

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26287081

研究課題名（和文）動的核偏極磁気共鳴力顕微鏡(DNP-MRFM)の開発

研究課題名（英文）Development of dynamic nuclear polarization magnetic resonance force microscope (DNP-MRFM)

研究代表者

大道 英二 (OHMICHI, Elji)

神戸大学・理学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：00323634

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,700,000円

研究成果の概要（和文）：カンチレバーを用いた高感度・高周波電子スピン共鳴によるテラヘルツ磁気共鳴力顕微鏡の開発を行った。ファイバー光学Fabry-Perot干渉計を用いた高感度変位系により、100 ng程度の微小試料のテラヘルツESR測定が可能になった。実際に、ヘムタンパク質のモデル錯体であるヘミンに対して適用し、0.5 THzまでの周波数領域でのESR信号から詳細にゼロ磁場分裂定数の決定に成功した。

また、低温、強磁場中でも動作する3軸ピエゾステージを作製し、テラヘルツ磁気共鳴力顕微鏡のプロトタイプを作製を行った。磁気チップをつけたカンチレバーを試料表面に対し操作することで、空間分解ESR信号の検出に成功した。

研究成果の概要（英文）： We developed ultrasensitive high-frequency electron spin resonance technique and terahertz magnetic resonance force microscopy. With use of fiber-optic Fabry-Perot interferometry, a tiny sample on the order of 100 ng could become possible. Our technique was applied to hemin, a model substance of hemoproteins in frequencies up to 0.5 THz, and precise determination of zero-field splitting parameters was made.

In addition, three-axis piezoelectric translational stage for low-temperature and high-field experiments were developed. By sweeping a magnetic-tip holding cantilever over the sample surface, we succeeded in spatially resolved ESR measurements at liquid helium temperature.

研究分野：磁性

キーワード：カンチレバー 電子スピン共鳴 磁気共鳴力顕微鏡 DNP

## 1. 研究開始当初の背景

核磁気共鳴 (NMR) 測定は生体機能をつかさどるタンパク質など生体分子の構造解析、分子認識の最も重要な実験手法の一つである。しかし、一般に生体分子は分子量が大きくスピン濃度が低いことに加え、核スピンの磁気回転比は電子スピンの 1/1000 程度しかない。そのため、高い感度で NMR 測定を行うことがしばしば困難となる。このような問題を解決する上で現在、注目を集めているのが動的核偏極 (Dynamic Nuclear Polarization : DNP) である。この方法では電子スピンの高い偏極率を核スピンの移行することで NMR の感度を数百倍にもあげることができる。そのため生体分子の高感度 NMR を目的として、現在世界的にも精力的に研究が行われている。

NMR 測定の実用的な分解能が実現できる数テラ領域で DNP を行うためには、電子スピンの偏極に必要な電磁波の周波数がミリ波領域 (80-240 GHz) になる。そのため、DNP 測定ではしばしばジャイロトロンと呼ばれる、大型ミリ波光源が用いられる。この光源は 100W クラスの大出力が発生可能である反面、装置の運転用に別途、超電導磁石が必要であり、導入コストが非常に大がかりとなる。一方、高感度な NMR 測定法としてもう一つ注目を集めているのがカンチレバーを用いた磁気共鳴力顕微鏡 (MRFM) に代表される、機械検出による磁気共鳴法である。この方法ではミクロンオーダーのカンチレバーにより微小なスピン集団の磁気共鳴 (ESR、NMR) の検出が可能である。このようなすぐれた磁気共鳴法に DNP 測定を組み合わせることが可能になれば、NMR 測定的大幅な高感度化が可能になる。しかし、これまでに MRFM と DNP を組み合わせた例は報告されていない。その理由として、これまでの MRFM 装置では、測定周波数が 10 GHz 程度に制限されており、ミリ波領域での ESR 測定に対応していないことが挙げられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまで開発してきたミリ波・テラヘルツ波領域でのカンチレバー検出 ESR 測定法をベースに世界でも初めてとなる DNP-MRFM 装置の作製に向けた技術開発を行う。そのため、ミリ波・テラヘルツ波領域におけるカンチレバー検出 ESR 測定の感度をさらに向上し、生体試料への応用を目指す。さらに、Wバンド (94GHz) での DNP-MRFM に向けた、ミリ波・RF 波測定系を構築し、これまでにないコンパクトな DNP 測定系を構築する。

