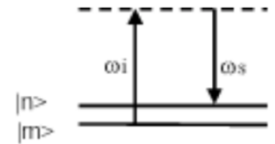


# 文献セミナー回答 (2021.9.2 Nuclear analysis using Raman Spectroscopy)

M2 野崎

## ◎ 仮想励起状態とは何か。

量子力学モデルでは光散乱を二光子過程として取り扱います。二光子過程で、はじめに光子と分子との衝突が起こり、その結果、極端に短い時間の間、分子は高いエネルギー状態に仮想的に励起されます。きわめて短い時間の後、第2の過程として光子の放出がおこります。



ラマン散乱強度方程式内の変数(ラマン散乱テンソル)を定義する方程式である Kramers-Heisenberg-Dirac の分散式を用いて仮想励起状態について考えます。

### ラマン散乱強度

$$F_s R^2 = \frac{\omega_s^3 \omega_i}{c^4} |\mathbf{e}_s \mathbf{a} \mathbf{e}_i|^2 F_i$$

$F$ : 光子フラックス、単位時間に単位面積を通して流れる光子数、光の強度に対応

### Kramers-Heisenberg-Diracの分散式

$\sigma$ 方向に偏光した入射光子が相互作用  $\rho$ 方向に偏光した散乱光子が  
 $\langle m | D_\sigma | e \rangle$ によって1個消滅する過程  $\langle e | D_\rho | n \rangle$ によって1個生成する過程

$$a_{\rho\sigma} = \sum_{e \neq m, n} \left\{ \frac{\langle m | D_\sigma | e \rangle \langle e | D_\rho | n \rangle}{E_e - E_m - E_i - i\Gamma_e} \right.$$

中間状態と始状態のエネルギー差  $E_e - E_m - E_i$  と緩和項  $i\Gamma_e$

$\rho$ 方向に偏光した入射光子が  $\langle m | D_\rho | e \rangle$  によって1個生成する過程  $\sigma$ 方向に偏光した散乱光子が  $\langle e | D_\sigma | n \rangle$  によって1個生成する過程

$$+ \frac{\langle m | D_\rho | e \rangle \langle e | D_\sigma | n \rangle}{E_e - E_n + E_i + i\Gamma_e} \left. \right\}$$

中間状態と終状態のエネルギー差  $E_e - E_n + E_i$  と緩和項  $i\Gamma_e$

$|m\rangle$ : 分子の始状態、 $|n\rangle$ : 終状態、 $|e\rangle$ : それ以外のあらゆる中間状態

Kramers-Heisenberg-Dirac の分散式は、分子の始状態 $|m\rangle$ 、終状態 $|n\rangle$ 以外のあらゆる中間状態 $|e\rangle$ に関する求和を含んでいます。それぞれの中間状態の寄与が位相を持って(絶対値の2乗 $||^2$ をとる前に)求和されることは、ラマン散乱の過程で分子が中間状態 $|e\rangle$ に実際に分布するわけではないことを意味しています。その意味で中間状態は仮想的(virtual)であると言えます。

細かいパラメータや量子論モデルでのラマンの解釈は参考文献をご参照いただければと思います。

・濱口研究室ホームページ <http://hamalab.com/basic/RamanTheory.html>

## ◎ 励起波長を選ばないというが、用いる波長によって何か違いは生じてこないのか？

励起波長によってラマンの感度が変わってくるということが知られています。

- ・光散乱の強度は入射光の強度に比例し、波長の4乗に反比例することが知られています(いわゆる $\nu^4$ 則)。
- ・そのため、レーザー波長が長いほど結果的にラマン信号強度が弱くなってしまい、逆に短波長のレーザーを使えば強いラマン散乱光を得ることができます。

・ CCD 検出の検出感度（量子効率）の具合が波長によって違うことにも留意する必要があります。多くのラマンの測定は、光電面にて光を電子に変換し、電子倍增管で増幅、電流として信号を出力する CCD 検出器によって行われます。光を電子に変換する効率（量子効率）は波長によって異なり、一般に 550nm ぐらいをピークに長波長になるにつれて感度が落ちてくることが知られています。

・ 励起波長によってはフラビン補酵素などに由来する自家蛍光が励起され、バックグラウンドの蛍光が上がってしまい、ラマンシグナルが埋もれてしまうという懸念点もあります。

このような特徴から、自発ラマン光の測定には 532 nm が励起波長として使われることが多いです。

また、測定する分子ごとに最適な励起波長は異なります。例えば、シトクロム c には、510~550 nm の光を吸収するヘムタンパク質が含まれているため、この波長域の光を照射すると、強い共鳴ラマン散乱が観測されます。

- ・ Hamada, K.;... Kawata, S. *J. Biomed. Opt.* **2008**, *13*, 044027.
- ・ 濱口宏夫, 分光法シリーズ 1 ラマン分光法, 講談社, 2015
- ・ <https://www.ites.co.jp/analyzenews/analyzeblog/vol-006.html>

### ◎ 金ナノ粒子の細胞内への導入

金ナノ粒子の細胞への取り込みには、ファゴサイトーシス、ピノサイトーシス、マクロピノサイトーシス、クラスリンおよびカベオリンを介したエンドサイトーシスなど、さまざまなメカニズムが関与していることが知られています。様々な細胞株を用いた研究では、エネルギー依存性の受容体媒介エンドサイトーシス (RME) が主なメカニズムであることが示されています。

エンドソームからの脱出に関しては、複数の localization peptide や PEG, BSA などのタンパク質で金ナノ粒子を修飾することで物性を最適化していることが多いようです。

- ・ Huefner, A....; Mahajan, S. *Nano Lett.* **2013**, *13*, 2463.
- ・ Hecht, S. M. *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 383.

