



# 多重極限環境下電子スピン共鳴分光によるヘム鉄の電子状態に関する研究

岡本, 翔

---

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2019-03-25

(Date of Publication)

2020-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7437号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007437>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

多重極限環境下

電子スピン共鳴分光による  
ヘム鉄の電子状態に関する研究

平成31年1月

神戸大学大学院理学研究科

岡本 翔



## Table of Contents

第 1 章 General Introduction	1
1-1 本研究の背景	2
1-1.1 金属タンパク質の研究	2
1-1.2 ヘムタンパク質の研究	2
1-1.3 ヘム鉄の電子状態研究	6
1-2 本研究の目的と本論文の構成	15
参考文献	18
第 2 章 Principle	21
2-1 ESR の原理	22
2-1.1 古典的解釈	22
2-1.2 量子論的解釈	26
2-2 市販 ESR 測定装置	27
2-3 ESR の強磁場・高周波数領域への拡張	29
2-4 透過型 ESR 測定法 (透過法)	32
2-5 力検出型 ESR 測定法	33
参考文献	36
第 3 章 Experimental	39
3-1 電磁波光源	40
3-1.1 Gunn 発振器	40
3-1.2 後進行波管 BWO	40
3-2 磁場	45
3-2.1 パルス磁石	45
3-2.2 無冷媒型 (ヘリウムフリー) 10 T 超伝導磁石	45
3-2.3 15 T 超伝導磁石	50
3-3 圧力セル	50
3-4 測定試料	52
3-4.1 ヘミンクロライド	52
3-4.2 アコメトミオグロビン	55
3-5 透過法 ESR 測定法で用いる電磁波検出器	56
3-6 カンチレバーとメンブレン	58

3-6.1	カンチレバー	58
3-6.2	メンブレン	59
3-7	Fabry-Perot 干渉計	61
3-8	ESR スペクトルのシミュレーション	65
	参考文献	68
第 4 章 Precise Determination of Zero-Field Splitting Parameters of Hemin by High-Field and High-Frequency Electron Paramagnetic Resonance		71
4-1	イントロダクション	72
4-2	実験方法	75
4-3	実験結果	77
4-4	考察	81
4-4.1	$g_{\text{perp}}$ 吸収のスプリットについての解釈と スピンのハミルトニアンパラメータの見積もり	81
4-4.2	$g_{\text{perp}}$ 吸収のスプリットが観測されなかった 周波数領域について	88
4-4.3	配位子場理論を用いた実験結果の解釈	89
4-4.4	量子化学計算を用いた実験結果の妥当性の検討	92
4-5	まとめ	94
	参考文献	95
第 5 章 Pressure Effect on Zero-Field Splitting Parameter of Hemin: Model Case of Hemoproteins under Pressure		97
5-1	イントロダクション	98
5-2	実験方法	101
5-3	実験結果	103
5-3.1	常圧下における強磁場・テラヘルツ EPR 測定の結果	104
5-3.2	圧力下における強磁場・テラヘルツ EPR 測定の結果	114
5-4	考察	121
5-4.1	圧力効果によるヘム鉄周囲の電子構造の変化と ゼロ磁場分裂定数 $D$ の関係	121
5-4.2	ヘムタンパク質や他の金属タンパク質・酵素への応用	124
5-5	まとめ	126
	参考文献	127

第 6 章 Force-detected ESR Measurements in a Terahertz Range up to 0.5 THz and Application to Hemin	131
6-1 イントロダクション	132
6-2 実験方法	135
6-2.1 実験のセットアップ	135
6-2.2 検出可能変位のダイナミックレンジ拡張	141
6-3 実験結果	148
6-4 考察	154
6-4.1 スピンハミルトニアンパラメータの見積もり	154
6-4.2 勾配磁石が作る磁場と磁場勾配の計算	155
6-4.3 スピン感度の見積もり	159
6-5 まとめ	161
参考文献	162
第 7 章 Force Detection of High-Frequency Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy of Microliter Solution Sample	165
7-1 イントロダクション	166
7-1.1 カンチレバーを用いた力検出型 ESR 測定法の問題点	166
7-1.2 メンブレン型デバイスを用いた磁気測定	168
7-2 実験方法	169
7-2.1 実験のセットアップ	169
7-2.2 メンブレン上の磁石が作る磁場勾配の見積もり	173
7-2.3 測定試料の作製	176
7-2.4 ESR の緩和時間に依存しない ESR 検出原理の提案	177
7-3 実験結果と考察	182
7-3.1 DPPH の ESR 測定結果と開発した装置の評価	182
7-3.2 新しい検出法の評価	192
7-3.3 溶液試料への応用結果	195
7-3.4 濃度感度の評価と開発した装置の位置づけ	201
7-4 まとめ	203
参考文献	205
第 8 章 Conclusion	207
参考文献	212

謝辞	214
Appendix	217
A1 ミオグロビンの取り扱いについて	218
A1-1 アコメトミオグロビン( $\text{Fe}^{3+}$ , $3d^5$ )溶液の調製・濃度決定方法	218
A1-2 アコメトミオグロビン( $\text{Fe}^{3+}$ , $3d^5$ )溶液の精製方法	230
A1-3 アコメトミオグロビン( $\text{Fe}^{3+}$ , $3d^5$ )単結晶育成方法	237
A2 大腸菌を用いたタンパク質の大量増量プロトコル (簡易版)	240
A3 DFT 計算を用いたヘミンクロライドの ゼロ磁場分裂定数の比 $ E/D $ の見積もりについて	262
A4 ハイブリッド型圧力セルを用いたヘミンクロライドの EPR 測定	274
A5 $\text{SiN}_x$ ナノメンブレンを用いた力検出型 ESR 測定法による カゴメ格子反強磁性体 $\text{KMn}_3\text{Ge}_2\text{O}_9$ および ヘミンクロライド粉末の強磁場・テラヘルツ ESR 測定	284
A5-1 カゴメ格子反強磁性体 $\text{KMn}_3\text{Ge}_2\text{O}_9$ の ESR 測定結果	284
A5-2 ヘミンクロライド粉末の EPR 測定結果	291
A6 溶液セル内部の電磁界解析シミュレーション	294
A7 熱的磁化変調を表す 7-9 式の導出	312

# 第 1 章

General Introduction



## 1-1 本研究の背景

### 1-1.1 金属タンパク質の研究

生体にとって金属イオンは生命活動の維持、および完全な生理機能活性を発揮する上で必要不可欠なものである。生体中に含有される金属イオンは様々あるが、特に遷移金属イオン V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn は生体にとって必須であり、これら遷移金属イオンの役割を調べることは生命現象の理解につながると言える。

遷移金属イオンの多くは、生体中のタンパク質と結合し、金属タンパク質、金属酵素（＝金属タンパク質に含まれる）と呼ばれる巨大分子として存在することで、生理的機能活性を生み出し、生命活動の維持に関わっている。

金属タンパク質の研究では、X 線による構造解析[1.1, 1.2]のほか、紫外・可視吸収分光[1.3]、ラマン分光[1.4]、メスバウアー分光[1.5]、核磁気共鳴[1.6]、電子スピン共鳴[1.7]など、多様な周波数帯域の電磁波を用いて盛んに行われている。このようにエネルギースケールの違う領域の情報を取り出すことで、様々な視点から金属タンパク質の研究を進めることが可能となる。その中でも電子スピン共鳴法（ESR）は、金属タンパク質分子中の遷移金属イオンおよびその周囲の電子状態をミクロスコピックな観点から詳細に調べることが出来る優れた手法である。ESR による物性研究が始まったのは 1940 年代であるが、初期の頃から生体物質の ESR 研究も始まった。はじめは植物の光合成過程で生じるラジカルの検出[1.8]、アミノ酸の  $\gamma$  線照射により生じるラジカルの検出と同定[1.9]、あるいは血液ヘモグロビン中へム鉄の検出と構造解析[1.10]などに応用され、多くの成果が得られた。

### 1-1.2 ヘムタンパク質の研究

金属タンパク質の中でも特に「ヘムタンパク質 (Hemoprotein)」と呼ばれる、鉄イオンを含有したタンパク質は、ESR による研究例が盛んな金属タンパク質の一つである。

動物の赤血球中に存在し酸素分子を肺から諸生体組織に運搬する役割を持つヘモグロビン (Hemoglobin、Hb)、筋肉中に存在し酸素分子の貯蔵に関わるミオグロビン (Myoglobin、Mb)、細胞内のミトコンドリア等に存在し炭水化物のエネルギーを利用してアデノシン三リン酸 (ATP) を合成する過程において一連の酸化還元反応を触媒する酵素のシトクロム (Cytochrome) 類、オキシドール ( $H_2O_2$ ) を分解する酵素のペルオキシダーゼ (Peroxidase)、カタラーゼ (Catalase) 等のタンパク質はすべてヘムタンパク質である。ヘムタンパク質は「ヘム」と呼ばれる補欠分子を有しており、ヘムが上述のような生体中における生理的機能活性の中心としての役割を担っていることが知られている[1.11, 1.12]。

図 1-1 に、ヘムの分子構造を示す。ヘムはプロトポルフィリン IX と呼ばれる環状構造が基本となっている。中心部の水素イオン二つが取り除かれて鉄イオンに置換されており、その鉄イオンは四つのピロール環と呼ばれる部分に存在する窒素原子と配位した平面的な構造をとっている。

図 1-2 はヘムタンパク質の代表例であるマッコウクジラ由来ミオグロビンの立体構造である[1.13]。タンパク質の中で初めて X 線構造解析により立体構造が解かれたのがマッコウクジラ由来ミオグロビンである[1.1, 1.14]。アミノ酸が配列することにより構成されたタンパク質分子のポケットにヘムが入り、周囲のアミノ酸残基との水素結合やクーロン相互作用等により支えられている。また鉄イオンは六配位まで可能であり、ヘムの軸配位子方向の一方(第五配位座)はヒスチジンのイミダゾールと呼ばれるアミノ酸残基の窒素原子と配位している。これが一般的なヘムタンパク質の持つ構造である。それぞれのヘムタンパク質によって、鉄イオンと配位子の距離や配位子の種類、配位数、またヘムの平面構造の歪みの大きさなど、鉄イオン周囲の環境は様々であり、こうした環境の違いがそれぞれのヘムタンパク質特有の性質を生み出していると言える。

ヘム中央に位置する鉄イオンのことは一般的に「ヘム鉄」と呼ばれる。例えば、生理的条件下においてヘモグロビン中のヘム鉄は  $Fe^{2+}$  の状態をとっており、第六配位座に酸素が配位したり、脱離したりすることが可能である。このことから、ヘモグロビンの酸素運搬のメカニズムを解明するためにヘム鉄周囲の電子構造を調べることは非常に有効であることが分かる。そのためヘモグロビンに限らず、様々なヘムタンパク質中のヘム鉄の電子状態について、これまで多

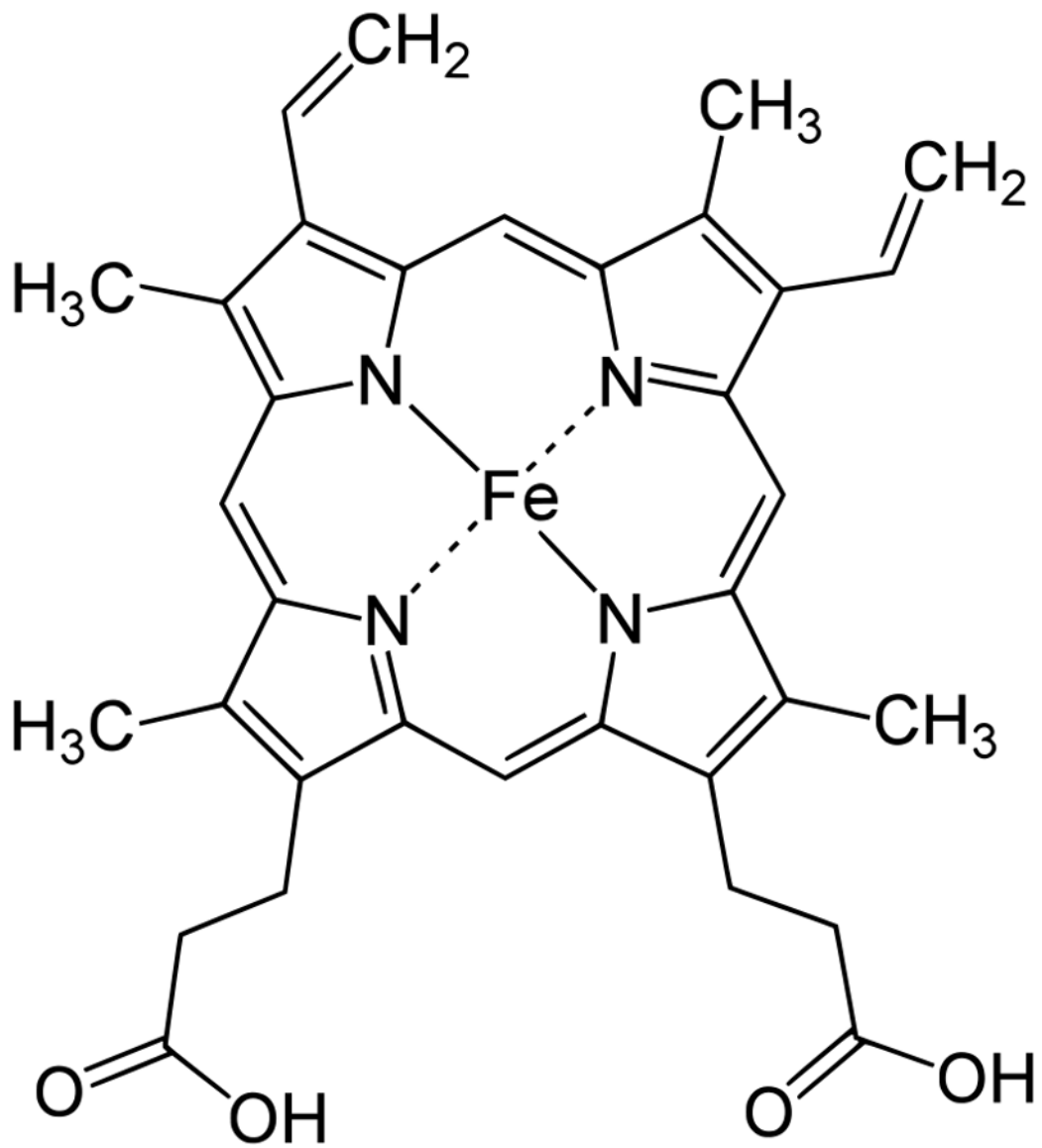


図 1-1 ヘムの構造。

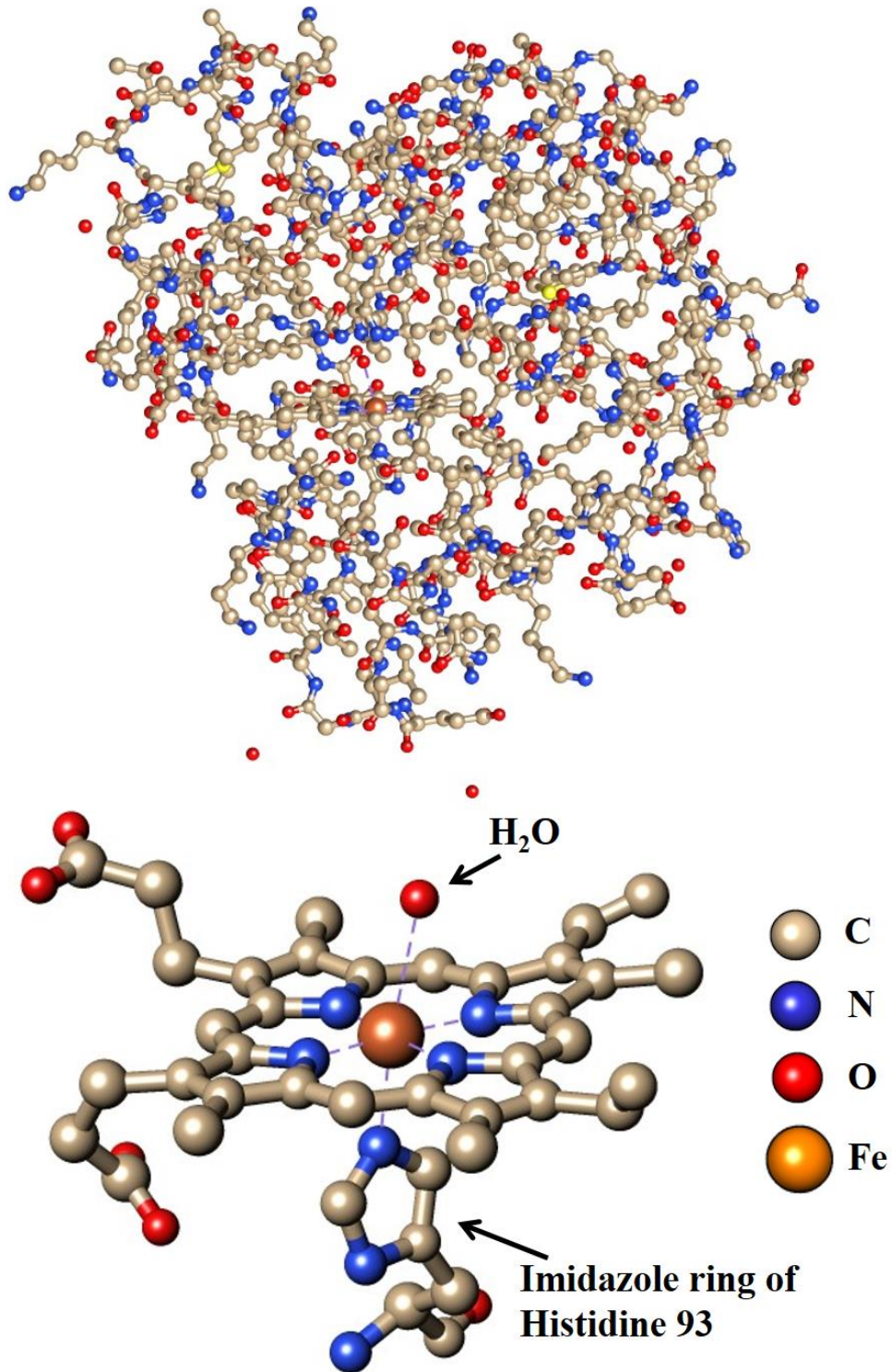


図 1-2 アコメトミオグロビンの分子構造の立体図[1.13]。上図はアミノ酸の  $\alpha$  ヘリックスも全て含めた構造、下図はヘム鉄と配位子に関連する部分を取り出した立体構造の図である。

数の研究者により精力的に研究されてきた[1.15, 1.16]。

### 1-1.3 ヘム鉄の電子状態研究

ヘムの電子状態に関する議論では、配位子場理論をもとに、ヘムの分光学的性質、磁氣的性質を実験的に調べることにより検証され、発展してきた。こうした実験的研究の中でも、可視・紫外における吸収スペクトルに関するものは主にヘムのポルフィリン部分の  $\pi$  電子系についての議論が可能となる。一方、ESR や磁化率等に関するものは主にヘム鉄イオンに束縛された  $3d$  電子系についての議論が可能である。ここではヘム鉄が持つ  $3d$  電子の磁氣的性質に関することを中心に、これまで調べられてきた点と、未だ解明されていない点について、研究の歴史とともに説明する。

ヘム鉄イオンは通常、還元型  $\text{Fe}^{2+}$  もしくは酸化型  $\text{Fe}^{3+}$  の状態で安定である。例えばミオグロビンやヘモグロビンは、生理的条件下では還元型（フェラス、ferrous）であり、ヘム鉄の第六配位座に  $\text{O}_2$  や  $\text{CO}$  などの分子が配位可能である。生体内では  $\text{O}_2$  が配位可能な状態が正常なヘム鉄であり、酸素を体内組織に供給することが出来る。しかし、例えば  $\text{CO}$  が配位すると  $\text{CO}$  の方が  $\text{O}_2$  よりもヘム鉄に対する親和性が高いため、ヘム鉄から  $\text{CO}$  が脱離することは困難となる。その結果、 $\text{CO}$  が配位していない、つまり  $\text{O}_2$  配位可能なミオグロビンやヘモグロビンの数が極端に減ってしまい、細胞が酸素不足に陥ってしまう。このことはヒトが一酸化炭素中毒になる理由として知られている。また還元型のヘモグロビンやミオグロビンでは、これらを体外に取り出すなどにより空気に触れさせると、ヘム鉄が容易に酸化し、酸化型（フェリ、ferric）に変化する。酸化型ヘム鉄には、 $\text{H}_2\text{O}$  分子のほか、 $\text{F}^-$ 、 $\text{N}_3^-$ 、 $\text{CN}^-$ 、 $\text{OH}^-$  などいくつかの陰イオンが配位可能である。 $\text{Fe}^{3+}$  や  $\text{Fe}^{2+}$  を磁性イオンとするヘム鉄の配位子場を議論する場合、鉄イオンはピロール環の四つの窒素原子と第五配位座のイミダゾール基の窒素原子そして第六配位座の配位子に囲まれた電場中（配位子場）に存在すると考える。還元型、酸化型ともに第六配位座に配位する分子、イオンの種類によって、配位子場が変化し、ヘム鉄が持つスピン状態も変化する。この配位子場により、自由な鉄イオンでは五重に縮退した  $3d$  軌道のエネルギー準位の縮退