生体試料のように分子量が大きく、スピン濃度が薄い系では ESR 信号の検出にはさらなる感度向上が必要不可欠である。本研究ではカンチレバー変位検出感度の向上、超低バ

ね定数カンチレバーの作製など個々の要素技術の改善により高感度化を進める。前者ではファイバー光学系を用いたカンチレバー変位の光検出技術開発を行う。また、後者については MEMS 技術を用いた微細加工によるカスタムカンチレバーの作製を行う。測定系の感度評価のため、実際に生体分子ならびにそのモデル分子に対しカンチレバー検出 ESR 測定を行い、その感度評価を行う。具体的には鉄イオンを含むヘムタンパク質であるミオグロビンやその活性中心であるヘミン分子を測定対象として取り上げる。

また、カンチレバーを用いた DNP 測定に向け、NMR 信号検出用 RF 測定系ならびに DNP 測定用ミリ波測定系の構築を行う。また、MRFM 測定のためには低温、強磁場中でも安定して動作する 3 軸ステージが必要になる。この目的のために、小型で安価なピエゾ駆動ステージの開発も行う。

本研究における最も独創的な点は、世界に先駆けてカンチレバーを用いた磁気共鳴力顕微鏡 (MRFM) と DNP 測定を組み合わせる点である。この特徴を活かして、MRFM 測定における DNP 測定を世界に先駆けて可能にすることを目指している。この技術開発により、将来的には天然存在比が小さく検出が困難な <sup>13</sup>C 核スピンのナノスケール NMR 測定への道を拓く。

## 3. 研究の方法

(1) カンチレバーによる力検出の高感度化  
金属タンパク質のように分子量が大きく、スピン濃度の薄い試料では試料全体からの ESR 信号が小さく、これまで以上に高い測定感度が求められる。また、NMR 測定では、核の磁気回転比が電子スピンの 1/1000 しかないため、やはり同様の高感度が重要になる。この目的のために、ファイバー光学系を用いた Fabry-Perot 干渉計方式を採用する。これにより磁気共鳴に起因する微小な力によるカンチレバー変位を高感度に検出可能にする。また、信号強度を上げるためには、試料位置における磁場勾配を大きくするのが有効である。これまで勾配磁石としてフェライトを用いてきたが、より高い飽和磁化をもつジスプロシウムやネオジム磁石などが有効であると考えられる。こういった改良により、従来に比べ 2 桁以上の感度向上を目指す。

### (2) カスタムカンチレバーの作製

検出感度の向上には測定系の改良に加え、カンチレバー自身の改良が必要不可欠である。これまでは市販のカンチレバーを用いてきたが、市販のカンチレバーは原子間力顕微鏡用途に最適化されたものであり、我々の測定に最適化されたものではない。特に、カンチレバーの感度を決めるばね定数には制限があり、0.01 N/m 以下のバネ定数をもつカンチレバーで低温下においても使用できるものは存在しない。そこで、本研究では超低バ

不定数カンチレバーの作製を行うことでカンチレバー検出 ESR 測定 of 感度向上を目指す。SOI 基板と呼ばれる基板を用いることで、少ない工程数でのカンチレバー作製が可能になる。実際、極薄カンチレバーを作製し、その性能評価を行うとともに実際の ESR 測定へと応用し、その感度を評価する。

### (3) DNP-MRFM 測定系の構築

カンチレバーに貼り付ける試料の大きさは数十マイクロン程度の大きさであることから、RF コイルも直径が 1 mm 程度で十分となる。そのため 1 W 程度の RF 出力で十分核スピン系を飽和させることが可能となる。

NMR 信号の検出には interrupted cyclic adiabatic と呼ばれるシーケンスを用いる。この測定ではカンチレバーの振動周期に同期した RF 信号を印加し、その間に RF 周波数を高速で掃引させる。すると、RF 周波数が NMR 共鳴条件を通過する際、adiabatic rapid passage により核スピンの反転し、カンチレバーに周期的な力を及ぼす。この力を検出することで NMR 信号を得ることができる。このようなパルスシーケンスを自動で行う自動測定プログラムを LabVIEW により作成する。

また、本研究では DNP 用のミリ波光源として AMC (active multiplier chain) とよばれる通倍増幅器を用いる。AMC により 90-96 GHz の範囲で 200 mW 程度の周波数可変なミリ波を得ることができる。この信号をさらにミリ波増幅器で増幅し 1 W 程度のミリ波強度を実現する。