### ◎ 生細胞でどのくらいの時間、連続観測できるのか？退色はおこりにくい？

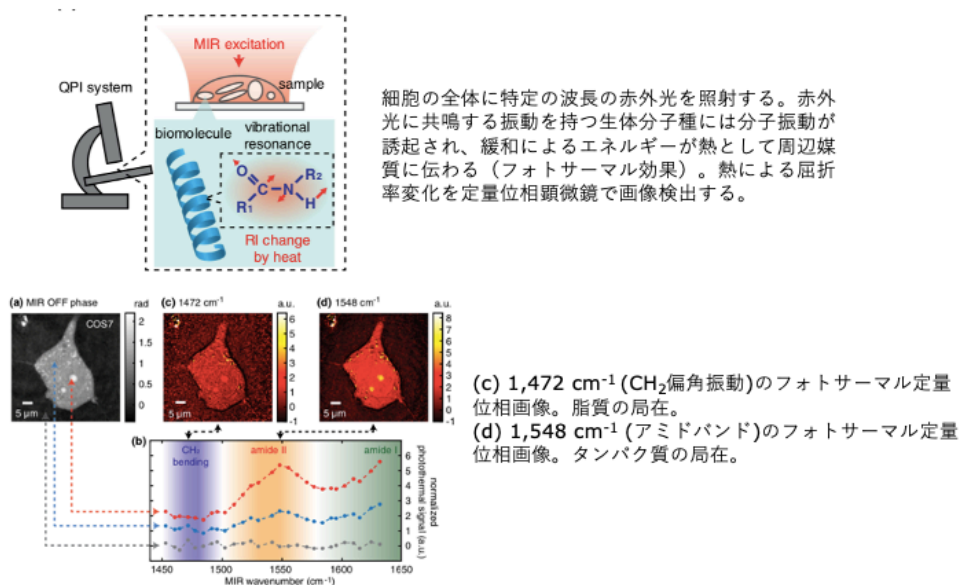
蛍光と比較してラマンの方が退色が起こりにくい（ほとんど起こらない）ことが一般に知られています。これは、ラマン散乱の寿命が極めて短いため、励起状態にあるレポーターの光退色、エネルギー移動、消光が起こらないことによります。ただし、SERS については、金ナノ粒子の拡散や局所的な光熱効果による破壊などによってシグナルが徐々に弱くなることも報告されています。拡散を防ぐために細胞を固定したり、コアシェル構造を作って安定性を向上させることで破壊を防ぐといった工夫によってシグナルの減少を防ぐ研究も行われているようです。

文献を調べた中では、連続露光時間ですと 40 分程度、インターバルを挟んで 24 時間以上の継続して計測した例などがありました。

- ・ Shen, Y.; ... Xu, S. *Theranostics* **2021**, *11*, 4872.
- ・ Wang, Y.; ...Chen, L. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1391.

### ◎ 吸収はイメージングには使えないのか？

ラマンと対をなす測定法である赤外分光法は、試料に赤外光を照射し、どの波長（波数）でどのくらいの光が吸収されるかを測定します。イメージングへの利用については、顕微鏡の空間分解能は波長に比例する回折限界によって制限されるため、可視光を用いるラマン顕微鏡では細胞レベルの観察が可能な一方で、赤外光を用いる赤外顕微鏡では 10  $\mu\text{m}$  程度の空間分解能しか得ることができず、組織レベルでのイメージング利用に限られていました。しかしながら、近年では赤外分光を用いて生細胞観察ができる顕微鏡が開発されています。その一つが赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡です。この顕微鏡は、生体分子が赤外光を吸収して振動することにより発生する温度上昇（フォトサーマル効果）に伴う屈折率の変化を定量位相顕微鏡により検出します。フォトサーマル効果による屈折率変化を可視光で検出するため、高い分解能および、水の影響を受けない観測を達成しています。



・ Tamamitsu, M.;... Ideguchi, T. *Optica* 2020, 7, 359.

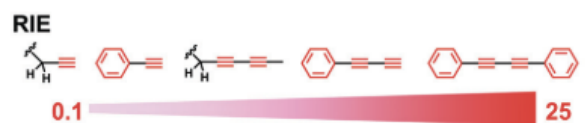
### ◎ 金ナノ粒子によるラマン増幅の影響はどのくらいの範囲に及ぶのか。

SERS の効果が及ぶ範囲としては、観測対象の分子が金ナノ粒子の表面近く、約 1 nm ~ 10 nm の距離に位置していることが必要とされています。

・ Pilot, R.;... Fabris, L. *Biosensors* 2019, 9.

