20 時間程度を要し、信号取得に困難を極める。そこで本研究では、ROA 分光の感度を格段に高感度化するため、非線形ラマン散乱の一つである coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) 過程を用いた新しい CARS-ROA システムを立ち上げ、ROA 検出感度の格段の向上を狙って研究を行った。

研究経過

本研究では、可視域白色レーザーという新しい光源を用いることで、CARS を用いた全く新しい ROA システムの構築を行った。

図 1 に可視白色レーザーを用いた実験装置を示す。光源にはマイクロチップ Nd: YAG レーザー（浜松ホトニクス：パルス幅：400 ps, 波長：1064 nm, 繰り返し：25 kHz, 出力：600mW）を用いた。この光源からの光パルス为非線形光学結晶である LBO に集光し、第二高調波発生による波長変換を行った。波長変換後の可視光パルス（532 nm）と、基本波である近赤

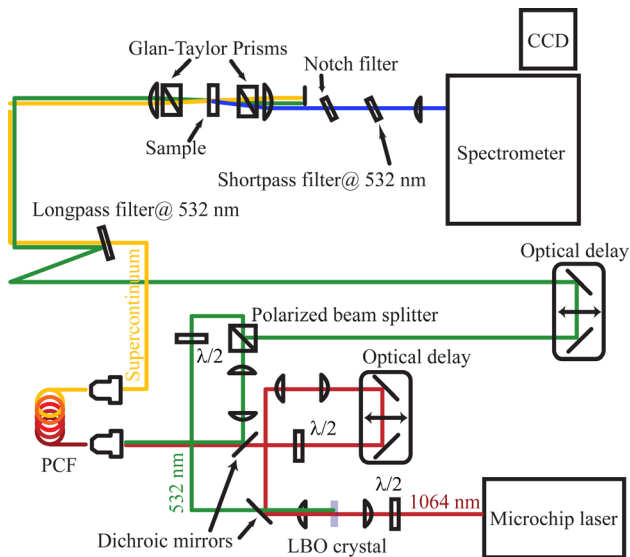


Fig.1. Experimental setup for CARS-ROA spectroscopy; PCF: photonic crystal fiber.

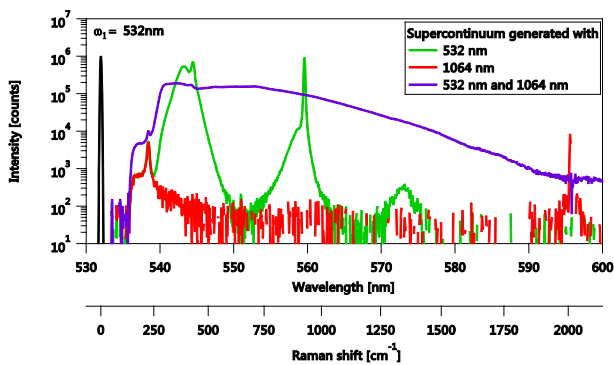


Fig.2. Supercontinuum (white-light laser) generation with use of only visible (532 nm; green), only near infrared (1064 nm; red), and dual (532 nm and 1064 nm) input (purple). The dual input scheme give rise to broadband supercontinuum generation.

外光パルス（1064 nm）とを同軸に合わせ、光学遅延・偏光を調整した後、フォトニック結晶ファイバー（photonic crystal fiber; PCF）に導入した。その結果、