### (4) 高周波 MRFM 測定

低温、強磁場中でも安定して動作する 3 軸ステージが MRFM には必要不可欠である。狭い試料空間内に収まり、かつ、ナノメートルオーダーの位置制御を可能にするためには stick-and-slip 方式の piezo 駆動ステージが適している。また、10 T を超える強磁場中での使用が想定されるため、すべてのパーツを非磁性にすることが望ましい。このような小型ステージは特殊であり、本研究では将来的な需要も考慮して、3 軸ステージの自作並びに評価を行う。作製した piezo 駆動ステージを用いて実際に空間分解能 ESR 測定を行い、その性能評価を行う。

## 4. 研究成果

### (1) カンチレバーによる力検出の高感度化

カンチレバーによる力検出感度の向上のため、測定系の改良を行った。まず、光ファイバー光学系を用いた Fabry-Perot 干渉計方式によるカンチレバー変位計測システムを構築した。光源として波長可変レーザーを用いることで機械的な駆動機構を用いることなく共振器長の最適化が行える。この改良により測定系は大幅に小型化することができ、また、構造の簡略化、小型化による熱ドリフトの大幅な低減につながった。実際に 4.2 K での熱雑音スペクトルの解析からカンチレバ

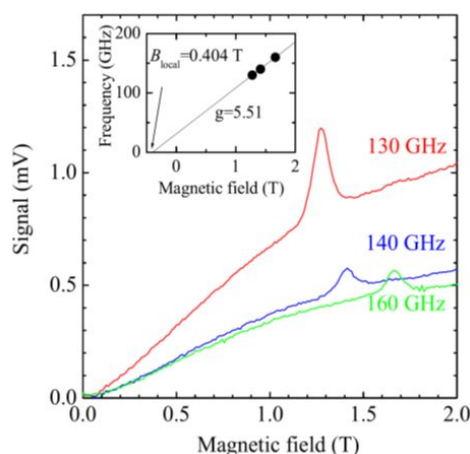


図 1: 波長フィードバックによるヘミンの高ダイナミックレンジ測定

ー変位の雑音レベルは  $0.1 \text{ pm/Hz}^{1/2}$  という値を実現した。また、カンチレバーに働く力の大きさを大きくするために勾配磁石をフェライトからジスプロシウムへと変更した。この改良により試料位置における磁場勾配の値が 1 桁以上増大し、力検出感度が改善した。

また、Fabry-Perot 検出ではダイナミックレンジが小さいという欠点があるが、本研究では共振器長を一定に保つために波長フィードバックを行い、ダイナミックレンジを 1 桁以上拡大することに成功した (図 1)。これによりバックグラウンドの磁化が大きく、これまで測定が困難であったような測定に試料に対しても適用が可能になった。この手法を用いることで後述するヘミンの高周波 ESR 測定を行った。

### (2) カスタムカンチレバーの作製

検出感度の向上には測定に用いるカンチレバーそのものの感度向上が必要不可欠である。そのため、バネ定数の小さいカンチレバーが望ましいが、市販のカンチレバーではカンチレバー全面に金属コートがなされているため、冷却過程でカンチレバーが反ってしまうという問題が生じる。そこで本研究では、反射ミラー部を持った厚さ  $2 \mu\text{m}$  と  $0.3 \mu\text{m}$  のカンチレバーの自作を行った。本研究では SOI 基板と呼ばれる特殊基板を用いて MEMS プロセスにより自作カンチレバーを作製した。

本研究では将来的な使用用途も加味し、光

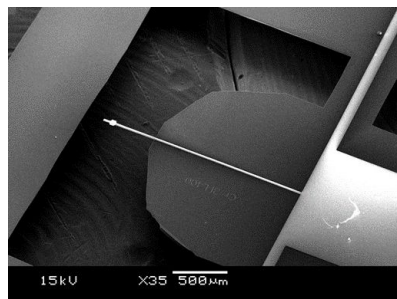


図 2: 自作した光検出型カンチレバー

検出用カンチレバー、 piezo抵抗検出カンチレバー、静電容量検出カンチレバーの3種を作製した(図2)。厚さ2  $\mu\text{m}$ のものについてはすべてのカンチレバーで作製に成功し、実際に高周波 ESR 測定による感度評価も行った。その結果、160 GHz までの ESR 信号取得に成功した。一方で0.3  $\mu\text{m}$ のものについてはプロセス時の残留応力によりカンチレバー完成時に反ってしまうという問題が生じた。この問題については、今後も引き続き取り組む必要がある。