が解けて分裂する。この配位子場分裂を調べることでヘム鉄の電子状態に関する議論が可能となる。これまで配位子場理論を用いて、ヘム鉄の電子状態の議論は発展してきた。次に、酸化型ヘム鉄を例に、ヘム鉄の電子状態研究の歴史を説明する。

$\text{Fe}^{3+}$ では、 $3d$ 軌道に五つの不対電子が存在する。配位子場に囲まれていない自由な  $\text{Fe}^{3+}$ イオンを考えると、基底状態はパウリの排他律に従って  $3d$ 軌道内の  $l_z = -2, -1, 0, +1, +2$ の各軌道に一つずつ、電子がアップスピンに向きを揃えて入っていく。このとき、合成軌道量子数と合成スピン量子数はそれぞれ  $L = 0, S = 5/2$ である。スピン多重項表記では  ${}^6S$ である。

次に、 $\text{Fe}^{3+}$ イオンを立方対称な配位子場（立方対称場）中に入れると、 $3d$ 軌道の各軌道の縮退が解け、新たに  $t_{2g}$  ( $d\varepsilon$ )軌道と  $e_g$  ( $d\gamma$ )軌道と呼ばれる二つの準位に分裂する。 $t_{2g}$  ( $d\varepsilon$ )軌道は  $d_{xy}, d_{yz}, d_{xz}$ 軌道の三重に縮退し、 $e_g$  ( $d\gamma$ )軌道は  $d_{z^2}, d_{x^2-y^2}$ 軌道の二重に縮退している。弱い配位子場中では、各軌道に一つずつ電子が入り、 $S = 5/2$ の高スピン (High-spin) 状態が基底状態となる。一方、配位子場が強くなると、 $t_{2g}$ 軌道と  $e_g$ 軌道間のエネルギー差 ( $\Delta = 10Dq$ )は徐々に大きくなり、ある強さのところで、エネルギーの高い  $e_g$ 軌道に電子を入れるよりも、二つの電子を同じ軌道に入れてクーロン反発による損を取る方がエネルギー的に安定となるため、五つの電子は全て  $t_{2g}$ 軌道に入る。このとき、 $S = 1/2$ の低スピン (Low-spin) 状態が基底状態となる。立方対称場中における  $3d^5$ 系のエネルギー準位については、田辺-菅野ダイアグラムから[1.17]、基底状態だけでなく他の励起状態同士の相対的なエネルギー準位の変化を配位子場の強さに応じて調べることが出来る。

配位子場理論を用いてヘム鉄の磁氣的性質を調べるために、これまで基底状態に着目した実験的検証が行われてきた。その一つの手法として磁化率測定が挙げられる。酸化型ヘム鉄は第六配位座にどのような配位子が配位しても、キュリー則に従う常磁性を示す。キュリー則から、常磁性体の磁化率は、

$$\chi = N \frac{\mu_{\text{eff}}^2}{3k_B T} \quad (1-1)$$

と書ける。ここで、 $N$ は単位体積当たりの磁性イオンの数、 $\mu_{\text{eff}}$ は有効磁気モーメント、 $k_B$ はボルツマン定数、 $T$ は温度である。 $M_{\text{eff}}$ を  $n = \mu_{\text{eff}}/\mu_B$  のようにボーア磁子の単位で書けば、

$$n = g_J \sqrt{J(J+1)} \quad (1-2)$$

と書ける。ここで、 $g_J$ はランダウの  $g$  因子である。磁気モーメントがスピンのみの寄与で生じていると考え、 $g_J=2$  となり、

$$n = 2\sqrt{S(S+1)} \quad (1-3)$$

となる。例えば、ミオグロビンの第六配位座にフッ素イオン  $F^-$  が配位したフルオロメトミオグロビン ( $Fe^{3+}$ ) では、常温において  $n=5.9$  で、 $S=5/2$  が期待される。一方、ヘモグロビンの第六配位座にシアン  $CN^-$  が配位した場合、常温において  $n=2.50$  で、 $S=1/2$  が期待される[1.18]。実際に、その後の ESR の結果から、酸化型のミオグロビン、ヘモグロビンにおいては、 $H_2O$  や  $F^-$  が配位した場合、 $S=5/2$  の高スピン状態が基底状態であり、 $N_3^-$ 、 $CN^-$  などが配位した場合、 $S=1/2$  の低スピン状態が基底状態となることが確認されている。一方、 $OH^-$  が配位した場合は、 $n$  の値が高スピン状態と低スピン状態の中間にあり、ミオグロビンで 5.10、ヘモグロビンで 4.47 である。このような値をとる理由としては、中間スピン  $S=3/2$  を想定するだけでは説明が困難であったが、1961 年に P. George らが、こうしたヘム鉄では  $S=1/2$  と  $S=5/2$  の状態どちらをも取りうる考え、その間に熱的平衡が成り立っていると仮定した。この仮定に基づくと、磁化率と光吸収スペクトルの結果を同時に説明出来ることが示された[1.19]。

磁化率測定については、初期の頃は常温での磁化率測定しか報告がなく、またその後もしばらくは常温から 20 K までの温度範囲でしか測定例が無かった。そのため磁化率測定からはヘム鉄の電子状態について詳細な知見が得られていなかった[1.20, 1.21]。1967 年に Tasaki らは、第六配位座に  $H_2O$  分子が配位したアコメトミオグロビン溶液の磁化率測定を常温から 4.2 K までの温度範囲で行い、低温になるにつれて磁気モーメントの大きさ自体が小さくなることを発見し、これは基底状態の  $S=5/2$  の微細構造（ゼロ磁場分裂）を反映した結果であることを示した[1.22]。

ゼロ磁場分裂は、ヘム鉄のおかれた配位子場の対称性を反映した磁気異方性であり、軸配位子方向の磁気異方性の大きさをパラメータ  $D$  で、ヘム鉄面内の磁気異方性の大きさをパラメータ  $E$  で表現する。ヘム鉄面内の磁気異方性は無視出来るほど小さいと仮定すると、ゼロ磁場分裂項  $DS_z^2$  を含めた磁場中のスピンハミルトニアンは、

$$H = 2\mu_B \mathbf{S} \cdot \mathbf{B} + DS_z^2 \quad (1-4)$$

と書ける。Tasaki らは有効磁気モーメントの大きさを理論的に計算した結果、アコメトミオグロビンの微細構造定数（ゼロ磁場分裂定数）が  $D = 10 \text{ cm}^{-1}$  程度であると結論付け、実験結果と良く一致することを報告した。また、極低温下での単結晶の磁化率測定から、磁化率の主値の温度変化に関する議論も報告されている[1.23]。

一方で、磁化率測定はマクロな物理量の測定であり、磁性イオン周囲の局所的な電子状態をミクロな観点から調べることは出来ない。これに対して ESR 測定はミクロな観点から局所的な電子状態の議論が可能であり[1.24]、ヘム鉄の電子状態の解明に大きく貢献してきた。ESR の詳しい原理の説明は第二章に記述するが、試料に照射した電磁波のエネルギーがある磁場  $B$  においてスピン系のエネルギー準位差と等しくなった時に試料中のスピン系によって電磁波のエネルギーが吸収される現象を ESR（もしくは EPR）と呼んでいる。本現象は、測定対象により呼び方が異なり、タンパク質などに含まれる常磁性スピン種の場合は EPR (Electron Paramagnetic Resonance)、反強磁性体の場合は AFMR (Antiferromagnetic Resonance)、強磁性体の場合は FMR (Ferromagnetic Resonance) と呼ばれ、こうした区別のない形で、ESR (Electron Spin Resonance) が用いられる。海外では NMR（核磁気共鳴）と対応させて EMR (Electron Magnetic Resonance) と呼ぶグループも存在する。ESR の共鳴条件式は、

$$h\nu = g\mu_B B \quad (1-5)$$

と書ける。ここで、 $\nu$  は電磁波の周波数、 $h$  はプランク定数である。共鳴が起きた周波数と磁場の関係から、 $g$  値を求めることが出来る。 $g$  値は、自由電子の  $g$  値 ( $g_e = 2.002316$ ) を用いると、



$$g = g_e + \Delta g \quad (1-6)$$

と書くことが出来る。そのため、自由電子の  $g$  値と観測する  $g$  値の差  $\Delta g$  に、着目するスピン周囲の局所状態を反映した情報が含まれることとなる。

$S = 1/2$  が期待される還元型のヘモグロビンやミオグロビンの ESR を X-band (~9.4 GHz) 帯において行くと、 $g$  値としては  $g \sim 2$  付近に ESR 吸収が観測される。Ingram らによるアザイドミオグロビン単結晶の測定が代表的な例として知られている[1.25]。ESR スペクトルの解析から  $g$  テンソルは三つの異なる主値を持ち、 $g_x = 1.72$ 、 $g_y = 2.22$ 、 $g_z = 2.80$  が得られている。立方対称場においては  ${}^2T_2$  と呼ばれる電子状態が基底状態 (=低スピン状態) であり、この電子状態ではどの軌道に電子スピンの二つ入るかによって異なる三つの状態： $(d_{xy})^2(d_{yz})^2(d_{xz})^1$ 、 $(d_{xy})^2(d_{yz})^1(d_{xz})^2$ 、 $(d_{xy})^1(d_{yz})^2(d_{xz})^2$  を取り得る可能性がある。 $g_x$ 、 $g_y$ 、 $g_z$  それぞれの  $g$  値が異なるということは、これら三つの状態間の縮退が解けていることを示しており、配位子場の対称性が立方対称から斜方対称に低下していることが示唆される。また配位子場理論と ESR 測定の結果から、各状態間のエネルギー差がどれくらいであるかを算出することが可能であり、結果として高スピン状態のミオグロビンよりも配位子場の斜方性が大きいことが示された。酸化型低スピン状態のヘム鉄では、Jahn-Teller 効果によりヘム鉄が斜方対称な配位子場中に存在する方が安定となるためか、もしくは軸配位子の影響が強く、配位子そのものの斜方対称性が表れているのではないかと考えられている。

$S = 5/2$  が期待されるヘモグロビンやミオグロビンの ESR 測定を X-band 帯において行くと、観測  $g$  値としては  $g \sim 2-6$  に対応する広い磁場範囲に ESR 吸収が観測されることが知られている。このように  $g \sim 2$  から大きく離れた  $g$  値を示す大きな磁気異方性は、前述のゼロ磁場分裂を反映している。ゼロ磁場分裂の面内異方性の成分も含めた磁場中のスピンハミルトニアンは、

$$H = \mu_B \mathbf{S} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{B} + D[S_z^2 - \frac{1}{3}S(S+1)] + E(S_x^2 - S_y^2) \quad (1-7)$$

と書ける。1957年に Bennett らによる酸化型ミオグロビン単結晶の ESR 測定か

ら、へム面内に磁場を印加すると  $g \sim 6$  に ESR 信号が観測され、へム面垂直に磁場を印加すると  $g \sim 2$  に ESR 信号が観測されることが報告された[1.26]。  $D$  値を  $10 \text{ cm}^{-1}$  程度としてスピンハミルトニアンを解くと、おおよそ  $g \sim 2-6$  の範囲に ESR 信号が観測されることがシミュレーションでも再現出来る。

ゼロ磁場分裂定数の見積もりは、へム鉄イオン周囲の電子状態を精密に知る手がかりとなる。そのため、先に示した Tasaki らの磁化率測定や Ingram らの ESR 測定のほか、多数の磁化率測定、ESR 測定に基づくゼロ磁場分裂定数の決定と電子状態の議論が行われてきた。1968 年に Uenoyama らは酸化型ミオグロビンの単結晶の磁化率測定を行い、 $D \sim 10 \text{ cm}^{-1}$  と報告した[1.27]。その後、1986 年には Brill らが ESR 測定によりゼロ磁場分裂定数の軸配位子方向の異方性と面内異方性との比  $|E/D| = 0.0028$  を報告した[1.28]。さらに 2004 年には Miyajima らによるアコメトミオグロビンの単結晶の多周波 ESR 測定から、 $D = 9.47 \text{ cm}^{-1}$  を報告している[1.29]。

このようにヘモグロビンやミオグロビンの磁化率測定や ESR 測定を中心に、ゼロ磁場分裂の研究が行われてきた。へム鉄に特徴的なことは、一般的な鉄錯体よりもゼロ磁場分裂定数  $D$  の値が異常に大きいことである[1.30-1.32]。また、同じ  $3d^5$  系である  $\text{Mn}^{2+}$  錯塩の  $D$  値は  $0.05-0.1 \text{ cm}^{-1}$  程度[1.33, 1.34]となっていることを考慮すると、へム鉄は他の錯体と比べても異常に大きな値を有する。このことは、へム鉄イオンが他の金属錯体と比べてかなり対称性の低い配位子場に置かれていることを示唆しており、その理由は配位子場理論を用いて説明されている[1.17]。正方対称場を考えた場合、基底状態は立方対称場の場合と同じく  ${}^6A_1$  であるが、励起状態は  ${}^4T_1$  と呼ばれる状態が  ${}^4A_2'$  と  ${}^4E'$  と呼ばれる状態に分裂する。これらは  $S = 3/2$  のスピン状態に対応しており、軌道角運動量もゼロではない。これらの励起状態がスピン-軌道相互作用を介して基底状態に混ざってくると、 $S_z = \pm 1/2, \pm 3/2, \pm 5/2$  間で混成の度合いが異なるために縮退が解け、ゼロ磁場分裂が生じる。へム鉄ではゼロ磁場分裂定数の大きさは  $5-10 \text{ cm}^{-1}$  程度となることから、基底状態が高スピン状態から低スピン状態にスピントロクロオーバーする直前あたりの強い配位子場に鉄イオンが置かれていると考えられている。このとき、励起状態  ${}^4A_2'$  と  ${}^4E'$  は、基底状態  ${}^6A_1$  から見て数千  $\text{cm}^{-1}$  程度のところまでエネルギー準位が下がってきていると考えられている[1.35]。

ESR と配位子場理論により、基底状態のゼロ磁場分裂に関わる励起状態のエネルギー準位を定量的な見積もることが出来たとしても、ゼロ磁場分裂を生み出す起源となる様々な化学的相互作用・効果の大きさを決定することは困難であり、より深くヘム鉄の電子状態を理解するためには理論的なアプローチも必須である。最近では量子化学計算によるヘム鉄のゼロ磁場分裂の起源を探る研究が活発に行われている。こうした計算では基本的にヘムタンパク質の生理的機能活性にかかわるヘム鉄の電子状態を探るので、周囲のタンパク質構造の影響は小さいと考え、しばしばポルフィリン構造および軸配位子のみを考慮して計算が行われる。こうした計算科学によるアプローチは F. Neese らを中心に研究が進められている。その結果、様々な金属錯体および金属ポルフィリン錯体のゼロ磁場分裂定数の推定が行われており、ほとんどの場合 ESR 等の分光学的実験結果との精密な一致が得られている[1.36, 1.37]。

しかし、ヘム鉄の仲間に含まれる鉄ポルフィリン錯体については、ゼロ磁場分裂定数のオーダーはおおむね合致しているが、精度よく一致していると言える段階には至っていない。ほかの金属錯体、鉄錯体と比べて異常に大きいゼロ磁場分裂の起源を説明する方法が確立すれば、実際のヘムタンパク質の電子状態の解析にも大いに貢献出来ることから、今後も計算手法の改良・新たな手法の確立が必要となってくる。そうした理論的アプローチの発展を推し進めるためには、並行して新しい実験技術・手法を発展させ、新しい物理的知見を提供していく必要がある。

ここまで酸化型ヘム鉄の電子状態に関する研究について、主にゼロ磁場分裂の大きさを見積もった実験報告例、理論計算によるアプローチについてまとめた。冒頭に述べたように、生体中のヘムタンパク質中のヘム鉄イオンは、その多くが還元型の状態で存在しており、還元型ヘム鉄の電子状態の研究の進展が望まれている。還元型ヘムは酸化型と同様安定な状態にあるので、様々な研究例が報告されている。還元型ヘムの研究例としてデオキシミオグロビンについて述べておく。デオキシミオグロビンは、ヘム鉄の第六配位子が無い五配位構造をとった種であり、高スピン状態  $S = 2$  である。磁化率測定や磁気トルク測定から、ゼロ磁場分裂定数  $D = 5.3 \text{ cm}^{-1}$  であることが 1970 年代に Nakano らにより報告されている[1.38, 1.39]。また 1980 年には Champion と Sievers により遠

赤外分光法を用いることで、ゼロ磁場分裂間でのスピンの遷移が観測されている[1.40]。その後、ESRによる検証も行われ、1989年にはHendrichらによってパラレルモード ( $\mathbf{k} // \mathbf{B}$ ) の条件下でデオキシミオグロビン溶液の X-band 帯の ESR 信号が観測されている[1.41]。しかし、ESRの結果からゼロ磁場分裂定数の絶対値を精密に決定するに足るデータはいまのところ得られていないのが現状である。これを実現するためには、彼らが観測した ESR モードを多周波数で観測するか、彼らが観測した ESR モード以外の遷移を観測しなければならない。このように還元型ヘムの ESR による研究は  $\text{Fe}^{3+}$ 酸化型ヘムと比べて進んでいない。その理由は、還元型ヘムは整数スピン系であり、Kramers 二重項が存在しないためである。ゼロ磁場分裂準位間のエネルギー差が異常に大きく、市販の X-band ESR 装置や W-band (94 GHz) ESR 装置では磁場範囲も 1-3 T 程度に限られており許容遷移の ESR 信号を観測出来ないという問題点がある (図 1-3)。また高スピン状態の還元型ヘムについては、スピンハミルトニアン取り扱いに関する議論は決着しておらず、それを解決する新たな実験結果が期待されている[1.41-1.43]。

また、酸化型  $\text{Fe}^{3+}$ から還元型  $\text{Fe}^{2+}$ へ還元される過程では、反応中間体のヘム鉄が生成され、 $\text{Fe}^{4+}$ や  $\text{Fe}^{5+}$ などの高酸化状態 (高酸化ヘム) をとることが知られている。こういった高酸化状態は一般的に不安定であり、高酸化状態を長時間維持するには極低温で反応を止める必要がある。また、高酸化ヘムは反応中間体であるため、試料精製時の収率が悪く、大量の測定試料を準備することは容易でない。そのため、高酸化ヘムのミクロな観点からの実験報告例は非常に少ない。特に ESR による高酸化状態のヘムタンパク質もしくはヘム鉄錯体の研究は報告例が全く存在しない。一方、ヘム鉄以外の高酸化状態の ESR 研究では、2008年に Krzystek らにより非ヘム鉄の TMC 錯体と N4Py 錯体 ( $\text{Fe}^{4+}$ ,  $S=1$ ) の強磁場・テラヘルツ ESR 測定が報告されているが、この一例のみである[1.44]。この報告の追試として、2018年に筆者や Horitani らのグループは Krzystek らが使用した TMC 錯体を奈良女子大学の藤井研にて作製し、強磁場・テラヘルツ ESR 測定を行った。その結果、Krzystek らの報告をほぼ支持するデータが得られたが (未発表データ)、信号の S/N が悪く、非常に難しい実験であった。モデル錯体でもこのような厳しい状況のため、実際のヘムタンパク質反応中間体

