

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25790061

研究課題名(和文) 先端増強ラマン顕微鏡を用いた分子動態イメージングへの挑戦

研究課題名(英文) A challenge toward molecular dynamics analysis using TERS

## 研究代表者

田口 敦清 (Taguchi, Atsushi)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70532109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：先端増強ラマン顕微鏡(TERS顕微鏡)は、光を用いてナノスケールの空間分解能で材料を分析できる超解像顕微鏡である。本研究では、TERS顕微鏡を使った分子の動的ラマン分析への応用を検討した。モーター蛋白質のような位置が刻々と変化する分子を追跡する分子トラッキングシステムを構築し、これをTERSと組み合わせた分子追跡TERSシステムを構築した。TERS測定的时间分解能を向上させるために、増強度が高い金属プローブを開発した。ナノスケールで起こる分子ダイナミクス計測の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Ti-enhanced Raman spectroscopy (TERS) is a powerful technique that enables optically analyzing nanomaterials with a spatial resolution down to nanometer scale. In this study, I investigated the possibility of analyzing molecular dynamics using TERS. Based on AFM apparatus, I have build a molecular tracking system, with which it is capable to position a probe onto a spatially moving molecule, such as motor protein molecule. I have also designed and fabricate a metallic probe which provides high TERS enhancement by optimizing the resonant frequency of the plasmonic antenna at the tip. The results obtained in this study suggests the possibility of measuring molecular dynamics in nanoscale using TERS.

研究分野：ナノフォトニクス

キーワード：近接場ラマン顕微鏡 分子トラッキング 分子ダイナミクス 金属プローブ

### 1. 研究開始当初の背景

先端を先鋭化した金属プローブを分子に接近させ、プローブ先端に局在するプラズモン増強電場で観察したい分子のラマン散乱光を励起し、ナノスケールの空間分解能で分子をイメージングおよび分析する手法は先端増強ラマン顕微鏡法 (Tip-enhanced Raman Scattering Microscopy: TERS) と呼ばれ、ナノフォトニクス・ナノイメージングの重要な研究テーマとして、世界中で大きな注目を集めている。先鋭化した金属プローブをサンプルの上で走査し、同時に、プローブの先端に発生させた局在プラズモン場を利用して、サンプル表面のラマン散乱を局所的に励起し、カーボンナノチューブや歪みシリコンなどナノスケールの構造を持つ試料のラマンスペクトル画像を、光の回折限界を超えるナノスケールの空間分解能で得る。ナノ材料の局所的な応力解析や欠陥解析を通じて、TERS がナノマテリアルサイエンスにおいて強力な分析ツールであることが実証されてきた。一方で、モーター蛋白質などの生体分子ダイナミクス計測に TERS を活用した報告はない。近年は、リアルタイム原子間力顕微鏡などの超高速走査プローブ顕微鏡が開発・実現され、生体分子の動的な挙動と生物学的な役割の解明が進みつつある。そこで本研究では、TERS を用いた生体分子の動的ラマン分析を目的とし、分子トラッキング法を TERS と組み合わせた、分子追跡 TERS システムの構築を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では、金属プローブを標的分子の上でホバリングさせて、運動する分子を追跡しながら増強ラマン散乱スペクトルを経時測定する技術を開発する。この技術を用いて、標的分子を追跡しつつ、ラマンスペクトルをダイナミックかつ時間分解的に測定する。モーター蛋白質や膜蛋白質などの動く標的分子を追跡しながらラマンスペクトルを測定し、分子の運動や機能とラマンスペクトルを相関付けた解析へと発展させる。TERS のラマン増強度を高め、解析の時間分解能を高める。標的分子の運動と分子のスペクトル変化に着目した、分子ダイナミクスの抽出および解析手法を開発し、ナノバイオサイエンス、ソフトマターサイエンス、分子機械工学への貢献を図る。

### 3. 研究の方法

分子追跡システムのブロック図を図 1 に示す。金属プローブの位置を制御するプローブピエゾの X, Y 直流電圧に、小振幅の正弦波電圧を加算し、プローブピエゾに印可する。標的分子が球形状であると仮定すると、プローブ先端は球の真上で円軌跡を描く。この状態で、Z 信号を、印可した正弦波の周波数で復

調し、プローブ回転面の傾き ( $dz/dx$ ,  $dz/dy$ ) を得る。標的分子がプローブ直下の位置から外れると、プローブ回転面が傾くので、 $dz/dx$ ,  $dz/dy$  が常にゼロとなるように、プローブ X, Y に印可する直流電圧を PI 制御すると、プローブ先端位置は球の極大値に固定され、標的分子が動けばそれを追従する。