### ◎ フェニル基のついたアルキンのラマン強度が大きいのはなぜか。

様々な化合物のラマン強度の測定から、フェニル基を持つアルキンおよび、フェニル基の 4 位にホルミルやエステルを置換基としてもつアルキンの強度が増すことから、アルキンの伸びる方向への  $\pi$  軌道の拡張が重要であることが実験的に示唆されています。



原理については ATRI 関連の論文にはほとんど記されていませんでしたが、クムレンの炭素鎖の構造と分光学的特性に関する論文で、アルキンの伸長方向へアリール基を付けると、アリール基の  $\pi$  軌道が sp 炭素鎖の外側に伸びる共役長を増加させることで分子の分極性を向上させ、その結果 CC 伸縮座標に対する分子分極性が上がることでラマンシグナルが増強すると主張しているものもありました。

- Bakthavatsalam, S.; ...Sodeoka, M. *RSC Chem. Biol.* **2021**.
- Tommasini, M.; ...Tykwinski, R. R., *J. Phys. Chem. C*, **2014**, *118*, 26415.

### ◎ alkyne のラマン、シグナルが弱いので、DNA やヒストンのような量の多い生体分子しか出来ない？

現状、報告されている alkyne ラマン(ATRI)は核酸、脂質、糖のような、大量に体内に存在し、取り込まれる生体分子の修飾がほとんどです。ATRI の増強にはセミナー内で触れたアルキン構造の改変や、SRS など顕微鏡側の最適化が行われていますが、やはり応用範囲は量の多い分子に限られているようです。(そのため) 袖岡先生の研究室では、薬物にアルキントグをつけて ATRI を SERS で増強し、生細胞内への取り込みを追跡するなど、生体内分子に限らず多様な分子のイメージングへと研究を展開されています。

- Koike, K.;... Sodeoka, M.; Fujita, K. *ACS Nano* **2020**, *14*, 15032.
- Bakthavatsalam, S.; ...Sodeoka, M., *RSC Chem. Biol.* **2021**.

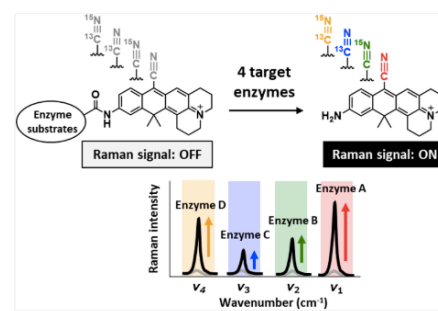
### ◎ 金ナノ粒子をアシル化でヒストンに付けるのはどう？

SERS で使われる金ナノ粒子の直径は約 30-60 nm であり、一方ヒストンの直径は約 10 nm です。従って、ヒストンの金ナノ粒子修飾は、蛍光タンパク質を共発現させるのと同じように、細胞内生理環境への影響が大きく、ラマンの強みや触媒医療の強みを活かさないのではないかと思います。

BAHA 触媒によるアシル化の background が低いこと、およびヒストンが細胞内に多く存在することから、BAHA であれば、SERS を使わなくても SRS (ラマンの測定法の一つ、励起光と同時にストークス光を照射し、誘導放出を起こすことでストークス光を増幅する、ラマン顕微鏡ではかなり一般的に使われている手法) など測定法を工夫することでラマンイメージングが可能なのではないかと思います。

### ◎ 今のラマン技術における解決すべき問題は何でしょうか。例えば浦野研の神谷さんは何をやろうとしているの？

神谷先生のグループでは、加水分解酵素によってラマン信号を出すような ON/OFF 型のラマンプローブを合成し、生細胞内で複数の酵素活性を同時に可視化するという研究をされています。ラマン活性の ON/OFF スwitchングは、分子の吸収波長よりも 100-200 nm 長波長の光で励起すると検出感度が飛躍的に増大するという前期共鳴(EPR)ラマンを利用します。キサンテン骨格のラマン色素にアミド結合を介して酵素基質部位を導入したプローブは、酵素反応により励起波長が長波長化し EPR 条件を満たすよう



になり、強いシグナルが観測されます (=ラマン活性が ON になった)。

この研究の肝となっているのは、ラマンの共鳴の幅 (スペクトルの幅) が狭いことであり、蛍光標識ではスペクトルが重なってしまうために難易度の高かった、multi color imaging を実現し、がん細胞種間での酵素活性パターンの違いを可視化することに成功しています。現状はニトリル基 (およびその重標識体) をラマンタグとして用いていますが、将来的にはアルキンなども導入し、さらにたくさんの染め分けを行う計画のようです。

最終的には、浦野研の蛍光プローブのようにがん臨床検体の染色などに使うことを志向していると考えられますが、解決すべき問題点として、やはり感度が低いことが挙げられると思います。実際、発表されているプローブでも SRS や EPR を使うことでラマンシグナルの intensity の向上を図っています。しかしながら、現状では sub-micro molar の検出感度にとどまっており、さらなる感度の向上が必要と考えられます。

・ Fujioka, H.; ... Kamiya, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 20701