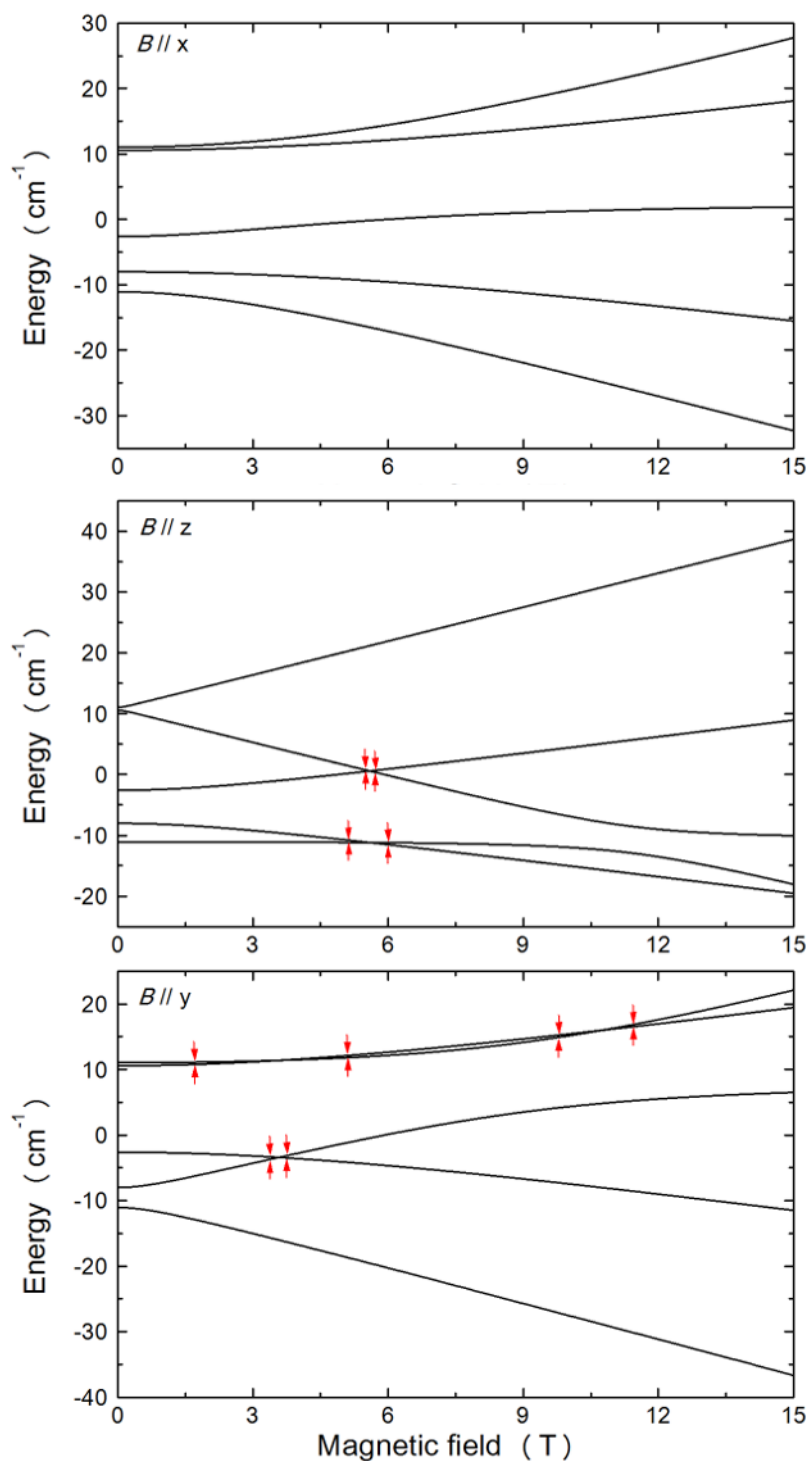


図 1-3 デオキシミオグロビン ( $S=2$ ,  $g_x = g_y = g_z = 2.00$ ,  $D = 5.3\text{cm}^{-1}$ ,  $E = 0.9\text{cm}^{-1}$ ) の  $B // x$  (上)、 $B // y$  (中)、 $B // z$  (下) における基底状態のエネルギー準位図。赤矢印は、X-band (9.4 GHz)の周波数に対応するエネルギー差を表している。

の強磁場・テラヘルツ ESR 測定は装置の感度が不十分であり、現状では困難であると考えられている。また、ヘム鉄錯体の反応中間体は TMC 錯体に比べて収率が非常に悪く、ESR 信号の観測を困難にしている要因となっている。このように反応中間体ヘム鉄の研究はほとんど進んでおらず、その電子状態の解明には新たな知見をもたらさうる新しい実験結果が求められている。

## 1-2 本研究の目的と本論文の構成

ここまで、ヘム鉄の電子状態に関するこれまでの研究状況について、特に磁氣的性質の観点から整理した。ヘムは、古くからよく知られた分子構造であるにも関わらず、ポルフィリン環の中心に位置する鉄イオン周囲の磁氣的性質について、明らかになっていないことが多く、ヘム鉄およびヘム分子の完全な電子状態の理解には至っていない。またヘムは、ヘモグロビンやシトクロム類など生命活動に欠かせないヘムタンパク質分子の補欠分子として存在し、しかも機能活性中心としての役割を担っている。そのため生命現象の包括的な理解のためにも未解決のヘム鉄周囲の電子状態を今後明らかにしていく必要がある。

ヘム鉄周囲の電子状態を調べるため、これまで配位子場理論に基づいた議論が数多く報告されている。この分野の長期的課題としては、特に高スピン状態ヘム鉄の異常とも言えるほど大きい「ゼロ磁場分裂」の起源を完全に解明する必要性が挙げられる。ヘム鉄のゼロ磁場分裂の起源を探る流れは、二十世紀後半に様々な実験的・理論的アプローチによって進められた。そして 1990 年代以降では、計算機科学の発展を背景に量子化学計算を用いた理論的アプローチが積極的に進められた。しかし最近では、ゼロ磁場分裂定数を精密に決定するためのアプローチの方法に行き詰まり感があり、新たな角度から研究を進めることで、ヘム鉄のゼロ磁場分裂に関する新規な知見を積み重ねていく必要がある。

ゼロ磁場分裂定数を精密に決定する上で一番有用な実験的手法は ESR である。特に、ヘム鉄のように大きなゼロ磁場分裂を持つ系に対して強磁場・テラヘルツ領域での ESR 測定手法が有効である[1.45-1.48]。そこで、本研究では強磁場・テラヘルツ ESR 測定法を主たる実験手法としてヘム鉄におけるゼロ磁場

分裂の起源に迫ることを研究目的とする。研究の遂行に当たっては、次に挙げる二つの軸を中心に研究を進めることにした。

- ① 従来のヘム鉄の研究にはなかった新たな視点からゼロ磁場分裂に関する情報を得ることを目指した。これまでのヘム鉄に対する ESR 研究は、極低温下および強磁場中での条件下で行われてきた。本研究ではこれまでの方法論をさらに拡張し、圧力という新しい物理パラメータに着目した。圧力は化学置換とは異なり、純粋に分子構造のみを連続的かつ可逆的に変化させることが可能である。そのため、制御性が高く、構造とゼロ磁場分裂の関係をより精密に抽出することが可能である。
- ② 強磁場・テラヘルツ ESR 測定装置の感度不足を解決するため、より高感度な強磁場・ESR 測定装置の開発を行うことをもう一つの軸として研究を行った。ESR 装置の感度が向上すれば、これまで感度不足で得ることの出来なかった知見・情報を新たに得ることが可能になる。特にヘムタンパク質では分子量が大きくスピン濃度が低いために限られた試料空間で十分な量のスピン数を稼ぐことが難しい。そのため、比較的分子量の小さなミオグロビンやヘモグロビンについても未だ観測出来ていない ESR モードが多数存在している。実際、アメリカのグループでは測定装置の感度不足からヘムタンパク質のゼロ磁場分裂に関する研究を事実上断念している。そこでヘム鉄、特にヘムタンパク質のゼロ磁場分裂間の ESR 遷移を観測可能な高感度な ESR 装置の開発を行う。このような装置が実現すれば、ヘム鉄のゼロ磁場分裂に関する研究の飛躍的な進展が期待される。

以上、これら二つの軸に沿って研究を進め、ヘム鉄の電子状態研究のための新しい実験方法論を確立することを本研究の目的とする。

本論文の構成は以下の通りである。第一章ではヘム鉄の電子状態に関する研究の歴史をまとめ、これまでの研究で残された課題や、解決すべき問題について述べた。第二章では、ESR の詳しい原理、強磁場・テラヘルツ ESR 測定のメリットについて述べた後、本研究で行った「透過型 ESR 法」と「力検出型 ESR 法」の原理について述べる。第三章では、本研究で用いた実験装置の概要とそれらの諸元についてまとめる。第四章では、ヘムタンパク質のモデル錯体「ヘミンクロライド( $\text{Fe}^{3+}$ )」と呼ばれる物質[1.49]の常圧下における強磁場・テラヘ

ルツ ESR 測定を行い、そこで得られたヘム鉄イオン周囲の電子状態に関する新しい知見について議論する。第五章では、印加圧力 2 GPa までの高圧下におけるヘミンクロライドのゼロ磁場分裂の大きさについて強磁場・テラヘルツ ESR 測定を用いて調べ、高圧下におけるヘミン分子の構造の変化と配位子場の関係をゼロ磁場分裂の観点から議論する。第六章では、新しい強磁場・テラヘルツ ESR 測定手法として「カンチレバーを用いた力検出型 ESR 測定法」の開発について述べる。これまでの本手法で課題となっていた点を改良したので、その評価を行った。さらにその改良された装置を「ヘミンクロライド( $\text{Fe}^{3+}$ )」の測定に応用した結果を踏まえ、本手法のメリットやデメリット、改善すべき課題について議論する。第七章では、第六章の測定手法では困難であった溶液試料への応用を念頭に開発した「メンブレンを用いた力検出型 ESR 測定法」について述べる。本手法では  $\mu\text{L}$  オーダーの「ヘミンクロライド( $\text{Fe}^{3+}$ )」および「アコメトミオグロビン( $\text{Fe}^{3+}$ )」の溶液試料に対して応用を行ったので、その実験結果と今後の発展について議論する。第四章から第七章までの議論を踏まえて、第八章では、これまでの研究成果をまとめ、本論文で提案する方法論が今後、酸化型だけでなく還元型や高酸化状態などあらゆるヘム鉄の電子状態に関する研究の発展にどのように貢献出来るのか、という観点から議論する。

本論文では、電子スピン共鳴の呼び方を、各章で取り扱う試料の種類を踏まえて変えることにする。

- ・第一章、第二章、第三章では ESR
- ・第四章、第五章では EPR
- ・第六章、第七章、第八章では、ESR と EPR を両方使用とする。



## [参考文献]

- [1.1] J. C. Kendrew, R. G. Parrish, Proc. Roy. Soc. London Ser. A **238**, 305 (1956).
- [1.2] M. Suga, F. Akita, K. Hirata, G. Ueno, H. Murakami, Y. Nakajima, T. Shimizu, K. Yamashita, M. Yamamoto, H. Ago, J.-R. Shen, Nature **517**, 99 (2015).
- [1.3] J. T. Groves, Y. Watanabe, J. Am. Chem. Soc. **110**, 8443 (1988).
- [1.4] T. Kitagawa, M. Nagai, M. Tsubaki, FEBS Lett. **104**, 376 (1979).
- [1.5] M.-E. Pandelia, N. D. Lanz, S. J. Booker, C. Krebs, Biochim. Biophys. Acta **1853**, 1395 (2015).
- [1.6] I. Morishima, S. Ogawa, T. Inubushi, T. Yonezawa, T. Iizuka, Biochemistry **16**, 5109 (1977).
- [1.7] D. J. E. Ingram, *Free Radicals as Studied by Electron Spin Resonance* (Butterworth Scientific Publication, London, 1958)
- [1.8] B. Commoner, I. Townsend, G. E. Pakec, Nature **174**, 689 (1954).
- [1.9] W. Gordy, W. B. Ward, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **41**, 983 (1955).
- [1.10] D. J. E. Ingram, D. Schonland, Disc. Far. Soc. **26**, 72 (1958).
- [1.11] R. Davydov, B. M. Hoffman, J. Biol. Inorg. Chem. **13**, 357 (2008).
- [1.12] S. Adachi, S.-Y. Park, J. R. H. Tame, Y. Shiro, N. Shibayama, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **100**, 7039 (2003).
- [1.13] D. Barrick, F. W. Dahlquist, Proteins **39**, 278 (2000).
- [1.14] R. E. Dickerson, *The Proteins* (Academic Press, New York, 1964).
- [1.15] M. Kotani, Ann. N. Y. Acad. Sci. **158**, 20 (1969).
- [1.16] Y. Harada, M. Taguchi, Y. Miyajima, T. Tokushima, Y. Horikawa, A. Chainani, Y. Shiro, Y. Senba, H. Ohashi, H. Fukuyama, S. Shin, J. Phys. Soc. Jpn. **78**, 044802 (2009).
- [1.17] 第10章 光スペクトル、「配位子場理論とその応用」(上村洗、菅野暁、田辺行人 著)、裳華房、1969年
- [1.18] L. Pauling, C. D. Coryell, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **22**, 159 and 210 (1936).
- [1.19] P. J. George, Beetlestone, J. S. Griffith, Rev. Mod. Phys. **36**, 441 (1964).
- [1.20] A. Ehrenberg, M. D. Kamen, Biochim. Biophys. Acta **102**, 333 (1965).
- [1.21] G. Schoffa, W. Scheller, O. Pistan, Acta Biol. Med. Ger. **3**, 65 (1959).

- [1.22] A. Tasaki, J. Otsuka, M. Kotani, *Biochim. Biophys. Acta* **140**, 284 (1967).
- [1.23] 小谷正雄、へム電子論、「量子生物学Ⅱ」(日本生物物理学会 編)、吉岡書店、1965年
- [1.24] A. Abragam, B. Bleaney, *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions* (Clarendon Press, Oxford, 1970).
- [1.25] J. F. Gibson, D. J. E. Ingram, *Nature* **180**, 29 (1957).
- [1.26] J. E. Bennett, J. F. Gibson, D. J. E. Ingram, *Proc. Roy. Soc. London Ser. A* **240**, 67 (1957).
- [1.27] H. Uenoyama, T. Iizuka, H. Morimoto, M. Kotani, *Biochim. Biophys. Acta* **160**, 159 (1968).
- [1.28] A. S. Brill, F. G. Fiamingo, D. A. Hampton, *J. Inorg. Biochem.* **28**, 137 (1986).
- [1.29] Y. Miyajima, H. Yashiro, T. Kashiwagi, M. Hagiwara, H. Hori, *J. Phys. Soc. Jpn.* **74**, 280 (2004).
- [1.30] R. D. Dowsing, J. F. Gibson, *J. Chem. Phys.* **50**, 294 (1969).
- [1.31] M. P. Hendrich, P. G. Debrunner, *J. Magn. Reson.* **78**, 133 (1988).
- [1.32] J. Krzystek, D. Smirnov, C. Schlegel, J. V. Slageren, J. Telser, A. Ozarowski, *J. Magn. Reson.* **213**, 158 (2011).
- [1.33] G. H. Reed, G. D. Markham, *Biological Magnetic Resonance*, edited by L. J. Berliner, J. Reuben, Vol.6, pp.73-142 (Plenum Press, New York, 1984).
- [1.34] A. Solano-Peralta, J. P. Saucedo-Vazquez, E. Roberto, H. Herbert, E. M. Hassane, G. M. Smith, M. E. Sosa-Torres, *Dalton Trans.* **9**, 1668 (2009).
- [1.35] M. Kotani, *Rev. Mod. Phys.* **35**, 717 (1963).
- [1.36] D. Ganyushin, F. Neese, *J. Chem. Phys.* **125**, 024103 (2006).
- [1.37] F. Neese, *J. Chem. Phys.* **127**, 164112 (2007).
- [1.38] N. Nakano, J. Otsuka, A. Tasaki, *Biochim. Biophys. Acta* **236**, 222 (1971).
- [1.39] N. Nakano, J. Otsuka, A. Tasaki, *Biochim. Biophys. Acta* **278**, 355 (1972).
- [1.40] P. M. Champion, A. J. Sievers, *J. Chem. Phys.* **72**, 1569 (1980).
- [1.41] M. P. Hendrich, P. G. Debrunner, *Biophys. J.* **56**, 489 (1989).
- [1.42] H. Hori, H. Yashiro, K. Ninomiya, M. Horitani, T. Kida, M. Hagiwara, *J. Inorg. Biochem.* **105**, 1596 (2011).

- [1.43] H. Hori, H. Yashiro, M. Hagiwara, *J. Inorg. Biochem.* **116**, 53 (2012).
- [1.44] J. Krzystek, J. England, K. Ray, A. Ozarowski, D. Smirnov, L. Que Jr., J. Telser, *Inorg. Chem.* **47**, 3483 (2008).
- [1.45] J. Krzystek, A. Ozarowski, J. Telser, *Coord. Chem. Rev.* **250**, 2308 (2006).
- [1.46] J. Telser, A. Ozarowski, J. Krzystek, *J. Biol. Inorg. Chem.* **19**, 297 (2014).
- [1.47] P. J. M. van Kan, E. van der Horst, E. J. Reijerse, P. J. M. van Bentum, W. R. Hagen, *J. Chem. Soc. Faraday, Trans.* **94**, 2975 (1998).
- [1.48] J. Telser, J. V. Slageren, S. Vongtragool, M. Dressel, W. M. Reff, S. A. Zvyagin, A. Ozarowski, J. Krzystek, *Magn. Reson. Chem.* **43**, S130 (2005).
- [1.49] W. S. Caughey, *Ann. Rev. Biochem.* **36**, 611 (1967).