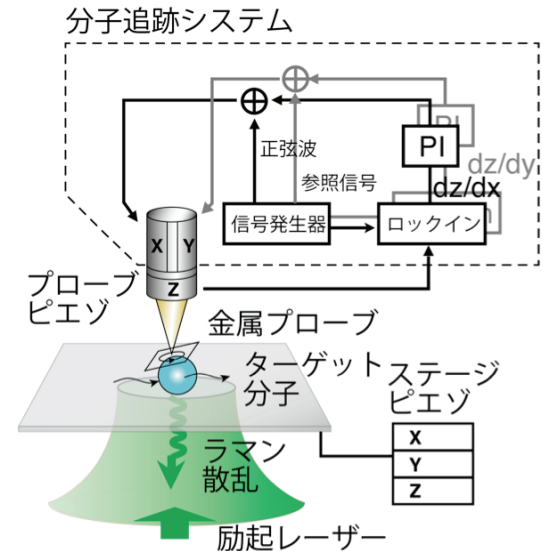


図 1: 分子追跡 TERS システム構成のブロック図

### 4. 研究成果

#### (1) 分子追跡システムの構築

分子追跡システムを構築した。構築した分子追跡システムが正常に動作することを確認するため、直径 50nm の金ナノ微粒子を基板に散布した試料を作製し、ナノ粒子の追跡を試みた。まず、静止しているナノ粒子 (図 2 (b) 挿入図) をターゲットに用い、プローブの動きをモニターした。静止しているとは言え、ミクロに見れば、ナノ粒子とプローブの相対位置は、装置の熱ドリフトによって時間的に変化していく。分子追跡が正常に動作していれば、プローブをターゲット上でホバリングさせたまま相対位置を一定に固定できる。この状態を維持し、プローブピエゾの X, Y 出力をモニターすることで、逆に熱ドリフトによる装置の変形量を算出した。

プローブピエゾに振幅 10nm、周波数 10Hz の正弦波モジュレーションを印加して、約 15 分放置した時の、X-Y の軌跡を図 2 (a) に示す。プローブはほぼリニアな軌跡を取って初期値から 76.8nm ほど移動した。また、それと同時に測定した z 値の変化を図 2 (b) に示す。Z 値の変化もほぼリニアで、15 分間で 125.3nm の移動が生じていた。15 分後に再びターゲットを中心にスキャンを行い、ターゲットとしたナノ粒子がスキャン範囲の中心

に位置していたことから、15分間同じターゲットを追跡し続けていたことを確認した。以上の結果から、構築した分子追跡システムを用いてナノ粒子を長時間捕捉できることを確認した。今回の測定で得られたドリフトの値は、X,Y方向に対して83.2pm/s、Z方向に対して136pm/sであった。この値は、例えば直径10nmの分子に対して、約1分が経過した時、プローブ先端が分子と離れてしまう計算になる。分子追跡を行うことにより、1分以上のより長い時間をかけて分子の経時的状態変化をモニターすることが可能となる。

次に、移動する分子の追従性を調べるため、ナノ粒子を載せたステージの位置を制御するステージピエゾに対してプログラムされた変位を与え、ナノ粒子を様々な軌跡(リサーチ)で運動させた上で、そのナノ粒子をプローブで追跡した。このデモンストレーションでは、ステージの最大運動速度は50nm/sとなるように設定し、正弦波モジュレーションの振幅は10nmで、周波数は30Hzで追跡を行った。得られた軌跡の例を図3に示す。このように、複雑な軌跡であっても、X,Yの方向に関係なく安定して追跡が行えることが分かった。

最大追跡可能速度  $V_{max}$  を決めるパラメータは、正弦波モジュレーションの振幅  $A$  および周波数  $f$ 、Z フィードバックの帯域、およびピエゾの共振周波数である。プローブが円軌跡を一周する間のターゲットの移動距離が、円軌跡の半径よりも小さくしなければならないから、 $V_{max} \ll Af$  という条件が必要である。仮に  $A=1\text{nm}$ 、 $V_{max}=1000\text{nm/s}$  (生体膜の拡散速度) を代入すると、 $f \gg 1\text{kHz}$  となるので、例えば膜蛋白質など拡散速度の速い分子をとらえるためには、共振周波数の高いピエゾを用いると共に、Z フィードバック帯域をかなり大きくしなければならない。このデモンストレーションで用いたZフィードバック帯域100Hzでは、数10nm/s程度が追跡速度の上限となった。

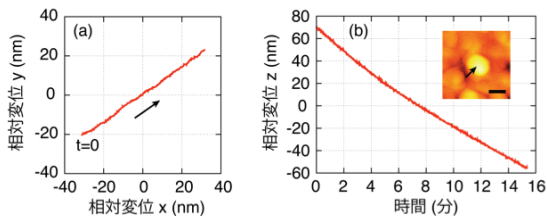


図2 (a) 静止した金ナノ粒子を分子追跡システムで捕捉した時のXYの移動量。(b) 時間に対するZの変化。挿入図は捕捉したナノ粒子の形状像でスケールバーは50nm