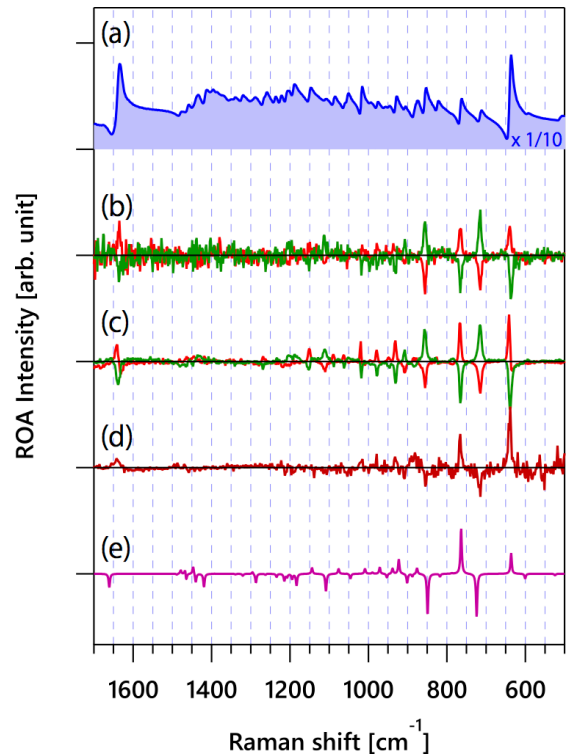


Fig. 3(a) CARS spectrum of (-)-β pinene (exposure time: 1 hour), (b) CARS-ROA spectra of (+)-β pinene (red) and (-)-β pinene (green) (exposure time: 1 minute), (c) CARS-ROA spectra of (+)-β pinene (red) and (-)-β pinene (green) (exposure time: 1 hour), (d) CARS-ROA spectra of (-)-β pinene (deep red) using our previous setup using a near infra-red laser source (exposure time: 1 hour), (e) calculated result of CARS-ROA spectrum.

図 2 に示すような幅広いスペクトル成分を持つスーパーコンティニューム光（白色レーザー）を得ることに成功した。

発生させた白色レーザー光と、白色発生前に取り分けた可視光パルス（532 nm）とを用い、CARS測定を行った。試料に入射するレーザー光の偏光は、試料手前のグラン・テラー プリズムにより平行にセットした。発生した CARS 光の中で、レーザーの偏光と直交する成分がキラリティ由来の信号（キララル CARS 光）である。この光強度は大変微弱であるので、高感度検出を目的として、類似の分光法でよく用いられている光ヘテロダイン検出法を採用した。すなわち、試料後のグラン・テラー プリズムを入射レーザーの偏光と直交する角度から僅かにずらし（その角度を θ と定義する）、レーザーの偏光と平行

なアキラル CARS 光をローカル・オシレーターとして導入した。キラル及びアキラル CARS 光は、その後分光器に導入され、CCD カメラにより検出された。

本研究では、測定スペクトルから CARS-ROA スペクトルのみを抽出する方法についても、最適な方法を探索した。以下に、その概要を述べる。一般的には、 $\theta = \pm 0.5^\circ$ における CARS スペクトルを測定し、その差分を取ることで CARS-ROA スペクトルが得られる。しかしながら、試料そのものの ORD のため、上記の方法で計算した CARS-ROA スペクトルには、スペクトルに歪みが生じてしまう。この影響を取り除くため、以下に述べる解析手法を開発した。ORD による影響（位相回転）を α とする。すると、CARS スペクトルは以下の様に書ける。

$$I(\theta) \propto \left| \sin(\theta - \alpha) \chi_{1111} + \cos(\theta - \alpha) \chi_{2111} \right|^2$$

したがって、 $I(\theta)$ と $I(-\theta)$ との間の差スペクトルは近似的に以下の様に書き表せる。

$$I(\theta) - I(-\theta) \propto 2\theta\alpha \left| \chi_{1111} \right|^2 + 4\theta \operatorname{Re} \left[\chi_{1111}^* \chi_{2111} \right]$$

ここで、 $\left| \chi_{1111} \right|^2$ 及び $\operatorname{Re} \left[\chi_{1111}^* \chi_{2111} \right]$ はそれぞれ

CARS 及び CARS-ROA に対応する。このうち第一項が、ORD により混入する成分である。この寄与を取り除くため、 $I(\theta)/I(-\theta)$ という形のスペクトルを

計算し、それを $\left[\frac{\theta - \alpha}{\theta + \alpha} \right]^2$ という形の関数

でフィットすることにより、 α の値を見積もった。

その結果を以下の式に代入し、歪みを取り除いた CARS-ROA スペクトルを得ることに成功した。

$$\frac{\theta + \alpha}{\theta - \alpha} \left[I(\theta) - \left(\frac{\theta - \alpha}{\theta + \alpha} \right)^2 I(-\theta) \right] = 4\theta \operatorname{Re} \left[\chi_{1111}^* \chi_{2111} \right]$$