## 第 2 章

Principle

## 2-1 ESR の原理[1.24, 2.1]

### 2-1.1 古典的解釈

はじめに古典的描像により磁場中におけるスピンの運動を考える。磁気回転比  $\gamma$  をもつ磁気モーメント  $\boldsymbol{\mu}$  が磁場  $\mathbf{B}$  の中に存在するとき、スピンの運動方程式は、

$$\frac{d\boldsymbol{\mu}}{dt} = \gamma[\boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}] \quad (2-1)$$

$$\gamma = g\mu_B \quad (2-2)$$

と書ける。いま、磁場が  $z$  方向に印加されていると考えると ( $\mathbf{B} = (0, 0, B_0)$ )、各成分表示では、

$$\frac{d\mu_x}{dt} = \gamma\mu_y B_0 \quad (2-3)$$

$$\frac{d\mu_y}{dt} = -\gamma\mu_x B_0 \quad (2-4)$$

$$\frac{d\mu_z}{dt} = 0 \quad (2-5)$$

と書ける。2-3 式 (2-4 式) を時間で微分し、それに 2-4 式 (2-3 式) を代入すると、

$$\frac{d^2\mu_x}{dt^2} = -\gamma^2 B_0^2 \mu_x \quad (2-6)$$

$$\frac{d^2\mu_y}{dt^2} = -\gamma^2 B_0^2 \mu_y \quad (2-7)$$

という関係式が得られることから、 $\mu_x$  と  $\mu_y$  は単振動をすることが分かる。よって、その単振動の振動数  $\omega_0$  は、

$$\omega_0 = |\gamma|B_0 \quad (2-8)$$

と求められる。2-6 式、2-7 式から、 $\mu_x$  と  $\mu_y$  は振幅が同じで、 $\pi/2$  の位相差があり、 $\mu_z$  は定数であることが分かる。つまり、磁気モーメントは  $z$  方向の成分を保ったまま磁場の方向 ( $z$  軸) を回転軸として回転運動をすることが分かる。このような回転運動は Larmor 歳差運動と呼ばれる。電子スピンの磁気回転比は負であるので、その回転は  $z$  軸正側から見て反時計回りである。

実際の試料中では、スピンは一個ではなくスピンの集団として存在している。磁気共鳴が起こる際は、均一な外部磁場が印加された中で全スピンの均一な電磁波照射を受け、エネルギーを吸収し励起される。そして、一定の緩和時間が経ったのちエネルギーを外部へ放出して熱平衡状態へと戻る。この現象を運動方程式で表してみる。個々のスピン間の相互作用は小さく、独立であると考えられる。磁場  $\mathbf{B}$  中に置かれた試料全体の磁化  $\mathbf{M}$  は、試料中の各スピンの磁気モーメント  $\mu_i$  の和であるので、

$$\mathbf{M} = \sum_i \mu_i \quad (2-9)$$

$$\frac{d\mathbf{M}}{dt} = \gamma[\mathbf{M} \times \mathbf{B}] \quad (2-10)$$

と書ける。これらの式より、熱平衡状態では各スピンの磁気モーメントが互いに打ち消し合うので、磁化の  $x$ 、 $y$  成分はゼロであり、 $z$  成分の  $M_z^0$  のみが有限の値を持つ。

電磁波を照射して磁気共鳴吸収が起こると、この式に緩和の項を追加する必要がある。一般的に、磁化  $\mathbf{M}$  の  $z$  成分  $M_z$  と、 $x$  もしくは  $y$  成分  $M_x$ 、 $M_y$  では緩和時間が異なる。そこで、 $z$  成分の緩和時間を  $\tau_1$ 、 $x$ 、 $y$  成分の緩和時間を  $\tau_2$  とする。このとき、磁化の  $x$ 、 $y$  成分と  $z$  成分についてはそれぞれ、

$$\frac{dM_{x,y}}{dt} = \gamma[\mathbf{M} \times \mathbf{B}]_{x,y} - \frac{M_{x,y}}{\tau_2} \quad (2-11)$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma[\mathbf{M} \times \mathbf{B}]_z - \frac{M_z - M_z^0}{\tau_1} \quad (2-12)$$

と書ける。これが Bloch 方程式である。ここで、 $\tau_1$  は縦緩和時間、 $\tau_2$  は横緩和時間と呼ばれる。

まず、 $\tau_1$  の物理的な意味について説明する。2-12 式の右辺第二項は、 $\tau_1$  は  $M_z - M_z^0$  が有限の値を持つとき、つまり熱平衡状態でないときに有限の値を持ち、熱平衡状態に達するとゼロになることが分かる。つまり、この項はスピン系と外界とのエネルギーのやり取りに関する項であり、 $\tau_1$  はそれを特徴づける時間であることが分かる。そのため  $\tau_1$  はスピン-格子緩和時間 (spin-lattice relaxation time) とも呼ばれる。

次に、 $\tau_2$  の物理的な意味について説明する。ある時刻に全スピンの回転運動の位相が一致していたとする。この時スピン間に相互作用が存在すると、スピンの持つ磁気モーメントがつくる磁場により周囲のスピンは互いに異なる磁場を感じるようになる。そのため各スピンの歳差運動の周波数は相互作用がない場合からわずかにずれる。これによりスピン同士の回転運動の位相が少しずつずれていき、十分時間が経つと x, y 方向の磁化の合計は平均化されゼロになる。このように  $\tau_2$  は回転運動の位相がばらばらになっていき平均化されるまでの時間を特徴づけている。そのため位相記憶時間、あるいはスピン同士の相互作用に依存するためスピン-スピン緩和時間 (spin-spin relaxation time) と呼ばれる。

次に、スピン系に対し外部から電磁波を照射している状況を考えて Bloch 方程式を解く。電磁波の振動磁場  $B_1 e^{i\omega t}$  は x 軸方向にかかっているとすると、スピンから見た外部磁場  $\mathbf{B}$  のベクトルは  $(B_1 e^{i\omega t}, 0, B_0)$  と表される。まず、x, y 成分の運動方程式は、

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma M_y B_0 - \frac{M_x}{\tau_2} \quad (2-13)$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma(M_z B_1 e^{i\omega t} - M_x B_0) - \frac{M_y}{\tau_2} \quad (2-14)$$

と書ける。 $M_x$ 、 $M_y$ の時間変化が  $e^{i\omega t}$  に従って周期的に変化すると考えると、これらの式は、

$$i\omega M_x = \gamma M_y B_0 - \frac{M_x}{\tau_2} \quad (2-15)$$

$$i\omega M_y = \gamma(M_z B_1 e^{i\omega t} - M_x B_0) - \frac{M_y}{\tau_2} \quad (2-16)$$

と表せるので、この二式を連立して  $M_x$ 、 $M_y$  について解くと、

$$M_x = \frac{\gamma^2 B_1 B_0 M_z e^{i\omega t}}{\gamma^2 B_0^2 + (i\omega + 1/\tau_2)^2} \quad (2-17)$$

$$M_y = \frac{\gamma B_1 M_z (i\omega + 1/\tau_2) e^{i\omega t}}{\gamma^2 B_0^2 + (i\omega + 1/\tau_2)^2} \quad (2-18)$$

となる。次に、z成分である  $M_z$  については、共鳴によるエネルギー吸収とスピン-格子緩和による散逸の兼ね合いにより、 $M_z$  が一定の定常状態となる。そこで、 $M_z$  の平均値  $\langle M_z \rangle$  を考えて、

$$\frac{d\langle M_z \rangle}{dt} = -\gamma B_1 \langle M_y e^{i\omega t} \rangle - \frac{\langle M_z - M_z^0 \rangle}{\tau_1} \quad (2-19)$$

とする。ここで、平均値を考えているので  $\langle M_z \rangle$  は時間変化しないと見なし左辺は 0 である。また  $\langle M_z \rangle$  は複素数なので実部だけを取り出し、 $\langle M_z \rangle$  について解くと、

$$\langle M_z \rangle = \frac{\{1 + (\omega - \gamma B_0^2)^2 \tau_2^2\} M_z^0}{1 + (\omega - \gamma B_0^2)^2 \tau_2^2 + \gamma^2 B_1^2 \tau_1 \tau_2} \quad (2-20)$$



と書ける。 $\gamma^2 B_1^2 \tau_1 \tau_2$  は飽和係数 (saturation factor) と呼ばれる。

## 2-1.2 量子論的解釈

ここまで、磁気共鳴が起こった際のスピンの運動について解析的に説明した。これは磁気回転比が負であれば電子スピンについての説明となるので、ESR に相当する。

次に、量子論的描像で ESR を説明する。例として、スピン  $S = 1/2$  の系を考える (図 2-1)。電子はアップスピンとダウンスピンの二つの状態を持っており、外部磁場  $\mathbf{B}$  が無い状態ではこの二状態が縮退している。この系に外部磁場を印加すると、ゼーマン効果により二状態の縮退が解けて、アップスピンとダウンスピンのエネルギー準位に差が生じる。この現象をゼーマン分裂と呼ぶ。電子スピンの磁気モーメント  $\boldsymbol{\mu}$  とゼーマン分裂後のエネルギー準位  $E$  はそれぞれ、

$$\boldsymbol{\mu} = -g\mu_B \mathbf{S} \quad (2-21)$$

$$E = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B} \quad (2-22)$$

と表される。ここで、 $g$  は  $g$  値、 $\mu_B$  はボーア磁子、 $\mathbf{B}$  は磁場である。よって、アップスピン  $S_z = 1/2$  (+) とダウンスピン  $S_z = -1/2$  (-) それぞれの持つ磁気モーメント  $\mu_{\pm}$  およびエネルギー準位  $E_{\pm}$  (ゼーマン準位) は、

$$\mu_{\pm} = \mp \frac{1}{2} g\mu_B \quad (2-23)$$

$$E_{\pm} = \pm \frac{1}{2} g\mu_B B \quad (2-24)$$

と表される。この系に、二準位間のエネルギー差に等しい周波数  $\nu$  の電磁波を照射すると、二準位間でスピン状態の遷移が起きる。これが ESR の原理である。この系における共鳴条件式は、

$$h\nu = g\mu_B B \quad (2-25)$$

と表される。SI 単位系において、ボーア磁子は  $\mu_B = 9.274009994 \times 10^{-24}$  [J/T]、プランク定数は  $h = 6.626070040 \times 10^{-31}$  [J · s]である。

ESR では、外部磁場に対して垂直方向に電磁波の振動磁場が印加されたとき、基本的に  $\Delta S_z = \pm 1$  の条件を満たす二準位間で磁気双極子遷移が起こる。このときの遷移確率  $w$  は、始状態を  $|i\rangle$ 、終状態を  $|i \pm 1\rangle$  として、

$$w = \frac{\pi}{2} (\gamma B_1^2)^2 \langle i \pm 1 | S_{\pm} | i \rangle^2 f(\omega) \quad (2-26)$$

と表される。ここで、 $f(\omega)$  は線型関数と呼ばれ、Gaussian 型の ESR 線型となるか Lorentzian 線型となるかなど、ESR の波形の情報を含んでいる。ダウンスピンからアップスピンの遷移する確率と、アップスピンからダウンスピンに遷移する確率は同じである。したがって、ESR の吸収強度は着目する二準位のスピンの分布数の差に比例する。 $S = 1/2$  の系を考えたとき、アップスピンの分布数  $N_+$  とダウンスピンの分布数  $N_-$  はボルツマン分布に比例するので、

$$N_{\pm} \propto \exp\left(-\frac{E_{\pm}}{k_B T}\right) \quad (2-27)$$

と表される。ここで、 $k_B$  はボルツマン定数、 $T$  は温度である。よってアップスピンとダウンスピンの分布数差  $\Delta N$  は、

$$\begin{aligned} \Delta N &\propto N_+ - N_- \\ &= \exp\left(-\frac{E_+}{k_B T}\right) - \exp\left(-\frac{E_-}{k_B T}\right) \end{aligned} \quad (2-28)$$

と表される。

## 2-2 市販 ESR 測定装置

図 2-2 に Bruker 社製の X-band ESR 装置の写真を示す[2.2]。市販されている ESR 測定装置は、主に空洞共振器（キャビティ）が用いられている[2.3]。周波

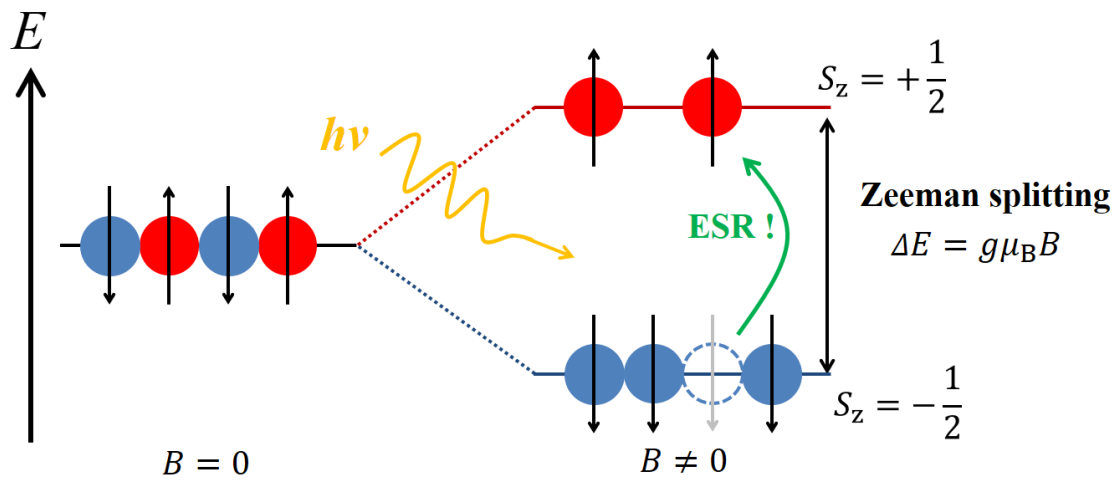


図 2-1 ESR の原理。左図は磁場を印加していない場合、右図は磁場中における電子のエネルギー準位。

Microwave source / Detector T-Monitor

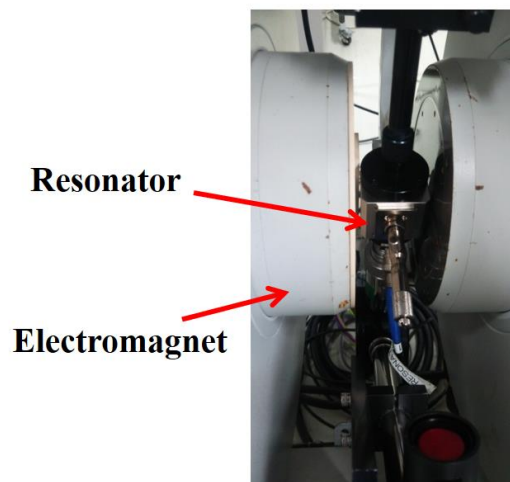
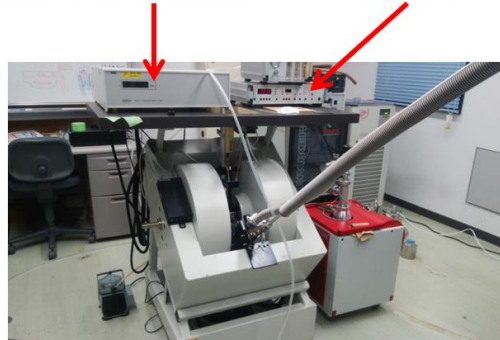


図 2-2 Bruker 社製 X-band ESR スペクトロメーター。

数領域としては X-band (9.4 GHz)、Q-band (34 GHz)、W-band (94 GHz)帯の装置が市販されている。X-band 帯 ESR 装置の場合、試料は外径 4 mm の試料管内もしくは試料棒の先端にセットし、それを空洞共振器の中央に配置する。マイクロ波を照射しながら磁場を掃引し、共振器内の Q 値 (Q-factor) をモニターする。ESR 吸収が起こると共振器内のマイクロ波のエネルギー損失が増大するため、共振器内の Q 値が変化して、ESR 吸収を検出することが出来る。共振器を用いているため、スピン感度として $\sim 10^9$  spins/gauss という高い値を実現している。X-band 帯では共振器を用いているため高い感度を得ることが出来るが、試料によってはスペクトル分解能が十分ではないというデメリットもある。その場合 Q-band、W-band といった測定周波数を高くすることで、分解能を上げることが出来る。X-band ESR に対して W-band ESR は共鳴磁場と周波数が 10 倍高いので、一般的に高周波 ESR と呼ばれている。高周波 ESR という言葉は、W-band 以上の周波数領域での ESR に対して用いられており、さらに 100 GHz 以上ではテラヘルツ ESR とも呼ばれる。次節では、共鳴磁場と周波数を高くすることで得られるメリットについて説明する。

### 2-3 ESR の強磁場・高周波数領域への拡張

X、Q、W-band といった周波数帯における ESR 測定に対して 10 T 以上の強磁場および 100 GHz を超えるようなミリ波、THz 帯の電磁波を用いた ESR を強磁場・テラヘルツ ESR 測定法 (High-field ESR、Terahertz ESR) と呼ぶ。ESR 信号の観測領域を強磁場や高周波数領域に拡張することで、<A> : 高いスペクトル (g 値) 分解能が得られる、<B> : 強い吸収強度が得られる、<C> : ゼロ磁場分裂など大きなエネルギーギャップ間遷移の観測が可能となる、等の利点が挙げられる。そのため、強磁場・高周波数領域で ESR 測定を行うことにより、X-band ESR 測定では観測不可能な ESR 信号を観測することが出来る [2.4-2.9]。以下に強磁場・テラヘルツ ESR 測定の利点を項目ごとに説明する。

<A> : 高いスペクトル分解能 (図 2-3)

二つ以上の g 値を持つ物質や複数の試料が混在している系では、それぞれの

$g$  値の差が小さい場合、低磁場・低周波数領域ではそれぞれの  $g$  値由来の ESR 信号が重なってしまい、分離出来ないことがある。共鳴条件の式 (2-25 式) から、強磁場・テラヘルツ領域において測定を行えば、共鳴磁場の値の差が大きくなり、各信号を分離して観測することが出来る。

<B> : 強い吸収強度

2-1.2 節で述べたように、ESR の吸収強度は着目する二準位のスピンの分布数差に比例する。強磁場中における分布数差  $\Delta N$  は、2-28 式を近似して、

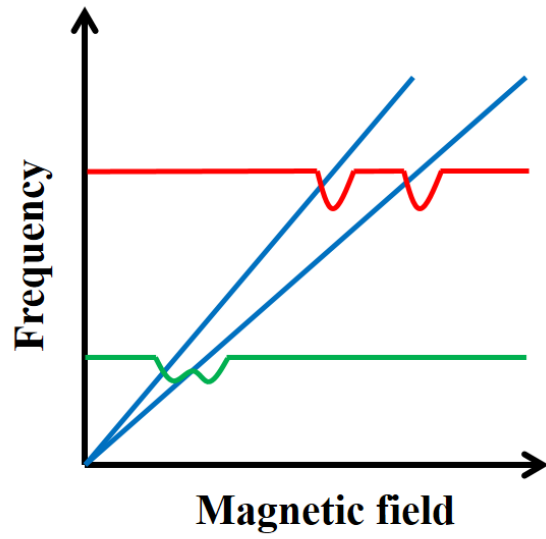
$$\begin{aligned} \Delta N &\cong 1 - \frac{E_+}{k_B T} - 1 + \frac{E_-}{k_B T} \\ &= 1 - \left( 1 - \frac{E_- - E_+}{k_B T} \right) \\ &\cong 1 - \exp\left(-\frac{\Delta E}{k_B T}\right) \end{aligned} \quad (2-29)$$

と表される。ここで、 $\Delta E$  はアップスピンとダウンスピンのエネルギー差 (ゼーマン分裂幅) である。よって、強磁場中であればあるほど、アップスピンとダウンスピンの分布数差が大きくなることが分かる。ESR の吸収強度はアップスピンとダウンスピンの分布数差に比例する。そのため強磁場を印加しゼーマン分裂幅  $\Delta E$  を大きくすればするほど、吸収強度は大きくなる。

<C> : ゼロ磁場分裂など大きなエネルギーギャップ間遷移の観測 (図 2-4)

スピンの  $S = 1$  以上の場合、ゼロ磁場分裂を持つ系が存在する。ヘム鉄はその代表例であり、強磁場・テラヘルツを用いることで、ゼロ磁場分裂間の ESR 遷移を観測することが可能となる。また、反強磁性体では、反強磁性ギャップと呼ばれるエネルギー分裂を持っており、この分裂間の遷移を観測するためにもしばしばテラヘルツが必要となる。

また、強磁場を用いる利点としては、広い線幅を持つ試料に対する ESR 測定が可能となること、磁気相転移前後での ESR 測定が可能となることが挙げられ



High-field & High-frequency



High-Resolution !