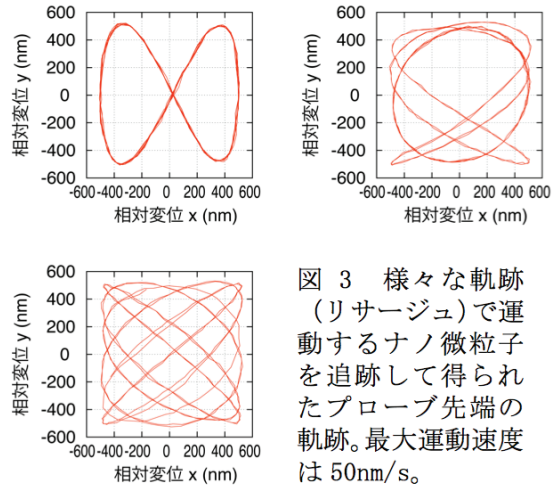


図3 様々な軌跡(リサーチ)で運動するナノ微粒子を追跡して得られたプローブ先端の軌跡。最大運動速度は50nm/s。

## (2) 高増強度 TERS プローブの開発

構築したシステムを使って、テストサンプルとして、フラーレン分子の重合過程の時間分解ラマン散乱測定を試みた結果、TERS 信号をさらに強く増強する必要が生じた。TERS 増強度を高めるために、報告者は、収束イオンビームを用いて金属プローブのナノ構造を制御し、金属プローブのプラズモン共鳴周波数をラマン励起光に最適化する技術を確認した (Maouli, Appl. Phys. Exp. 2015)。図4 (a) に示すように、酸化シリコンプローブの腹部にトレンチを加工し、その後蒸着を行うと、シャドウイングによって先端の金属部分がシャフト部分から孤立する。その結果、先端孤立部分の金属長によってプラズモン共鳴波長が変わる。例として、図4 (b) に、金属長の異なる様々なプローブのプラズモン共鳴スペクトルを、暗視野散乱顕微鏡で観察した結果を示した。プローブ先端のアンテナ長 (100nm、200nm、300nm) に応じて、異なる波長に、プラズモン共鳴が得られている。プラズモン共鳴が最適化されたプローブを用いることで、TERS 測定の増強度および再現性が大きく向上した。さらに、より大きな増強度を実現するプローブの金属構造として、多数のナノ粒子をナノギャップを介して集積させた、マルチグレイン構造を提案し、TERS 増強におけるメカニズムと効果を、計算と実験によって検討した (Taguchi, 投稿中)。これら一連の、構造強度プローブ構造の検討は、本研究のみならず、TERS 顕微鏡一般に通じる成果であり、分光的手法を用いた分子のナノ分析法としての TERS 顕微鏡の有効性をより一層高めることに役立つと確信する。開発した TERS プローブを用いて、引き続き、分子の動的 TERS 測定に取り組んでいる。

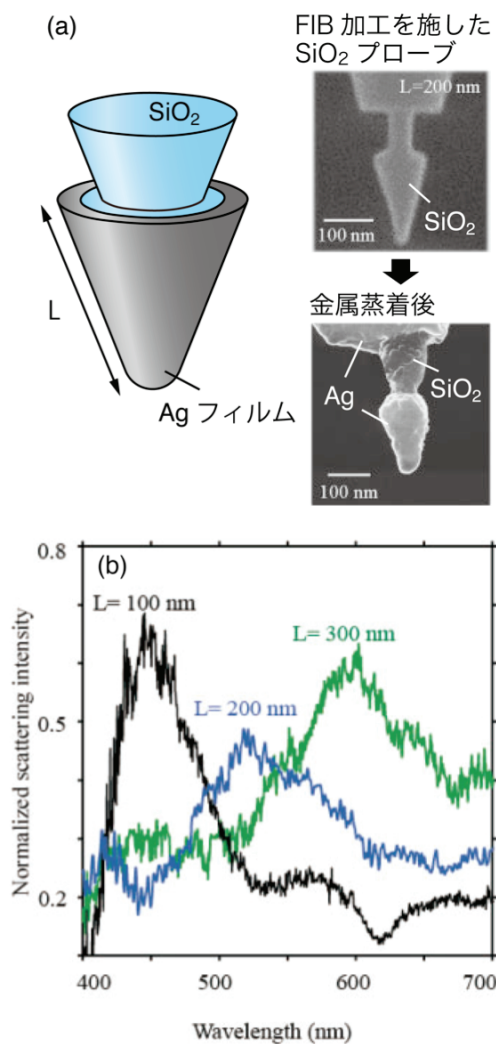


図4 (a)収束イオンビーム(FIB)加工を用いた金属プローブ長の制御。(b)長さが異なる金属プローブの暗視野散乱スペクトル。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Imad Maouli, Atsushi Taguchi, Yuika Saito, Satoshi Kawata, and Prabhat Verma.

Optical antennas for tunable enhancement in tip-enhanced Raman spectroscopy imaging.

Applied Physics Express (査読有り) Vol. 8, p. 032401 (2015).

DOI: 10.7567/APEX.8.032401

[学会発表] (計2件)

① Atsushi Taguchi and Satoshi Kawata. Grain structure for TERS microscopy. 第75回応用物理学会秋期学術講演会, 2014年9月20日(札幌).

② 田口敦清, 河田聡. TERS顕微鏡のためのマルチグレインプローブ. 第62回応用物理学会春期学術講演会, 2015年3月11日(平塚).

[その他]

ホームページ等

<http://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 敦清 (Taguchi, Atsushi)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 70532109