### (3) DNP-MRFM 測定系の構築

カンチレバーを用いた NMR 信号の検出に向け RF 測定系の構築を行った。カンチレバー直近に微小なコイルを配置し、adiabatic rapid passage の繰り返し周波数をカンチレバーの固有振動数に一致させることで信号検出を行った。RF パルスシーケンスはマイコンまたは FPGA を用いた RF 制御系により発生した。

実際にカンチレバーに試料を載せてテストを行ったところ、RF 測定系は当初の予定通り動作することを確認できた。しかし、NMR 信号の検出には至らなかった。その理由としてテスト測定に用いたカンチレバーは市販のものであり、バネ定数が0.1 N/m程度と大きかった点が挙げられる。そのため、NMR 信号の検出にむけては MEMS 技術による自作の超低バネ定数カンチレバーが必要になるものと思われる。

また、ミリ波光学系についても、マイクロ波発振器、PIN スイッチ、AMC の光学系を配置した。これにミリ波増幅器と周波数通倍器を組み合わせることで90-96 GHz帯では1 W程度、180-192 GHzでは200 mW程度のミリ波を得ることが可能になった。

### (4) 高周波 MRFM 測定

低温、強磁場中での MRFM 測定に向け、3軸 piezo駆動ステージの開発を行った。piezo素子と連結したサファイア上をステージが stick-and-slip 機構により滑る構造をしている。構造体をすべて非磁性の真鍮で作製したことで磁場中での動作を可能にしている。piezo素子は低温では能力が低下することが知られているが、本研究では4.2 Kにおいても piezo素子に数十 V の電圧印加で動作することを確認した。印加電圧にもよるが、低温での最小駆動距離は数十 nm と見積もられたことから、高い精度での空間分解能かつ長いストローク(2 mm)を同時に達成することに成功した。

続いて、磁気チップを貼り付けたカンチレバーを自作した piezo駆動ステージに搭載し、実際に ESR 信号の取得を行った。測定試料には ESR 標準試料の DPPH を用いた。測定結果から、磁気チップと試料の位置が変化することにより ESR 信号強度の変化を観測できた。これにより、低温強磁場中でも piezo駆動ステージの動作が確認できた。今後は3軸ステージとの組み合わせにより3次元空間

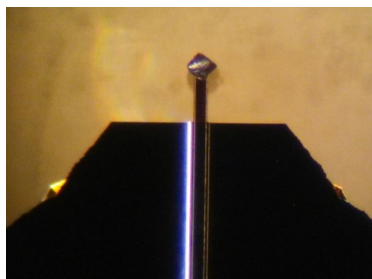


図3:試料を貼り付けたカンチレバー

分解能 ESR 測定を行う。

### (5) モデル金属錯体の高周波 ESR 測定

本研究では、金属タンパク質のモデル錯体である銅ポルフィリン錯体と鉄ポルフィリン錯体を取り上げて、高周波 ESR 測定を行った。特に、後者はヘムタンパク質の活性中心に当たるヘミン分子の測定を行った。

銅ポルフィリン錯体( $\sim 1 \mu\text{g}$ )(図3)では過去の文献値と一致する  $g=2.1$  付近の信号観測に成功した。測定周波数を変えながら測定を行うと、共鳴磁場は高周波側へとシフトしていくことから得られた共鳴は常磁性共鳴に起因するものであることが確認された。最終的には0.39 THz、15 Tまでの周波数-磁場領域をカバーすることに成功し、測定可能範囲を大きく拡大することができた。

また、ヘミンでは100 ngという超微量試料に対し高周波 ESR 測定を行い  $g=6$  の信号を0.5 THzまでの高周波領域で検出した。この信号はヘム面に対し平行に磁場を印加した場合の信号に対応している。ヘミンではゼロ磁場分裂と呼ばれる効果により測定周波数と磁場の関係は単純な比例関係にはならない(図4)。逆にこの関係を利用してヘミンのゼロ磁場分裂定数の見積を行った。その結果、 $D=6.9 \text{ cm}^{-1}$ となり、過去の文献値とよい一致を示した。検出感度としては $10^6 \text{ spins/G}$ となり、これまでの値に比べて約2桁の向上に成功した。この成果はカンチレバーを用いた高周波 ESR の生体応用に向けた大きな成果として位置付けることができる。