図 2-3 強磁場・テラヘルツ領域での高分解能 ESR 測定。

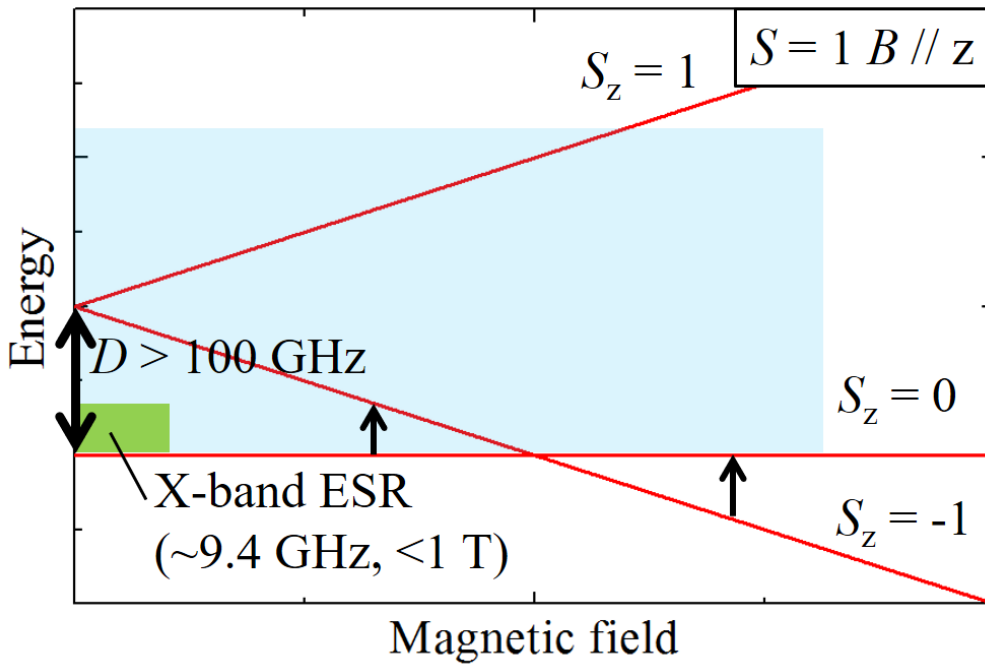


図 2-4 強磁場・テラヘルツ ESR による大きなゼロ磁場分裂の観測。

る。以下で簡単に説明しておく。

ESR 信号の線幅はスピン系が格子系にエネルギーを放出し平衡状態に戻るスピン-格子緩和や磁化の xy 成分（外部磁場に垂直な磁化成分）が熱平衡状態に戻るスピン-スピン緩和などの緩和過程・緩和時間によって決まる。一般に、緩和時間が短い系ほど線幅は広くなる。磁性体の試料では線幅が数 T に及ぶものがあり、そのような信号は X-band ESR 測定装置では対応出来ないため、強磁場領域における ESR 測定が必要となる。

また、磁気相転移とはある磁場で物質内部の磁気状態が変化する現象のことである。この磁気相転移を観測するためにはしばしば数 T 以上の磁場を印加する必要があるため、転移後の ESR 信号を観測するためには転移磁場以上の磁場を試料に印加する必要がある。

## 2-4 透過型 ESR 測定法（透過法） [2.4]

強磁場・テラヘルツ ESR 測定において空洞共振器を用いることは難しい。空洞共振器を使用する場合、共振器のサイズは照射する電磁波長程度でなければならない。300 GHz 以上の周波数では、共振器サイズが 1 mm 以下となり、共振器の作製が困難となる。また、空洞共振器摂動法では試料サイズが共振器内部空間に比べて無視出来るくらい小さい必要がある。そのため、共振器サイズが小さくなる高周波数領域では、必然的に試料サイズを小さくする必要があり、十分なスピン数が稼げなくなる。また、20 T を超えるパルス磁場中では、大きな渦電流（eddy current）が共振器の金属壁面に流れ発熱するため、空洞共振器を使用出来なくなる。これらの理由から、強磁場・テラヘルツ ESR 測定では一般に空洞共振器を用いない透過法と呼ばれる ESR 測定法が用いられる。

透過法では、ライトパイプ等を通して電磁波を試料に照射する。ESR 吸収に伴い透過する電磁波強度が減少するので、その減少量を光源の反対側に設置したミリ波検出器（In-Sb ディテクターなど）で測定することにより ESR 信号を得る。空洞共振器を用いた方法とは異なり試料量は数十 mg オーダーで搭載出来る。しかし、100 GHz を超えるテラヘルツ領域における光源の電磁波強度はおおむね 10 mW 以下であり、スピン感度は  $10^{12}$ - $10^{15}$  spins/gauss 程度となる。そ

のため、空洞共振器を用いた市販の X-band ESR や W-band ESR 測定装置に比べ検出感度は大幅に低下する。

## 2-5 力検出型 ESR 測定法

前節で述べたように、透過法の ESR 測定装置は空洞共振器を用いた測定法に比べて感度が劣る。測定感度を一桁でも高く出来れば、試料体積を 1/10 に減らすことが出来るため、生体分子や新しい磁性体物質の単結晶など、多量に作成することが難しい試料に対して有効である。透過型 ESR 測定法に代わる高感度な ESR 測定装置として、力検出型による ESR 測定法がある。力検出型 ESR 測定法では、ESR 信号を力に変換し、微小な力検出デバイスで感度よく測定するというものである。力検出のプロブとしてカンチレバーを用いた手法が有名である。現在は ESR だけでなく NMR や DNP (Dynamic Nuclear Polarization : 動的核偏極) の高感度検出にも応用されている[2.10-2.16]。

磁気共鳴を力として検出する原理としてはファラデー法[2.17, 2.18]が利用される (図 2-5)。ファラデー法は磁場勾配中で磁性体が受ける力を測定することにより磁化を検出する方法であり、磁気天秤とも呼ばれる。試料空間  $z$  軸方向に磁場  $\mathbf{B} = (0, 0, B_0)$  を印加したときの測定試料の磁化を  $\mathbf{M} = (M_x, M_y, M_z)$  とする。磁気ポテンシャル  $U$  は、

$$U = -\mathbf{M} \cdot \mathbf{B} \quad (2-30)$$

と表される。そのため、ポテンシャル  $U$  から受ける力  $F$  は、

$$\begin{aligned} F &= -\nabla U \\ &= M_z \frac{dB_z}{dz} \end{aligned} \quad (2-31)$$

となり、磁場勾配力は測定試料の  $z$  軸方向の磁化  $M_z$  と磁場勾配  $dB_z/dz$  の積の形で書ける。次にこの方法を用いて ESR 信号を検出する方法について以下で説明する。

まず、電磁波を照射していない場合における試料の磁化の  $z$  成分を  $M_z^0$  とす



ると、試料にはたらく磁場勾配力  $F_z^0$  は、

$$F_z^0 = M_z^0 \frac{dB_z}{dz} \quad (2-32)$$

と書ける。一方、外部から電磁波を照射している際の試料の磁化は 2-20 式で表されるため、この時の磁場勾配力  $F_z$  は、

$$\begin{aligned} F_z &= \langle M_z \rangle \frac{dB_z}{dz} \\ &= \frac{\{1 + (\omega - \gamma B_0^2)^2 \tau_2^2\} M_z^0}{1 + (\omega - \gamma B_0^2)^2 \tau_2^2 + \gamma^2 B_1^2 \tau_1 \tau_2} \frac{dB_z}{dz} \end{aligned} \quad (2-33)$$

と表される。そのため、電磁波を照射している場合と照射していない場合の磁化の  $z$  成分の差は  $\Delta M_z^{\text{Bloch}} = \langle M_z \rangle - M_z^0$  で与えられる。従って、共鳴時  $\omega = \gamma B_0^2$  と非共鳴時  $\omega \neq \gamma B_0^2$  の間での磁場勾配力の変化  $\Delta F_z$  は、

$$\begin{aligned} \Delta F_z &= \Delta M_z^{\text{Bloch}} \frac{dB_z}{dz} \\ &= \left\{ -\frac{\gamma^2 B_1^2 \tau_1 \tau_2}{1 + \gamma^2 B_1^2 \tau_1 \tau_2} M_z^0 \right\} \frac{dB_z}{dz} \end{aligned} \quad (2-34)$$

と表される。この  $\Delta F_z$  を検出することにより ESR 信号を観測することが出来る。

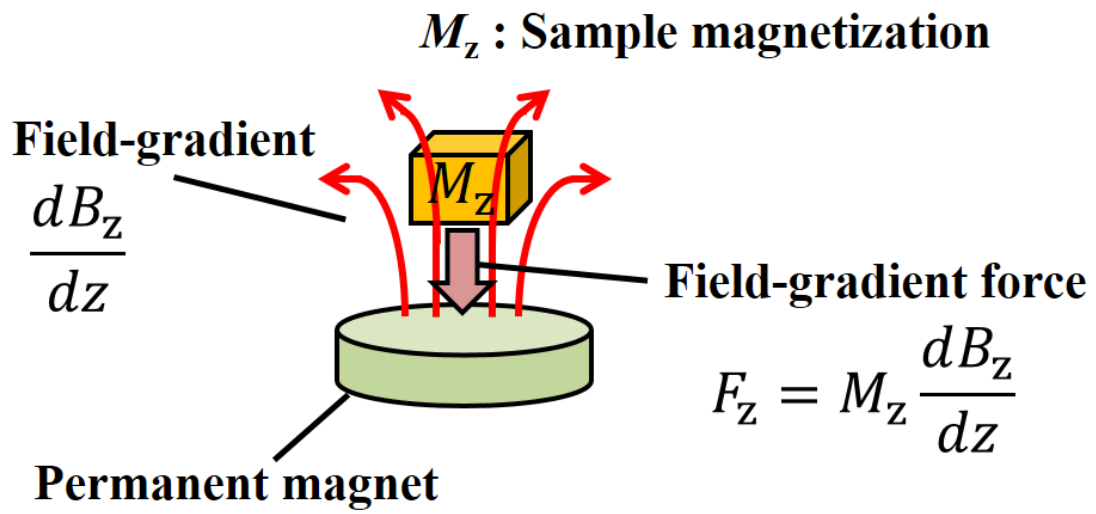


図 2-5 ファラデー法の原理。外部磁場によって z 方向に磁化した試料は、永久磁石が作る局所的な磁場勾配により、磁場勾配力を受けて永久磁石の方向に引き寄せられる。

## [参考文献]

- [2.1] 1.スピン共鳴序説、「電子スピン共鳴」(伊達宗行 著)、培風館、1978年
- [2.2] Dr. Ralph and T. Weber, EMX USER'S MANUAL: Manual version 1.0 (Bruker Instruments, Inc. 1995).
- [2.3] C. P. Poole, Jr., *Electron Spin Resonance*, 2nd edition (Dover, New York, 1996).
- [2.4] H. Ohta, S. Okubo, K. Kawakami, D. Fukuoka, Y. Inagaki, T. Kunimoto, Z. Hiroi, *J. Phys. Soc. Jpn.* **72**, Suppl. B 26 (2003).
- [2.5] G. Hanson, L. Berliner (Eds.), *High Resolution EPR, Application to Metalloenzymes and Metals in Medicine* (Springer, Berlin, 2009).
- [2.6] K. Möbius, A. Savitsky, *High-Field EPR Spectroscopy on Proteins and Their Model Systems: Characterization of Transient Paramagnetic States* (Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2009).
- [2.7] K. Möbius, A. Savitsky, A. Schnegg, M. Plato, M. Fuchs, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7**, 19 (2005).
- [2.8] H. Ohta, S. Imagawa, M. Motokawa, H. Tanaka, *J. Phys. Soc. Jpn.* **62**, 3011 (1993).
- [2.9] A. K. Hassan, L. A. Pardi, J. Krzystek, A. Sienkiewicz, P. Goy, M. Rohrer, L.-C. Brunel, *J. Magn. Reson.* **142**, 300 (2000).
- [2.10] C. E. Isaac, C. M. Gleave, P. T. Nasr, H. L. Nguyen, E. A. Curley, J. L. Yoder, E. W. Moore, L. Chen, J. A. Marohn, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **18**, 8806 (2016).
- [2.11] H. J. Mamin, R. Budakian, D. Rugar, *Rev. Sci. Instrum.* **74**, 2749 (2003).
- [2.12] Q. Lin, C. L. Degen, M. Tomaselli, A. Hunkeler, U. Meier, B. H. Meier, *Phys. Rev. Lett.* **96**, 137604 (2006).
- [2.13] J. M. Nichol, E. R. Hemesath, L. J. Lauhon, R. Budakian, *Phys. Rev. B* **85**, 054414 (2012).
- [2.14] C. L. Degen, Q. Lin, A. Hunkeler, U. Meier, M. Tomaselli, and B. H. Meier, *Phys. Rev. Lett.* **94**, 207601 (2005).
- [2.15] K. Wago, O. Züger, J. Wegener, R. Kendrick, C. S. Yannoni, and D. Rugar, *Rev. Sci. Instrum.* **68**, 1823 (1997).

[2.16] K. Wago, D. Botkin, C. S. Yannoni, and D. Rugar, Phys. Rev. B. **57**, 1108 (1998).

[2.17] 細越裕子、9.4 静磁化測定、「第5版 実験科学講座7 電気物性・磁気物性」(日本化学会 編)、丸善、2004年

[2.18] A. McCollam, P. G. van Rhee, J. Rook, E. Kampert, U. Zeitler, J. C. Maan, Rev. Sci. Instrum. **82**, 053909 (2011).



## 第 3 章

Experimental

## 3-1 電磁波光源 (Electromagnetic Wave Source)

### 3-1.1 Gunn 発振器

本研究では、260 GHz 以下の電磁波光源として、millitech 社の Gunn 発振器を用いた。図 3-1 に Gunn 発振器の写真を示す。Gunn 発振器は GaAs 等の半導体素子に高電場を印加することで、マイクロ波領域の発振が起こる Gunn 効果を利用した発振器である。図 3-1 に Gunn 発振器とその電源ボックスを示す。周波数ごとに決まった発振器と電源ボックスの組み合わせがある。電源ボックスには AM (振幅) 変調機能、FM (周波数) 変調機能が備えられている。変調周波数は、内部変調の場合は固定されており、AM 変調は 1 kHz の矩形波変調、FM 変調は 1 kHz の周波数で、発振周波数に $\pm 10$  MHz の周波数変調がかけられる。外部から変調周波数を制御するモードも備わっており、1 kHz だけでなく任意の変調周波数をかけることが出来る。ただし、およそ 10 kHz 以上の変調周波数では、電磁波出力が変調周波数に追随しなくなるため、変調強度が低下する。

我々の研究室では 30 GHz から 160 GHz の Gunn 発振器を所有している。表 3-1 に各周波数の Gunn 発振器の出力強度を示す。高周波の Gunn 発振器ほど出力強度は落ちる傾向にある。90 GHz から 130 GHz までの Gunn 発振器では、2 逡倍器を用いることが可能であり、出力は基本波の 1 割程度に落ちるが最高で 260 GHz までの発振が可能である。本研究では 80 GHz 以上の Gunn 発振器を測定に使用した。

### 3-1.2 後進行波管 BWO

本研究では 260 GHz 以上の高周波数領域の電磁波光源として、後進行波管 (Backward travelling Wave Oscillator) を用いた。図 3-2 に BWO の写真を、図 3-3 に BWO 内部の構造を示す。ヒーターを加熱するとカソード (陰極) から電子が放出される。カソード・アノード (陽極) 間に高電圧をかけておくことによって放出された電子はアノードに向かって加速する。左右の永久磁石は、電

表 3-1 Gunn 発振器の発振周波数と出力強度。

発振周波数 (GHz)	出力強度 (mW)
30	130
40	120
50	262
60	178
70	103
80	80
90	33
105	52
120	36
130	41
140	16
150	17
160	10
<2 逡倍器を用いた場合>	
180	4.1
210	5
240	1.44
260	4.9



表 3-2 BWO の発振周波数範囲と平均出力強度。

Tube Name	発振周波数範囲 (GHz)	平均出力強度 (mW)
OV30N1	200-385	15
OV24N2	143-722	100
OV32N4	248-548	8
OV80N5	445-722	4
OV81N6	657-815	0.5
OV82N7	730-957	3
OV83N8	858-1096	1
OV84N9	357-1180	4
OV24N10	186-260	40
OV36N13	115-169	20
OV30N64	197-388	40
OV32N831	180-556	25



図 3-1 Gunn 発振器の外観。

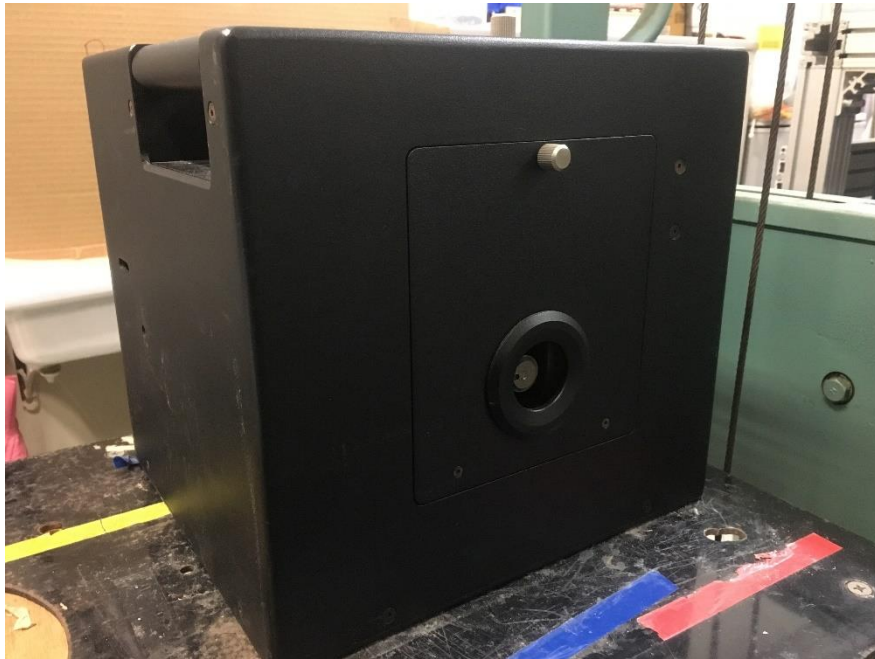


図 3-2 BWO の外観。

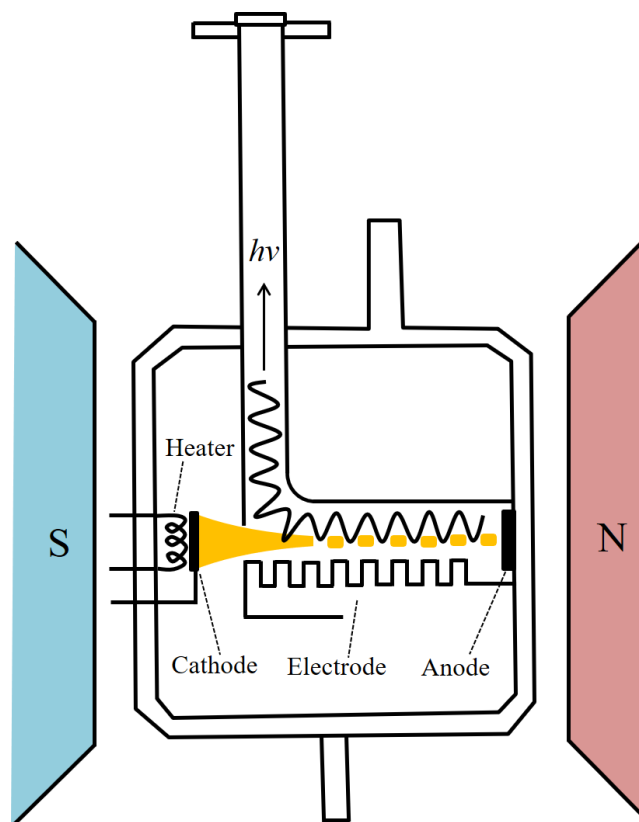


図 3-3 BWO の内部構造。

子線を絞る役割がある。加速された電子は、くし型の電極によって蛇行させられ、運動エネルギーの損失が起こる。その損失エネルギーは電磁波として放出され、導波管を通過して出てくる。くし型電極の幅が発振可能周波数に対応しており、カソード電圧を変えることにより発振周波数を準可変的に選ぶことが出来る。カソードにかけることの出来る電圧は 2000 V から 4000 V (もしくは 6000 V) である。高電圧がかかる結果、真空管全体は高温となるため、冷却水を循環させる装置 (チラー) が必要である。表 3-2 に研究室で所有する各 BWO の発振可能周波数と平均出力強度を示す。BWO 本体の選択により、最高で 1180 GHz までの発振が可能である。

## 3-2 磁場 (Magnetic Field)

本研究で用いた磁場発生方法について説明する。第四章ではパルス磁石、第五章では無冷媒型 10 T 超伝導磁石、第六章と第七章では 15 T 超伝導磁石を用いた。

### 3-2.1 パルス磁石

図 3-4 に本研究で用いたパルス磁石の写真を示す。磁場発生に用いるマグネット線材は銅線であり、磁場の均一性は、磁場中心において 0.1 %/1 cm 球程度である。23.4 kJ コンデンサバンク (図 3-5) に充電された電荷を 10 ミリ秒程度間にパルス磁石へと放電することにより最大で 16 T のパルス磁場を発生させることが出来る。コンデンサバンクとパルス磁石は LC 回路と等価であるため、放電による磁場の時間変化は正弦波形となる。そのため磁場掃引速度は時間的に変化しており、最大発生磁場付近では細かくデータ点を取得出来るが、低磁場では比較的粗くなる。