結果・考察

本装置及び解析方法を用いて proof-of-principle 的実験を行った結果を図 3(a-c)に示す。試料は分子液体の β ピネン（赤：(+)、緑：(-)）であり、測定時間は図 3(b), (c)でそれぞれ 1 分及び 1 時間である。比較のため、通常の CARS スペクトルを図 3(a)に、ま

た、近赤外域(1064 nm 付近)で得た CARS-ROA の結果を図 3(d)に示す。測定時間は図 3(c)と同じ 1 時間であり、装置の性能向上は顕著である。図 3(e)には、比較のために計算結果を示している。計算には Gaussian 03 による DFT 計算を用いた。Minimum energy structure の計算には、B3PW91 及び aug-cc-pVDZ を、Raman 及び ROA の計算には B3LYP 及び 6-31G**を用いた。また、スケールリングファクターとして 0.97 を用いた。実験結果と計算結果はよく一致しており、本装置により ROA スペクトル測定がアーティファクト・フリーで行えていることがわかる。以上のように、可視域白色レーザーを用いることで、世界初の可視 CARS-ROA システムの構築に成功した。

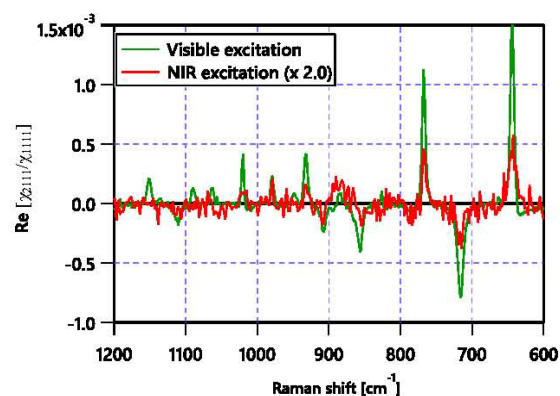


Fig. 4 Comparison of spectral profiles of $\operatorname{Re} \left[\chi_{1111}^* \chi_{2111} \right] / \left| \chi_{1111} \right|^2$ for visible (green) and near infrared (red).

次に、本研究で得られたスペクトルと、我々が近赤外光で得た CARS-ROA スペクトル（既報）との比較を行った。図 4 に結果を示す。信号強度は約 2 倍程度増強していることがわかる。これは、可視レーザーを用いたことによる、前期共鳴ラマン増強的な要因が考えられる。

以上のように、可視光レーザーを用いた CARS-ROA スペクトル測定装置を開発した。露光時間 1 分でも、良好な信号対雑音比（S/N 比）で CARS-ROA スペクトルを得ることが可能であることが示された。S/N 比が向上した本手法を用いることで、タンパク質・多糖類水溶液など様々な系に、キラル・ラマン分光が適用できる可能性を切り拓い

た。

研究の発表

口頭発表

1. (招待講演) 平松光太郎, “ヘテロダイン検出法によるアキラル・バックグラウンドフリーな光活性測定法の開発”, 第5回キラルサイエンス&テクノロジーシンポジウム, 2014年2月28日(東京)
2. (招待講演) 平松光太郎, “コヒーレントラマン分光法で見る分子のキラリティー”, 量子エレクトロニクス研究会, 2013年12月21日(長野)
3. (招待講演) Kotaro Hiramatsu, “coherent Raman optical activity spectroscopy”, spectroscopic studies

on molecular chirality, 20th, Dec. 2013 (Kyoto).

4. (招待講演) 加納英明, “白色レーザーを用いた生細胞・生体組織の多光子分光イメージング”, 第8回表面科学研究会, 2013年10月18日, 東京

誌上発表

1. Kotaro Hiramatsu, Hideaki Kano, and Takashi Nagata, “Raman optical activity by coherent anti-Stokes Raman scattering spectral interferometry”, *Optics Express* 21, 13515 (2013). DOI: 10.1364/OE.21.013515, 査読有