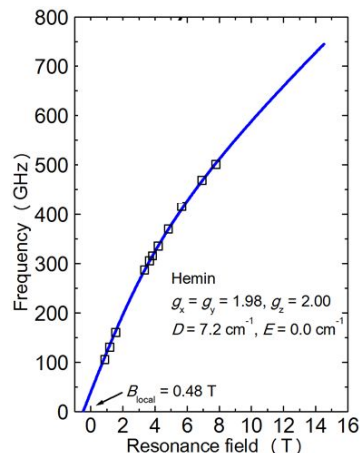


図4:ヘミンの高周波 ESR 測定から得られた周波数-磁場プロット



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7件)

Tsubasa Okamoto, Hideyuki Takahashi, Eiji Ohmichi, Hitoshi Ohta  
“Force-detected ESR measurements in a terahertz range up to 0.5 THz and application to hemin”、  
査読有  
Applied Magnetic Resonance **48** 435-444 (2017).  
doi: 10.1007/s00723-017-0872-2

E. Ohmichi, Y. Tokuda, R. Tabuse, D. Tsubokura, T. Okamoto, and H. Ohta  
“Multi-frequency force-detected electron spin resonance in the millimeter-wave region up to 150 GHz”、査読有  
Review of Scientific Instruments **87** (2016) 073904/1-9.  
doi: 10.1063/1.4959152

Hideyuki Takahashi, Tsubasa Okamoto, Eiji Ohmichi, and Hitoshi Ohta  
“Wide-dynamic-range cantilever magnetometry using a fiber-optic interferometer and its application to high-frequency electron spin resonance spectroscopy”、査読有  
Applied Physics Express **9** (2016) 126701/1-4.  
doi: 10.7567/APEX.9.126701

T. Okamoto, H. Takahashi, E. Ohmichi, and H. Ohta  
“Development of Ultrasensitive Terahertz ESR Spectroscopy for Metalloprotein Using a Microcantilever”、査読有  
Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves **37** (2016) 1173-1184.  
doi: 10.1007/s10762-016-0305-6

Eiji Ohmichi, Tsubasa Okamoto, Masaaki Mitani, Hideyuki Takahashi, Hitoshi Ohta  
“High-frequency electron paramagnetic resonance of metal-containing porphyrin compounds using a microcantilever”、査読有  
Journal of Inorganic Biochemistry **162** (2016) 190-193.  
doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.04.016

H. Takahashi, E. Ohmichi, and H. Ohta,  
“Mechanical detection of electron spin resonance beyond 1 THz”、査読有  
Applied Physics Letters **107** (2015) 182405/1-3.  
doi:10.1063/1.4935204

[学会発表](計20件)

大道英二、「メンブレン型ピエゾ抵抗センサーを用いた微小試料の磁気測定」、日本物

理学会、2017.3.18、大阪大学(大阪府)

Eiji Ohmichi, “Development of mechanically detected electron spin resonance technique”, Molecular Photoscience Research Center International Symposium “Recent Advances in Terahertz Molecular Science”, 2017.3.6, Kobe University (Hyogo)

大道英二、「カンチレバーを用いたテラヘルツ領域における電子スピン共鳴測定」、テラヘルツ技術セミナー「テラヘルツ分子科学の進展」、2016.10.26、ホテル北野プラザ六甲荘(兵庫県)

大道英二、「カンチレバーを用いた磁気共鳴法の現状」、西日本強磁場科学研究会、2016.9.12、福井大学(福井県)

大道英二、「光ファイバー光学系を用いたカンミール力測定装置の作製」、日本物理学会、2015.9.19、関西大学(大阪府)

大道英二、「バイメタルカンチレバーを用いた熱的検出高周波 ESR 測定法の開発」、日本物理学会、2015.3.23、早稲田大学(東京都)

大道英二、「マイクロカンチレバーを用いた超高感度高周波 ESR 測定」、日本物理学会、2015.3.22、早稲田大学(東京都)

E. Ohmichi, “Recent advances in cantilever detected ESR technique”, APES-IES-SEST2014, 2014.11.14, Todaiji Culture Center (Nara)

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者  
大道 英二 (OHMICH, Eiji)  
神戸大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：00323634

(2)研究分担者  
( )  
研究者番号：

(3)連携研究者  
太田 仁 (OHTA, Hitoshi)  
神戸大学・分子フォトサイエンス研究センター・教授  
研究者番号：70194173

(4)研究協力者  
( )