### 3-2.2 無冷媒型 (ヘリウムフリー) 10 T 超伝導磁石

図 3-6 に無冷媒型 10 T 超伝導磁石本体の外観写真を示す。この超伝導磁石で

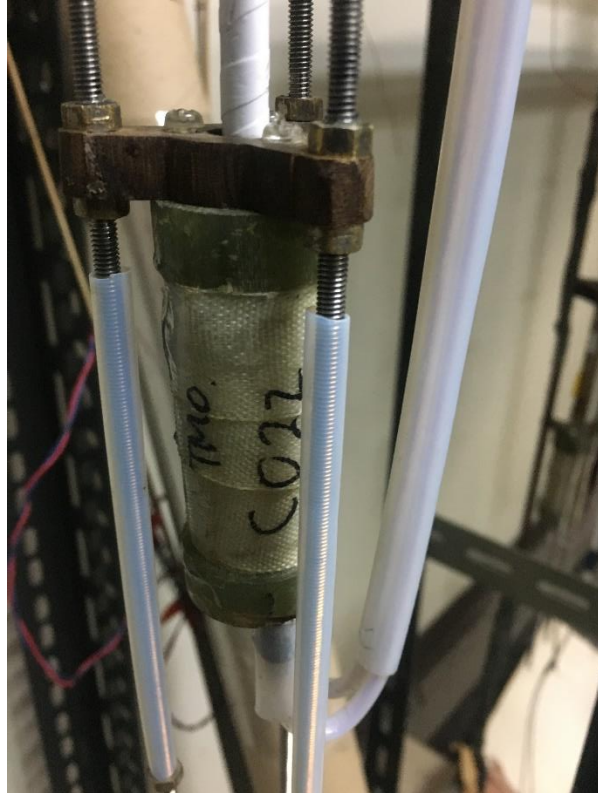


図 3-4 パルス磁場発生用のマグネット。

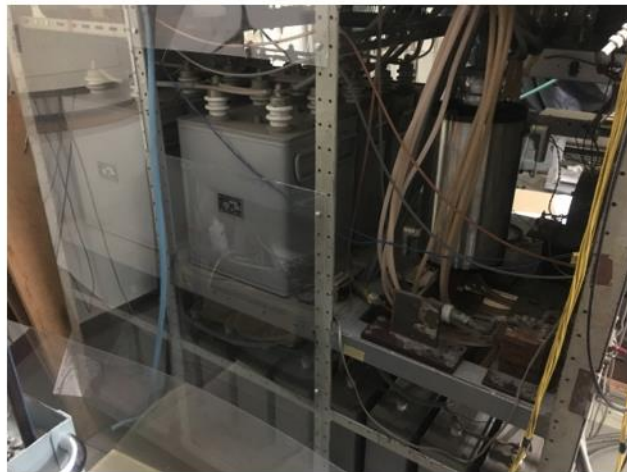


図 3-5 23.4 kJ コンデンサバンク。



图 3-6 无冷媒型 10 T 超传导磁石。

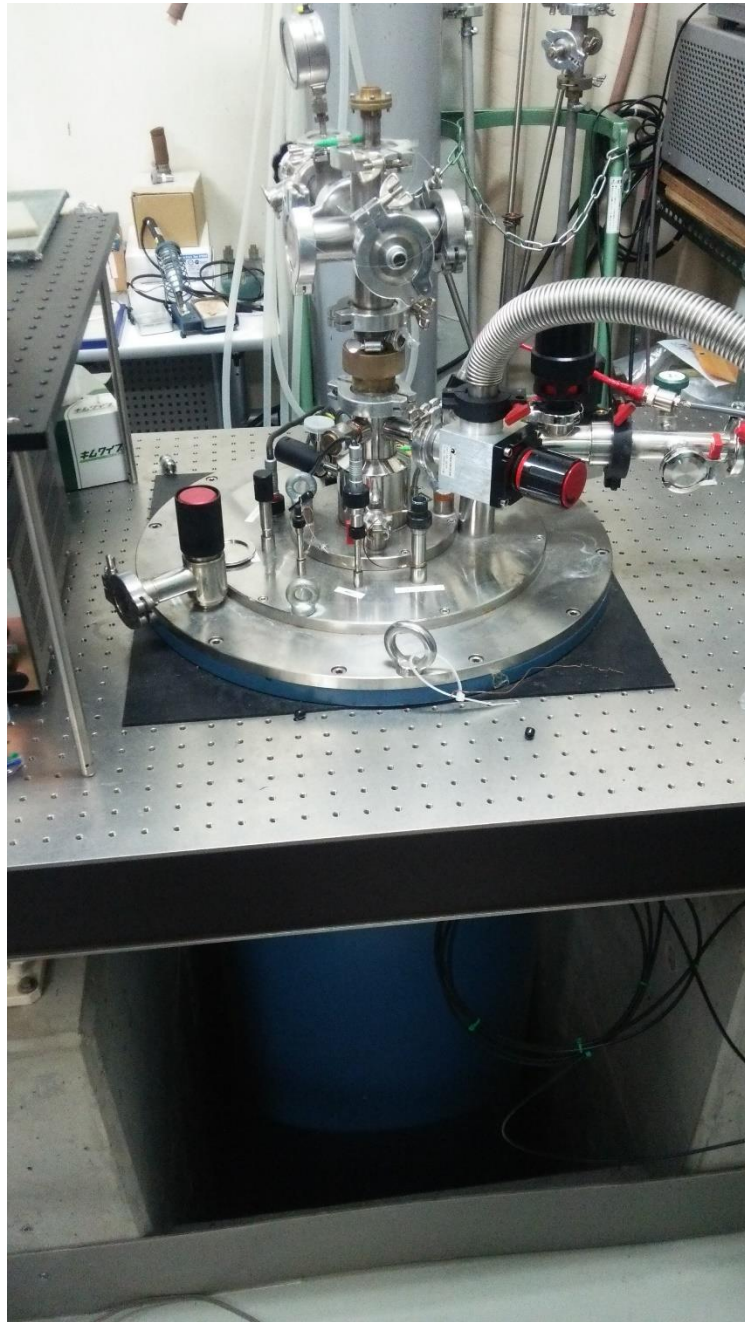


图 3-7 15 T 超伝導磁石。



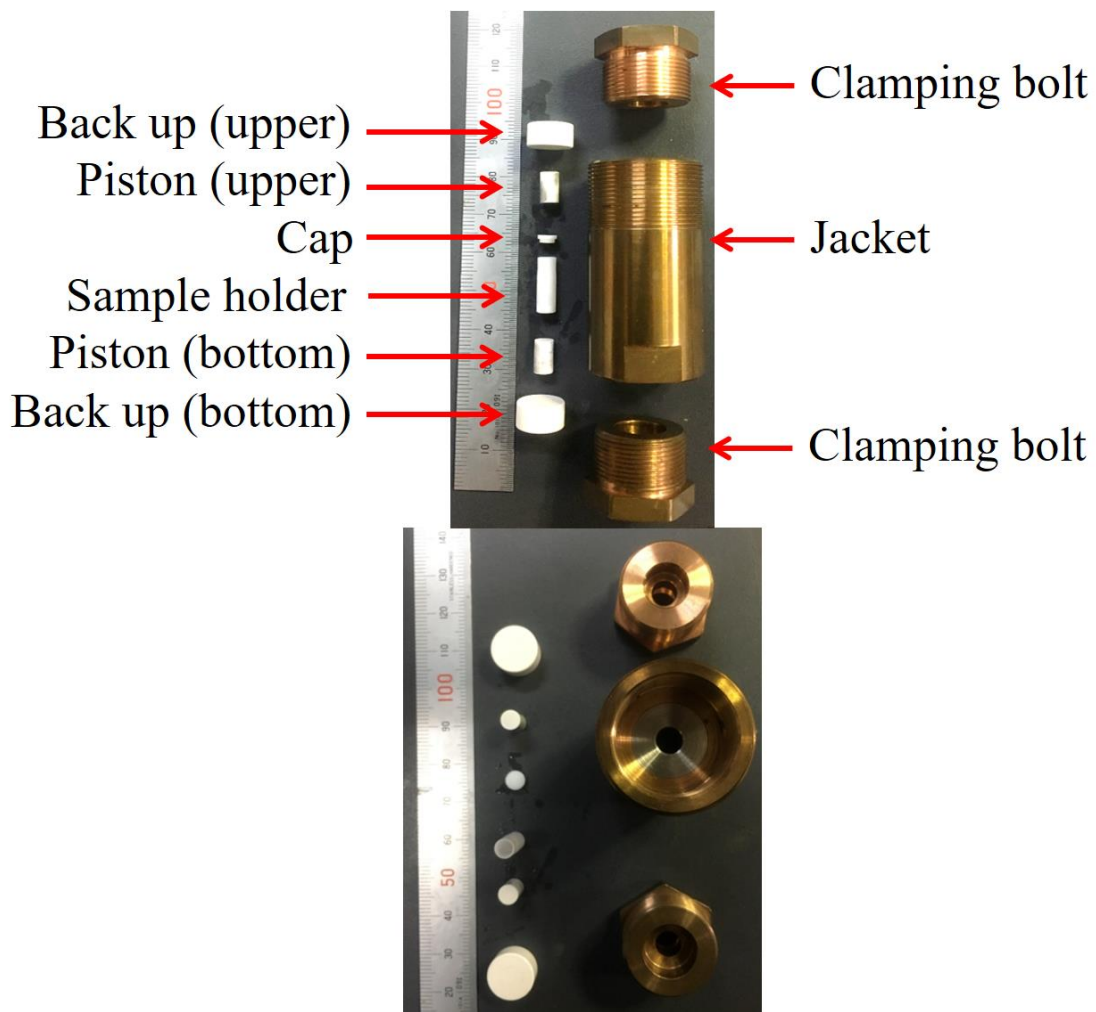
は GM 冷凍機を用いることにより液体ヘリウムを使わずに線材 (NbTi : 超伝導転移温度 10 K) を超伝導状態に転移させることが出来る。液体ヘリウムを貯める空間を必要としないため、長時間連続運転が可能である。また、貫通ボアの構造となっているため、試料空間を常温に保ったまま磁場印加することが可能である。他にも、磁場中心の下方に広くスペースを取ることが出来るため、磁場の影響を受ける検出器などを超伝導磁石から離して配置することが可能である。

### 3-2.3 15 T 超伝導磁石

図 3-7 に 15 T 超伝導磁石の入ったクライオスタットの外観写真を示す。15 T 超伝導磁石では臨界磁場が 4.2 K において 20 T を超える Nb<sub>3</sub>Sn を NbTi の内側に用いることで 15 T を実現している。Nb<sub>3</sub>Sn (超伝導転移温度 18 K) は線材の作製が難しく高価なため、NbTi と Nb<sub>3</sub>Sn を組み合わせることによりコストダウンをはかっている。磁場均一度は 0.1 %/1cm 球である。この超伝導磁石では液体ヘリウムを用いて超伝導線材を冷却し、磁場を発生させている。

## 3-3 圧力セル (Pressure Cell)

本研究で使用した圧力セルは、研究室内で設計・開発したハイブリッド型圧力セルである。図 3-8 に圧力セルの断面図および外部ジャケット (シリンダー、ボルト) と内部部品 (セラミックス、テフロンカプセル) の写真を示す[3.1]。圧力セルの内径は 5 mm、外径は 28 mm である。シリンダーは二層構造であり、外側に CuBe を、内側に NiCrAl を使用している。このようにシリンダーは合金で構成されるため、パルス磁場中に置くと eddy current の発生による発熱が予想されることから、パルス磁場と組み合わせることは出来ない。定常磁場中でのみ使用可能であるので、圧力セルを用いた強磁場・テラヘルツ EPR 装置では外部磁場発生機構として超伝導磁石を使用している。内側の NiCrAl は硬いが延性に乏しく、外側の CuBe は NiCrAl ほど硬くはないが弾性がある。また CuBe の内径より少し大きい外径の NiCrAl を挿入しているので、NiCrAl には予備圧



Parts	Material
Clamping bolt	CuBe
Jacket	CuBe
Back up (upper)	Zirconia-based
Back up (bottom)	Alumina
Piston (upper, bottom)	Alumina
Sample holder, Cap	Teflon

図 3-8 ハイブリッド型圧力セルを構成するジャケットと内部部品それぞれを横から見た写真（上）と上から見た写真（中）。各部品の材質を下に示した。

がかかった状態となっている。このような二層構造（ハイブリッド式）にすることで、NiCrAl の弾性変形範囲が増え、発生圧力限界を高く出来る。また、弾性変形領域は NiCrAl の方が CuBe より狭いので、破断しやすく危険である。そこで CuBe を外側に配置することで、万一 NiCrAl が破断した場合でも飛散を防ぐことが出来る構造となっている。なお、締め付け用のボルトには CuBe を使用している。

内部部品のセラミックスは、四つのパーツに分かれており、テフロンカプセルの上下にピストンとバックアップが一つずつ存在する。上側のバックアップはジルコニアベース（アルミナ：ジルコニア=20：80）、他のパーツはアルミナ（100%）が使用されている。測定試料はテフロンカプセルの中に、圧力媒体であるダフニーオイル 7373 とともに封入する。このダフニーオイル 7373 は温度変化に伴う圧力変化が緩やかであり、粘性が高く圧力セルに封入することが可能である。固化しない範囲では静水圧が保証されており、その限界圧力は 2.2 GPa である。低温における圧力値は、スズの超伝導転移温度の圧力依存性を用いて予め較正済である[3.1]。

### 3-4 測定試料 (Samples)

本研究では、ヘム鉄の電子状態研究を行うためにヘミンと呼ばれる分子を使用した。また、力検出型 ESR 測定法の開発の評価用試料としてヘミンおよびミオグロビンと呼ばれるヘムタンパク質を使用した。

#### 3-4.1 ヘミンクロライド (Hemin-chloride)

図 3-9 にヘミンの分子構造を示す。ヘムと呼ばれる炭素骨格の中央には四つの窒素原子が存在し、さらにその中央に鉄原子が窒素原子と配位結合している。軸配位子には塩素原子が鉄原子と配位結合している。軸配位子として他のハロゲン原子も配位することが可能であるため、塩素原子が配位したものはヘミンクロライド (Hemin-chloride) と呼ばれ区別されることもある。本論文では今後ヘミンクロライドと表記する。ヘミンクロライドの鉄原子は酸化型  $\text{Fe}^{3+}$  であり、

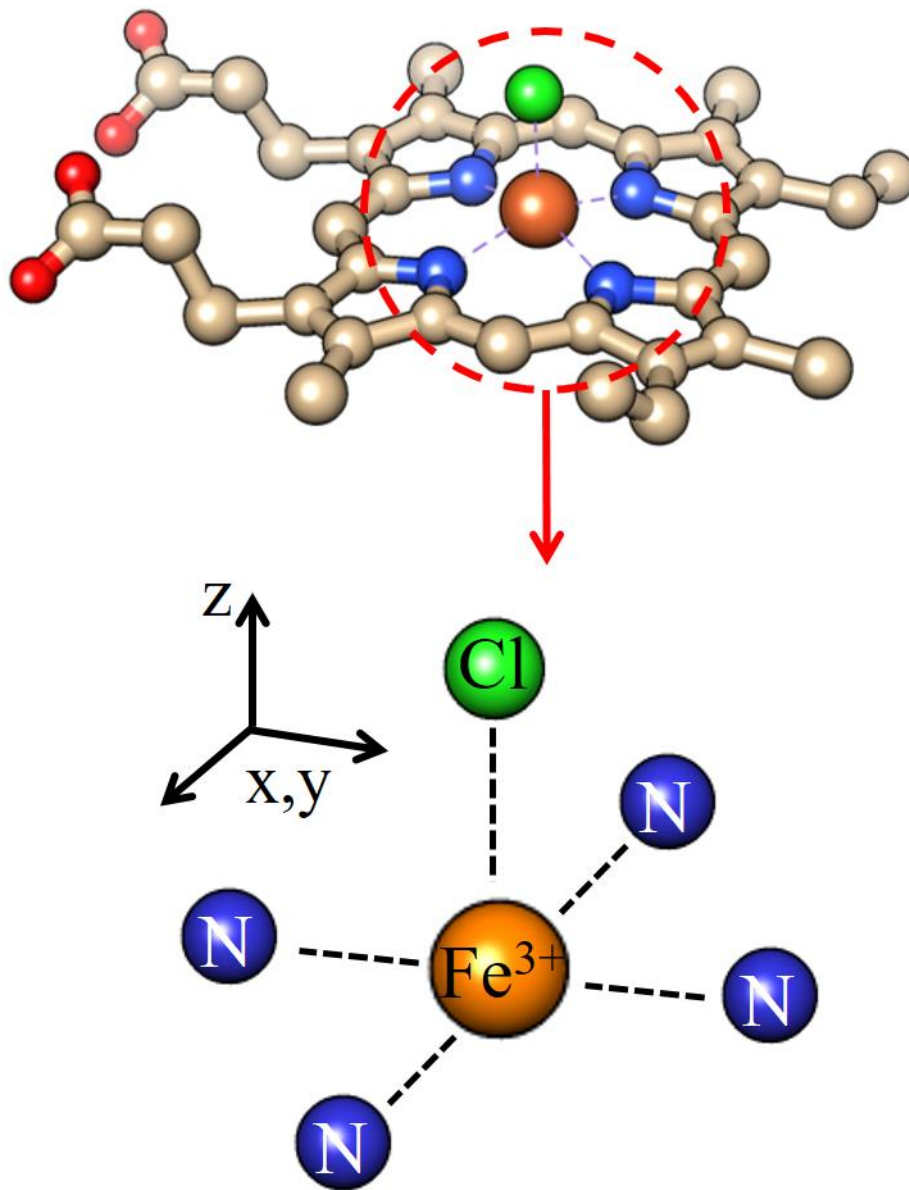


図 3-9 ヘミンクロライドの分子構造(上)と  $Fe^{3+}$  イオン周囲の配位子場(下)。

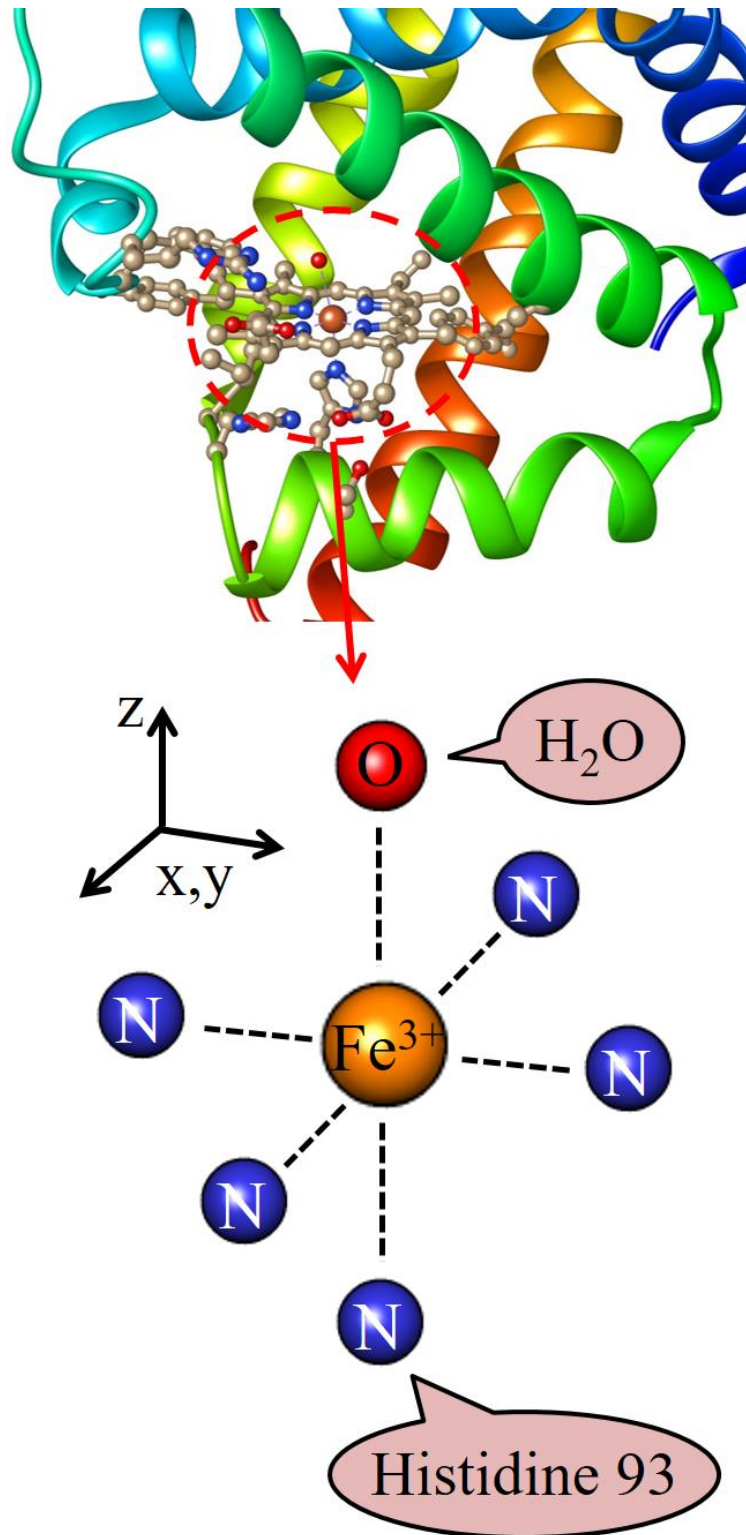


図 3-10 マッコウクジラ由来アコメトミオグロビンの分子構造（上）と  $Fe^{3+}$  イオン周囲の配位子場（下）。

電子配置は  $3d^5$  の高スピン状態 ( $S = 5/2$ ) をとっている。軸配位子の有無等によって、酸化型  $Fe^{3+}$  以外にも還元型  $Fe^{2+}$  や高酸化型  $Fe^{4+}$  など様々な価数をとることが知られている。ヘミンはヘモグロビン、ミオグロビン、シトクロム *b* などのヘムタンパク質の生理活性中心と同じ構造を持っているため、ヘムタンパク質研究におけるモデル物質の一つとしてよく知られている。実際のヘムタンパク質と比べて分子量が小さくスピン濃度を稼げるため、研究対象としてよく利用されている。本研究ではブタの血液から精製されたヘミンを Sigma Aldrich 社から購入した[3.2]。分子量は 651.95 g/mol である。

### 3-4.2 アコメトミオグロビン (Aquomet-myoglobin)

図 3-10 にミオグロビンの分子構造を示す。ミオグロビンは分子量が 16500 g/mol 程度の球状タンパク質で、157 個のアミノ酸が連なった一本のポリペプチド鎖とヘムから構成されている。ヘムの第五配位座には His.93 (ヒスチジン) のイミダゾール基が配位している。さらに第六配位座には様々な分子が配位することが知られている。本研究で使用したアコメトミオグロビンは、 $Fe^{3+}$  イオンに水分子が第六配位座として配位した構造を取っており、電子配置は  $3d^5$  の高スピン状態 ( $S = 5/2$ ) である。また、本研究で使用した試料は大阪大学大学院理学研究科の水谷研にて筆者が作製した。マッコウクジラ由来のミオグロビンのプラスミドをもとに、大腸菌 (*Escherichia coli*) により発現することで大量培養を行った。この手法は、入手したい試料が天然由来では希少・高価であるために十分量手に入らない場合や、遺伝子組み換えタンパク質を作製したい場合などに用いられ、生命科学の分野では広く知られている方法である。具体的には、作製したいタンパク質の DNA が入ったプラスミドを大腸菌の細胞内に導入し、形質転換を行うことで大腸菌の DNA の一部に組み込む。そして大腸菌自体を増殖させると大腸菌が目的のタンパク質を細胞内で生成するため、大腸菌の細胞を破碎し、精製すれば目的のタンパク質が得られる。本研究において得られたミオグロビンは、過去の文献の方法[3.3]に従って精製した (詳細な作製方法については Appendix-2 を参照)。

ヘム鉄を含め、ヘミンクロライドのような炭素骨格を有する分子は一般的にポルフィリンと呼ばれる。そして、ポルフィリンの電子状態の研究においては、慣例として、平面的な分子構造に対し、面垂直な方向を z 軸とし、面内は x 軸方向、y 軸方向とする。

### 3-5 透過型 ESR 測定法で用いる電磁波検出器

第四章、第五章では、透過型 ESR 測定法（透過法）を用いて実験を行った。使用した実験装置の組み立てについては各章で説明する。本研究では試料を透過した電磁波を検出する検出器として、In-Sb 半導体を使用した。

テラヘルツ波は 100 GHz から 10 THz までの周波数範囲を差しており、低周波側ではミリ波領域、高周波側では遠赤外線領域とも重なる。こうしたテラヘルツ領域の電磁波を検出することが可能な検出器としては、大きく分けて熱型センサと量子型センサの二種類に分類される。熱型センサは吸収した電磁波のエネルギーを熱に変換し、それによる熱量の変化を電気信号として検出する。

熱型センサには焦電効果（温度によって誘電体の分極が変化する効果）を利用した焦電センサ、ゼーベック効果を利用したサーモパイル、半導体の熱による抵抗変化を利用したボロメータ、ゴーレイセルなどがある。ゴーレイセルでは赤外線吸収膜の温度上昇による内部のキセノンガスの体積変化を用いている。体積変化によりセル内部の圧力が変化すると、赤外線を反射するメンブレンが変形し、プローブに入る光の反射量を変化することを利用している。熱型センサは一般的に冷却が不要であり室温でも使用可能であることや、広い波長領域で一定の高い感度を示すというメリットがある。しかし、熱的な検出方法では応答速度が遅いという特性も有する。

一方、量子型センサでは半導体素子によって電磁波が吸収されると伝導帯の電子または価電子帯のホール数が変化することを用いて電磁波を検出する。素子として真性型半導体もしくは不純物半導体が使われる。真性型では半導体のバンドギャップよりも高エネルギーの電磁波を吸収することで、価電子帯の電子が伝導帯へ遷移し、キャリアが生まれることを利用して検出する。また不純物型では、ドーピングした Si や Ge などの不純物準位と価電子帯もしくは伝導帯

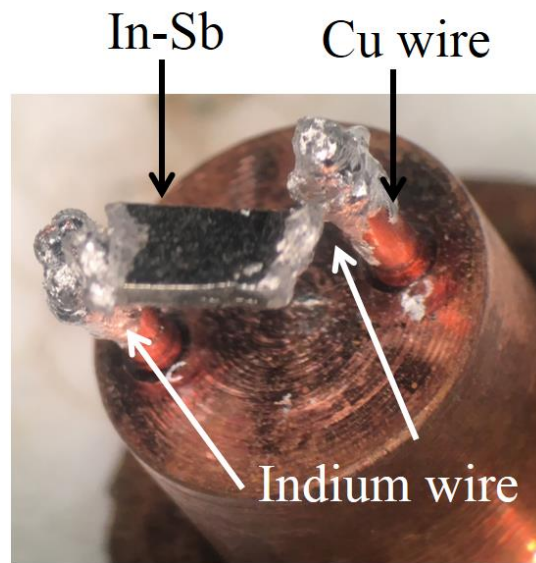


図 3-11 第四章の実験で使用する In-Sb 検出器。In-Sb は直接ディテクターラインの銅線と結線せず、In 線と結線する。

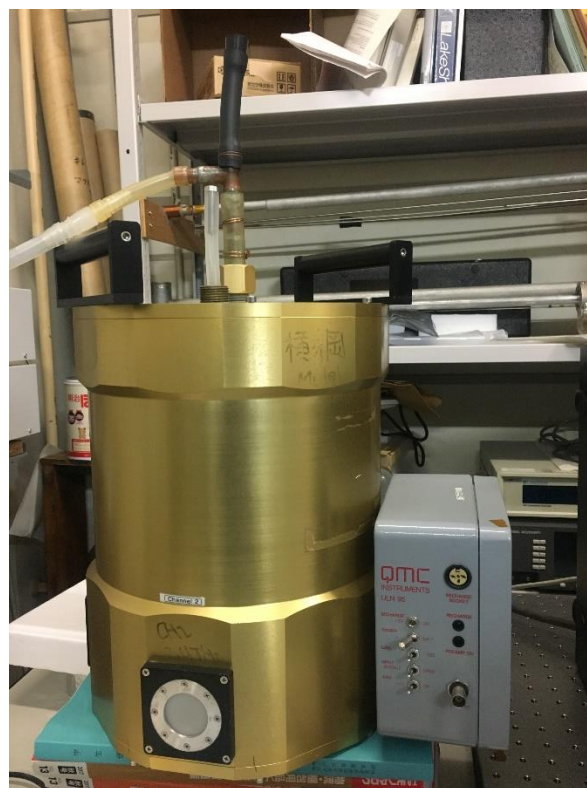


図 3-12 QMC インストルメンツ社製の In-Sb 検出器。



との間の電磁波吸収による電子・ホール生成を用いて電磁波を検出している。量子型センサは熱型センサとは対照的に検出可能な波長領域が狭いが、応答速度が  $1\ \mu\text{s}$  以下と非常に速い。また液体ヘリウム等の寒剤でセンサ本体を冷却する必要があるので室温では使用することが出来ないが、ショットキーダイオードと比べると二桁以上の高い検出感度を得ることが出来る。

本研究では、第四章、第五章の実験においてテラヘルツ領域に高い感度を持つ量子型センサの In-Sb 検出器を使用した。特に第四章において説明する、数ミリ秒オーダーの時間で発生するパルス磁場中での測定を行うためには、応答速度の速い量子型センサが適している。第四章において使用した In-Sb 検出器では、In-Sb 素子単体が剥き出しのものを使用していた (図 3-11)。一方、第五章では QMC 社が市販している In-Sb 検出器を使用した (図 3-12)。こちらの検出器では素子全体に不均一磁場を印加することで検出可能な周波数領域が最大 1.5 THz まで拡張されており、広い周波数範囲において安定して高い感度を得ることが出来る[3.4]。

## 3-6 カンチレバーとメンブレン (Cantilever & Membrane)

### 3-6.1 カンチレバー

カンチレバーとは日本語では片持ち梁とも呼ばれる、片側が自由端となっている構造体のことである。特に大きさが 1 mm 以下のものはマイクロカンチレバーと呼ばれており、微小電気機械システム (MEMS : Micro-Electro Mechanical System) というデバイス的一种である。マイクロカンチレバーは非常に小型であり、わずかな力で曲がるので、微小な試料の測定に適している。レバー先端の変位を測定することによりカンチレバーに作用している力を高感度に見積もることが出来る。マイクロカンチレバーは原子間力顕微鏡 (AFM) の探針に利用されているほか、1990 年代から様々な磁気測定にも応用されている[3.5-3.8]。特に最近では、de-Haas van Alphen 振動など量子振動の観測や[3.5]、磁気共鳴に応用されている[3.9, 3.10]。

カンチレバーの特性を表すバネ定数  $k_c$  と固有振動数  $f_c$  は、

$$k_c = \frac{E_c w_c t_c^3}{4l_c^3} \quad (3-1)$$

$$f_c = 3.516 \sqrt{\frac{E_c t_c}{12\rho_c l_c^2}} \quad (3-2)$$

と表される[3.11, 3.12]。ここで  $E_c$  はヤング率、 $w_c$  はレバーの幅、 $t_c$  はレバーの厚み、 $l_c$  はレバーの長さ、 $\rho_c$  はカンチレバーの質量密度である。この 3-1 式より、カンチレバーはうすく、また長くなるほどバネ定数が小さくなることが分かる。また 3-2 式より、カンチレバーは厚く、短くなるほど高い固有振動数となることが分かる。

本研究では Nanosensors 社の PPP-CONTSCR を使用した (図 3-13)。このカンチレバーはシリコンで作られており、その表面には 70 nm 程度のアルミニウムがコーティングされている。典型的な形状は、長さ 225  $\mu\text{m}$ 、幅 48  $\mu\text{m}$ 、厚さ 1.0  $\mu\text{m}$  である。また、典型的なバネ定数および固有振動数は、それぞれ 0.2 N/m および 23 kHz である[3.13]。

### 3-6.2 メンブレン

メンブレンは、トランポリンのように四方が土台に囲まれた薄膜状の構造体である。いま正方形のメンブレンを考えると、バネ定数  $k_m$ 、内部応力  $\sigma_m$ 、固有振動数  $f_{m,jk}$  は

$$k_m = \frac{\pi\sigma_m t_m}{2} \quad (3-3)$$

$$\sigma_m = 2\rho_m L_m^2 f_m^2 \quad (3-4)$$

$$f_{m,jk} = \sqrt{\frac{\sigma_m(j^2 + k^2)}{4\rho_m L_m^2}} \quad (3-5)$$

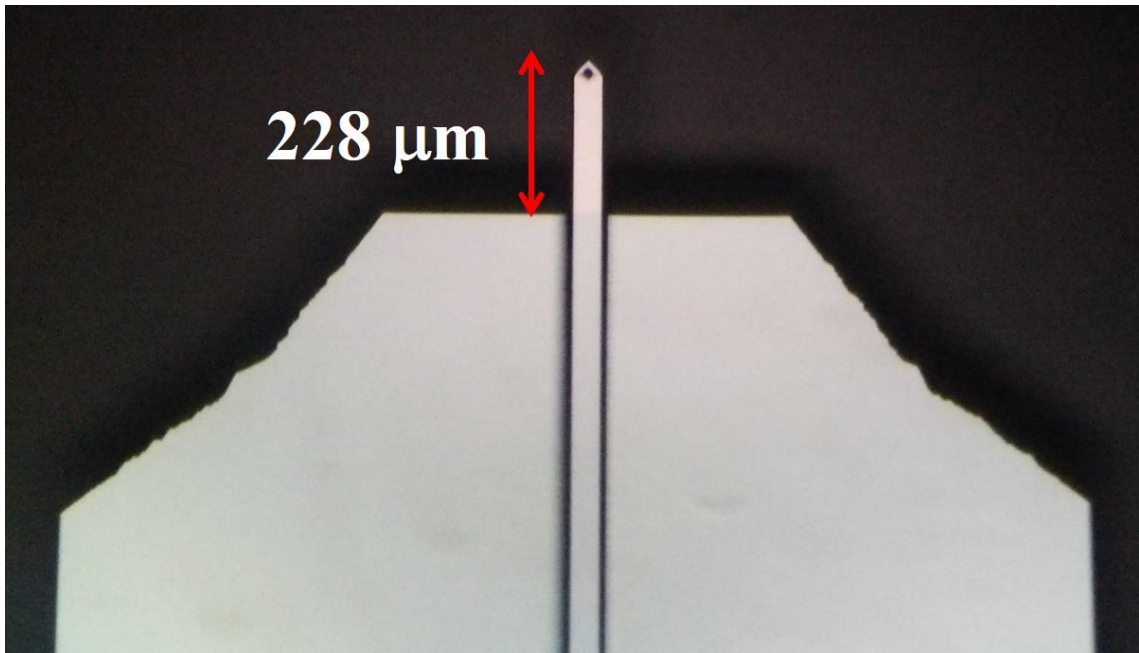


図 3-13 Nanosensors 社製のカンチレバーPPP-CONTSCR。

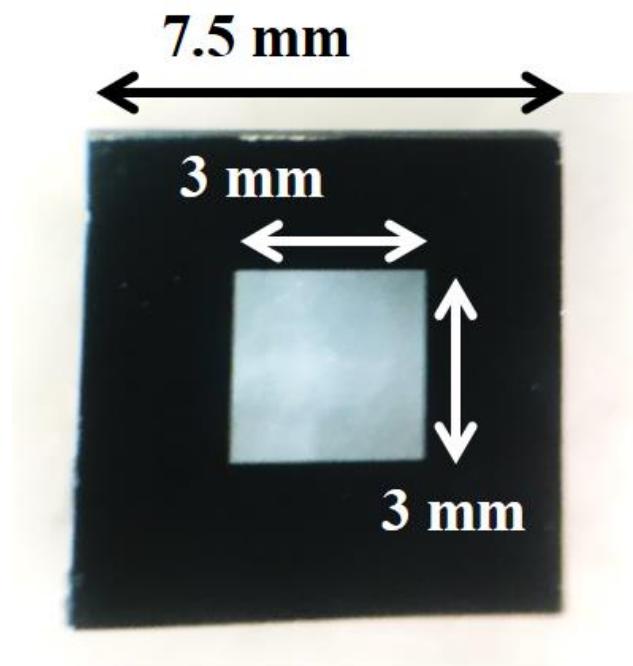


図 3-14 NTT-Advanced Technologies 社製の  $\text{SiN}_x$  ナノメンブレン MEM-N03001/7.5M。中央の窓のようになっている部分がメンブレンである。本研究では厚さ 100 nm のものを使用した。

と表される。ここで、 $t_m$ はメンブレンの厚さ、 $\rho_m$ はメンブレンの質量密度、 $L_m$ はメンブレンの一辺の長さである。3-5式で、 $j$ と $k$ は基準振動モードを指定する整数であり、基本振動は $j=1$ 、 $k=1$ である[3.14]。

本研究では NTT Advanced Technologies 社の  $\text{SiN}_x$  ナノメンブレン (MEM-N03001/7.5M) [3.15]を使用した (図 3-14)。このメンブレンは、 $3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ の正方形形状をしており、厚さは $100\text{ nm}$ である。メンブレン自体は $10\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ のシリコン基板の中央に作られている。 $\rho_m = 3.1\text{ g/cm}^2$ であり、典型的なバネ定数および固有周波数は、それぞれ $\sim 50\text{ N/m}$ および $\sim 100\text{ kHz}$ である。

NTT-AT社のメンブレンは、比較的導電性のあるSiC製もしくは絶縁性の高いSiN製のメンブレンがラインナップとして用意されている。様々な用途で使われており、例えば可視光領域からX線領域までの波長帯で透過度が高いことからマイクロCTやX線断層撮影のための試料ホルダーとして使用される。また、膜厚が数ミクロンの厚いメンブレンでは静水圧強度を $2.0\text{ MPa}$ 程度まで高めることが出来るため、ビームラインなどからの光の取り出し用真空隔壁窓として使用されている。

### 3-7 Fabry-Perot 干渉計 (Fabry-Perot Interferometry)

本研究ではカンチレバーやメンブレンのたわみを検出する方法として Fabry-Perot 干渉計を採用した。Fabry-Perot 干渉計は二枚の合わせ鏡で構成される干渉計である。Fabry-Perot 干渉計は AFM の分野において高感度な変位検出法として利用されている[3.16-3.19]。本研究ではカンチレバーの表面もしくはメンブレンの表面と、光ファイバーの端面の間で Fabry-Perot 干渉計を構成する。光ファイバーの素材は石英ガラスであり、屈折率  $n_1 = 1.5$  である。キャビティ内が真空である場合、真空の屈折率  $n_0 = 1.0$  なので、光ファイバー端面での反射率は  $r_f = (n_0 - n_1)^2 / (n_0 + n_1)^2 = 0.04$  である。そのため、ほとんどの光はファイバー端面で反射することなく進行し、キャビティ内での多重反射は考慮する必要がない。光ファイバー内部を伝播するレーザー光は、光ファイバー端面で反射しファイバー内部へ戻る光と、端面を透過し、Fabry-Perot 干渉計のキャビティに侵入し、カンチレバーおよびメンブレンの表面で完全反射して再び光ファイバ

一内部へ戻る光に分かれる。したがって、キャビティ長（光ファイバー端面とプローブ表面間の距離）を変えることにより光路差が変化し干渉強度が変化する。キャビティ長  $d$  と干渉強度  $I$  の関係は、

$$I = I_0 \left[ 1 - A \cos \frac{4\pi d}{\lambda} \right] \quad (3-6)$$

$$I_0 = \frac{I_{\max} + I_{\min}}{2} \quad (3-7)$$

$$A = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}} \quad (3-8)$$

と表される。ここで  $I_{\max}$  は干渉強度の最大値、 $I_{\min}$  は干渉強度の最小値、 $\lambda$  はレーザー光の波長である。干渉計の変位に対する感度が最大となる変曲点

$$d = \frac{\lambda}{8}, \frac{3\lambda}{8}, \frac{5\lambda}{8}, \dots \quad (3-9)$$

の近傍では、

$$\Delta I \approx 4\pi A I_0 \frac{\Delta d}{\lambda} \quad (3-10)$$

となり、「キャビティ長の変化量」と「干渉強度の変化量（＝読出し電圧の変化量）」が比例することが分かる。

Fabry-Perot 干渉計を構成するためのレーザーの波長としては、部品の入手がしやすく安価な 1.5  $\mu\text{m}$  通信波長帯を選択した。図 3-15 にファイバー光学系の概略図を示す。本研究ではレーザー光源として、コヒーレンスコントロール機能付き波長可変半導体レーザーを用いた。クライオスタット内の狭い空間でキャビティ長を機械的に変化させるためには、マイクロカンチレバーもしくは光ファイバーの端面位置をピエゾ素子等で動かす必要が生じる。しかし本研究のように波長可変レーザーを用いることで、駆動機構を用いることなくキャビテ

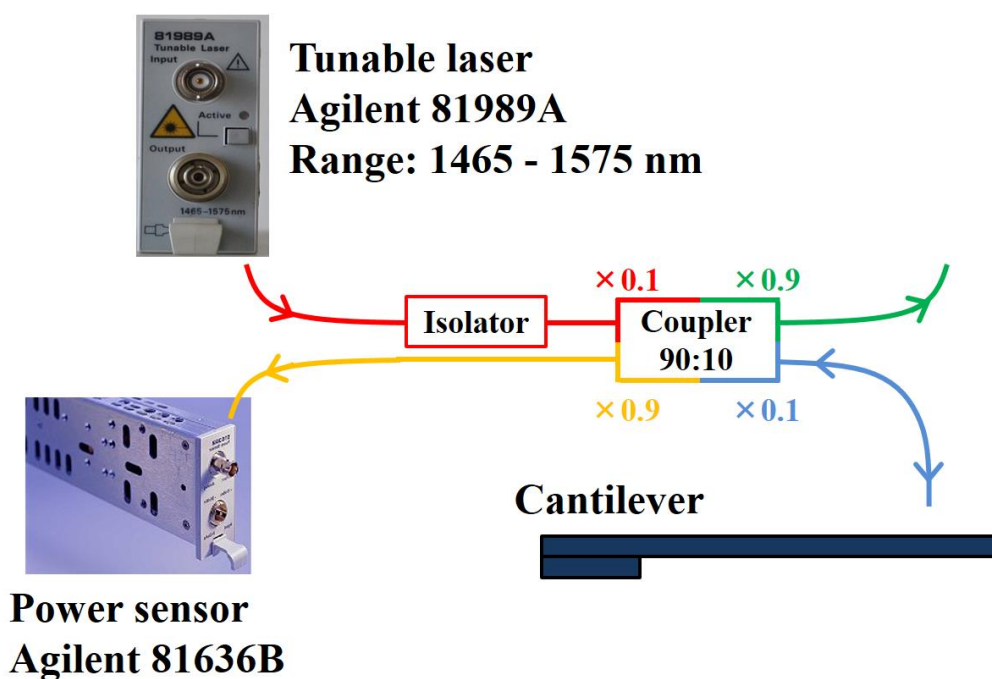


図 3-15 ファイバー光学系の概略図。この図ではカンチレバーを用いて光干渉計を構成している。波長可変レーザー（Tunable laser）から出た光の 10 %がカンチレバーのほうへ分配される。カンチレバーの端面とファイバー先端面で反射した光はファイバー内で干渉し、カップラを通してその干渉強度がフォトディテクタ（Power sensor）で電圧として読み出される。

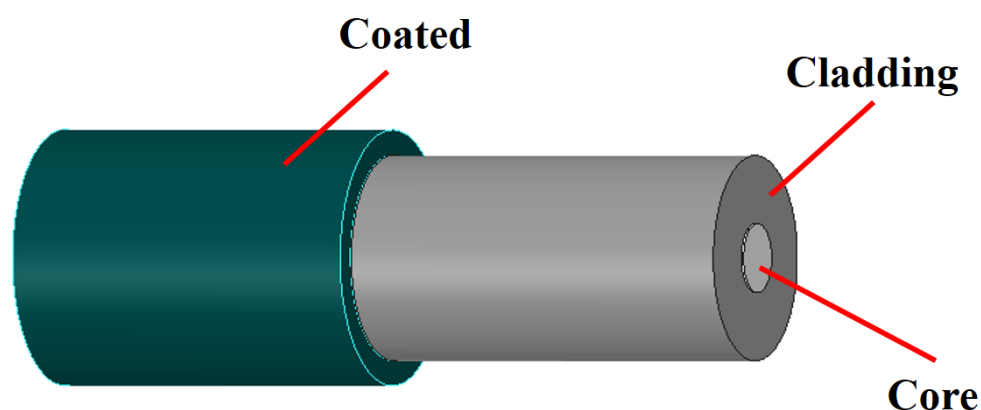


図 3-16 光ファイバーの基本構造。コア（Core）の直径は 20  $\mu\text{m}$  と狭いため、最低次のモードのみがコア内を伝搬可能である。光ファイバーをフェルルールに通す際は被覆（Coating）を剥がす。

ィ長を実効的に変化させることが出来る。光源には Agilent Technologies 社のレーザーモジュール 81989A を使用した。Fabry-Perot 干渉計から返ってきたレーザー光の検出器としては、同社のパワーセンサーモジュール 81636B (InGaAs フォトディテクタ) を用いた。このフォトディテクタはレーザーモジュールと共にメインフレーム 8163B に組み込まれている。

図 3-16 に光ファイバーの基本構造を示す。光ファイバーはコアと呼ばれる芯とその外側のクラッドと呼ばれる部分、そしてそれらを覆う被覆の三重構造となっている。光ファイバーの素材は主に透過率が高い石英ガラスで出来ており、不純物をドーピングすることで透過率を制御している、一般的な光ファイバーのコアとクラッドの屈折率の差は 0.2-0.3 % である。本研究で用いた光ファイバーは Bend-insensitive シングルモード光ファイバーと呼ばれるものであり、シングルモードファイバーではコア径を十分に小さくすることで単一のモードのみを伝搬させることが出来る。

Bend-insensitive ファイバーではコアとクラッドの屈折率の差を大きくして、通常のシングルモードファイバーよる曲げ損失を少なくしている。その結果、ファイバーの機械的な振動や温度変化による伸縮等の形状変化に起因する光強度の変化を減らすことが出来る。本研究で用いたファイバーは、Thorlabs 社の 1550BHP である。透過波長は 1460-1620 nm、曲げ損失ゼロの最小曲率半径は 13 mm である。また、被覆外径は  $245 \pm 15 \mu\text{m}$ 、クラッド外径は  $125 \pm 1.0 \mu\text{m}$ 、コア径は  $9.0 \mu\text{m}$  である[3.20]。

光ファイバーを接続するコネクタ端面による望ましくない後方反射を防ぐため、本研究では APC(Angled Physical Contact)コネクタを用いた。後方反射はレーザー発振強度の不安定化や多重反射による多キャビティ化など測定の妨げとなることが知られている。特に多重反射による多キャビティ化は信号強度のドリフトの原因であり、極力排除する必要がある。APC コネクタは端面に  $8^\circ$  の角度がついているため、望ましくない反射光による影響を極力排除することが出来る。

光源やフォトディテクタから Fabry-Perot 干渉計までの途中には図 3-15 中に示したようなカップラを入れている。カップラは光を分波・合波出来る受動光学素子である。本研究で用いたカップラは入射してきた光を 90:10 の割合で分割する。

光源から入射した光の 90 %が自由空間に放出され、残りの 10 %が Fabry-Perot 干渉計に入る。干渉計から反射して戻ってきた光は再び 90:10 に分割され、90% はディテクタに入り、10 %は光源のほうへ戻る。そのため、カプラを介してアイソレータに戻る光の強度はレーザー出力の 1 %以下になっている。アイソレータは光を一方向にだけ透過させる素子であり、カプラからの戻り光をさらに低減させることが出来る。本研究では Thorlabs 社の 10202A-90 を用いた。

### 3-8 ESR スペクトルのシミュレーション (Simulating Method for ESR Spectrum)

本研究で得られた結果の詳細な解析のため、第四章から第七章までの各章では、ESR スペクトルのシミュレーションを行った。シミュレーションは、1-7 式に示したスピンハミルトニアンを考え、以下の流れで行った。

まず、スピンハミルトニアン  $H$  に対する固有値方程式は、

$$H|i\rangle = E_i|i\rangle \quad (3-11)$$

と書ける。ここで、 $|i\rangle$  は固有ベクトル、 $E_i$  は固有値であり、 $E_1 \leq E_2 \leq E_3 \dots$  の順に並んでいるものとする。定常磁場のベクトルを

$$\mathbf{B} = (B_x, B_y, B_z) = (|\mathbf{B}|\cos\varphi \sin\theta, |\mathbf{B}|\sin\varphi \sin\theta, |\mathbf{B}|\cos\theta) \quad (3-12)$$

と置く。このとき、定常磁場と直交する単位ベクトルの一つは、

$$\begin{aligned} \mathbf{r}_1 &= \left( \cos\varphi \sin\left(\theta + \frac{\pi}{2}\right), \sin\varphi \sin\left(\theta + \frac{\pi}{2}\right), \cos\left(\theta + \frac{\pi}{2}\right) \right) \\ &= (\cos\varphi \cos\theta, \sin\varphi \cos\theta, -\sin\theta) \end{aligned} \quad (3-13)$$

と書ける。よって、振動磁場  $\mathbf{B}_1$  は、

$$\mathbf{B}_1 = (B_{1x}, B_{1y}, B_{1z}) = (|\mathbf{B}|\cos\varphi \cos\theta, |\mathbf{B}|\sin\varphi \cos\theta, -|\mathbf{B}|\sin\theta) \quad (3-14)$$

と書ける。次に、観測される  $g$  値を、着目する磁性サイトの各方向の  $g$  値  $g_x$ 、 $g_y$ 、 $g_z$  を用いて、



$$g_{\text{eff}} = \sqrt{g_x^2 \cos^2 \varphi \sin^2 \theta + g_y^2 \sin^2 \varphi \sin^2 \theta + g_z^2 \cos^2 \theta} \quad (3-15)$$

と書く。同様に、観測されるスペクトルの線幅を、各方向の線幅（半値全幅） $\Delta B_x$ 、 $\Delta B_y$ 、 $\Delta B_z$ を用いて、

$$\Delta B = \sqrt{\Delta B_x^2 \cos^2 \varphi \sin^2 \theta + \Delta B_y^2 \sin^2 \varphi \sin^2 \theta + \Delta B_z^2 \cos^2 \theta} \quad (3-16)$$

と書く。

今回のシミュレーションでは、簡単のため線形応答の範囲で遷移振幅や温度依存性を考える。遷移振幅( $|i\rangle \leftrightarrow |j\rangle$ )は、Fermi の黄金則：

$$I_{ij} \propto |\langle i | \mathbf{B}_1 \cdot \mathbf{S} | j \rangle|^2 \quad (3-17)$$

を用いた。スピンハミルトニアンを対角化することで求められる固有値から、準位間のエネルギー差を

$$\Delta E_{ij} = E_j - E_i \quad (3-18)$$

と書くと、共鳴条件は、

$$h\nu = \Delta E_{ij} = E_j - E_i \quad (3-19)$$

となる。定常磁場  $B$  の関数として線形関数を仮定し、線形は Gaussian 型とする。まず  $S = 1/2$  の場合は、共鳴磁場を  $B_{\text{res}}$  とすると、共鳴条件は、

$$h\nu = g_{\text{eff}} \mu_B B_{\text{res}} \quad (3-20)$$

となるので、線幅が  $\Delta B$  の場合の単結晶に対する規格化された Gaussian 関数は、

$$I(B) = \frac{1}{(\sqrt{2\pi})\Delta B} \exp \left[ -\ln 2 \left( \frac{B - B_{\text{res}}}{\Delta B/2} \right)^2 \right] = \frac{2\sqrt{\ln 2}}{(\sqrt{\pi})\Delta B} \exp \left[ -\ln 2 \left( \frac{\Delta E - h\nu}{g_{\text{eff}} \mu_B \Delta B/2} \right)^2 \right] \quad (3-21)$$

と書ける。一方、 $S > 1/2$  の場合は、あらわには共鳴磁場の関数として書くことは出来ない。そこで、 $(\Delta E \rightarrow \Delta E_{ij})$ を仮定すると、

$$I(B) = \frac{2\sqrt{\ln 2}}{(\sqrt{\pi})\Delta B} \exp \left[ -\ln 2 \frac{(\Delta E_{ij} - h\nu)^2}{(g_{\text{eff}}\mu_B \Delta B/2)^2} \right] \quad (3-22)$$

となる。さらに、粉末試料のスペクトルを考える場合は、各エネルギー状態についての和と、角度に対しての積分を取ることで、次のように書ける。

$$I(B) \propto \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^\pi d\theta \sum_{i < j} I_{ij} \frac{(\exp[-k_B E_i] - \exp[-k_B E_j])}{\sum_{k=1}^n \exp[-k_B E_k]} \frac{2\sqrt{\ln 2}}{\sqrt{\pi}\Delta B} \exp \left[ -\ln 2 \frac{(\Delta E_{ij} - h\nu)^2}{(g_{\text{eff}}\mu_B \Delta B/2)^2} \right] \quad (3-23)$$

本研究では、Fortran 90 を用いてシミュレーションプログラムを自作し、エネルギーダイアグラムおよび ESR スペクトルのシミュレーションを行った。またフリーで使用可能な SpinP と呼ばれる ESR スペクトルシミュレーションソフトも適宜使用した[3.21]。

## [参考文献]

- [3.1] T. Sakurai, K. Fujimoto, R. Matsui, K. Kawasaki, S. Okubo, H. Ohta, K. Matsubayashi, Y. Uwatoko, H. Tanaka, *J. Magn. Reson.* **259**, 108 (2015).
- [3.2] Hemin BioXtra, from Porcine: Product number 51280 (Sigma Aldrich), See <https://www.sigmaaldrich.com/> for information about hemin-chloride.
- [3.3] 堀谷正樹、修士学位論文、大阪大学、2004年
- [3.4] See <http://www.terahertz.co.uk/qmc-instruments-ltd/> for information about QMC detector.
- [3.5] E. Ohmichi, T. Osada, *Rev. Sci. Instrum.*, **73**, 3022 (2002).
- [3.6] C. Rossel, P. Bauer, D. Zech, J. Hofer, M. Willemin, H. Keller, *J. Appl. Phys.* **79**, 8166 (1996).
- [3.7] M. J. Naughton, J. P. Ulmet, A. Narjis, S. Askenazy, M. V. Chaparala, A. P. Hope, *Rev. Sci. Instrum.* **68**, 4061 (1997).
- [3.8] C. Rossel, M. Willemin, A. Gasser, H. Bothuizen, G. I. Meijer, H. Keller, *Rev. Sci. Instrum.* **69**, 3199 (1998).
- [3.9] S. Kuehn, S. A. Hickman, J. A. Marohn, *J. Chem. Phys.* **128**, 052208 (2008).
- [3.10] F. Hallak, J. van Slageren, M. Dressel, *Rev. Sci. Instrum.* **81**, 095105 (2010).
- [3.11] B. Ilic, H. G. Craighead, *J. Appl. Phys.* **95**, 3694 (2004).
- [3.12] N. E. Jenkins, L. P. DeFlores, J. Allen, T. N. Ng, S. R. Garner, S. Kuehn, J. M. Dawlaty, J. A. Mamin, P. Guethner, *J. Vac. Sci. Technol.* **22**, 909 (2004).
- [3.13] See <https://www.nanosensors.com/> for information about cantilever.
- [3.14] S. Chakram, Y. S. Patil, L. Chang, M. Vengalattore, *Phys. Rev. Lett.* **112**, 127201 (2014).
- [3.15] See <http://www.ntt-at.com/> for information about the SiN<sub>x</sub> membrane chip.
- [3.16] M. Aspelmeyer, T. J. Kippenberg, F. Marquardt, *Rev. Mod. Phys.* **86**, 1391 (2014).
- [3.17] C. H. Metzger, K. Karrai, *Nature* **432**, 1002 (2004).
- [3.18] K. Kim, S. Lee, *J. Appl. Phys.* **91**, 4715 (2002).
- [3.19] L. Tröger, M. Reichling, *Appl. Phys. Lett.* **97**, 213105 (2010).
- [3.20] See <http://www.thorlabs.co.jp/> for information about optical fiber.

[3.21] See <https://nationalmaglab.org/user-facilities/emr/emr-resources/spin-software> about SpinP software.



## 第 4 章

Precise Determination of Zero-Field Splitting Parameters  
of Hemin by High-Field and High-Frequency Electron  
Paramagnetic Resonance

## 4-1 イントロダクション

ヘム鉄錯体を含め、ポルフィリン環を有する錯体は、一般に「ポルフィリン錯体」と呼ばれている。ポルフィリン錯体は、その多くが生化学において重要な役割を担っている分子として知られている[4.1,4.2]。特に、ポルフィリン環の中心に金属イオンが配置された金属ポルフィリン錯体は[4.3]、クロロフィル、ヘムタンパク質、シトクロム、シアノコバラミン等の様々なタンパク質や酵素の中においても見つかっている。金属ポルフィリン錯体の化学的および物理的性質は、基礎科学および応用の観点から集中的に研究されてきた。特に生物学的プロセスにおいては、酸化還元、触媒作用、および電子移動などの生命現象を支える必須の役割を果たしている。こうした意味において、ミクروسコピックな観点から金属タンパク質および金属酵素の機能を理解するためにポルフィリン錯体中の金属イオンの電子構造を研究することは非常に重要である。

金属ポルフィリン錯体では、遷移金属イオンがポルフィリン環の中心に配置されており、遷移金属イオンの  $3d$  電子配置の状態に依存して磁気的特性が決まっている。 $S \geq 1$  となる  $3d^5$  ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) や  $3d^3$  ( $\text{Cr}^{3+}$ ) などの遷移金属イオンの系では、磁気的性質はしばしば次のスピンハミルトニアンで記述される：

$$H = DS_z^2 + E(S_x^2 - S_y^2) \quad (4-1)$$

ここで、 $D$  と  $E$  はそれぞれゼロ磁場分裂における軸配位子方向および面内方向の異方性を表す定数である。これらのパラメータは実験的に決定することが出来、着目する磁性イオン周囲の配位子場を議論する際に重要である。しかし、ミクروسコピックな観点からは、金属ポルフィリン錯体のゼロ磁場分裂の起源についてあまり理解されておらず、また対象分子の幾何学的構造とゼロ磁場分裂定数との間の相関も明確になっていない。現在のところ、配位子場理論を用いて議論するだけでは、金属ポルフィリン錯体のゼロ磁場分裂定数の値や符号を正確に予測することは困難である。

ゼロ磁場分裂定数を実験的に決定するための実験手法としては、強磁場・テラヘルツ EPR 法[1.29, 1.42, 1.43, 4.4-4.9]、メスバウアー分光法[4.10]、磁気円二色性分光 (MCD) 法[4.11]、遠赤外 (FIR) 分光法[4.12, 4.13]、非弾性中性子散

乱 (INS) 法[4.14, 4.15]などが挙げられる。例えば、高スピン状態における鉄ポルフィリン錯体のゼロ磁場分裂定数  $D$  については、FIR 分光法[4.12, 4.13]、フーリエ変換型周波数掃引 EPR (FD-FT EPR) 法[4.7, 4.8, 4.16]、および INS 法[4.14, 4.15]を用いて定量的に決定された例が多数存在する。一方、ポルフィリン面内の磁気異方性を示すゼロ磁場分裂定数  $E$  についての研究が進んでいるかという点、必ずしもそうではなく、試料によって進んでいるものとそうでないものがある。これは、軸配位子方向の異方性とポルフィリン面内の磁気異方性の比  $|E/D|$  が関係している。この比が非常に小さい場合、面内の磁気異方性はぼけてしまい、電子構造の精密な解析が難しくなる。鉄ポルフィリン錯体は  $D$  値が非常に大きいために、 $E$  値を定量的に決定することは必ずしも容易ではなく、スペクトル分解能が重要なファクターとなってくる。

整数スピン系では Kramers 二重項が存在しないために、 $E$  値がゼロでなければゼロ磁場であっても絶対値が同じで符号の異なる  $S_z$  の縮退が解けている。一方、半整数スピン系では、Kramers 二重項の存在により、 $E$  値がゼロでなくともゼロ磁場においては縮退が解けないことが知られている。ゼロ磁場分裂の大きさは、 $D$  値だけでなく  $E$  値にも依存している。しかし、 $|E/D|$  の値が  $\sim 0.01$  のオーダーとなるほど  $E$  値が小さい場合、ゼロ磁場における分裂準位間のスペクトルを観測するだけでは、その分裂の大きさがほぼ  $D$  値で決まってしまい、分裂幅にわずかながら寄与している  $E$  値を精密に見積もることが困難となる。ゼロ磁場の条件で行われた過去の INS 法による研究では[4.14]、ヘム鉄誘導体の一種である鉄テトラフェニルポルフィリン[Fe(TPP)]X のゼロ磁場分裂に対応するエネルギー準位間に関する実験結果から、 $D$  値の見積もりは精密に行われたものの、 $E$  値の見積もりは行われなかった。

これに対し、EPR などの磁場中分光法を行えば、EPR 信号のスプリットとして直接的に  $E$  値の存在を確認することが出来る、さらに共鳴磁場の分裂幅から  $E$  値の絶対値について  $D$  値とは独立して精密に決定することが出来る(図 4-1)。2015 年に Nehrkom らは[Fe(TPP)]Cl の  $D$  値と  $E$  値を報告しているが、ヘミンクロライドの  $E$  値を見積もることは出来ていない[4.16]。 $E$  値を見積もることが出来なかった理由として、彼らの用いた FD-FT EPR 法のスペクトル分解能が障壁になったのではないかと推測される。FD-FT EPR 法は、固定磁場中で様々な周



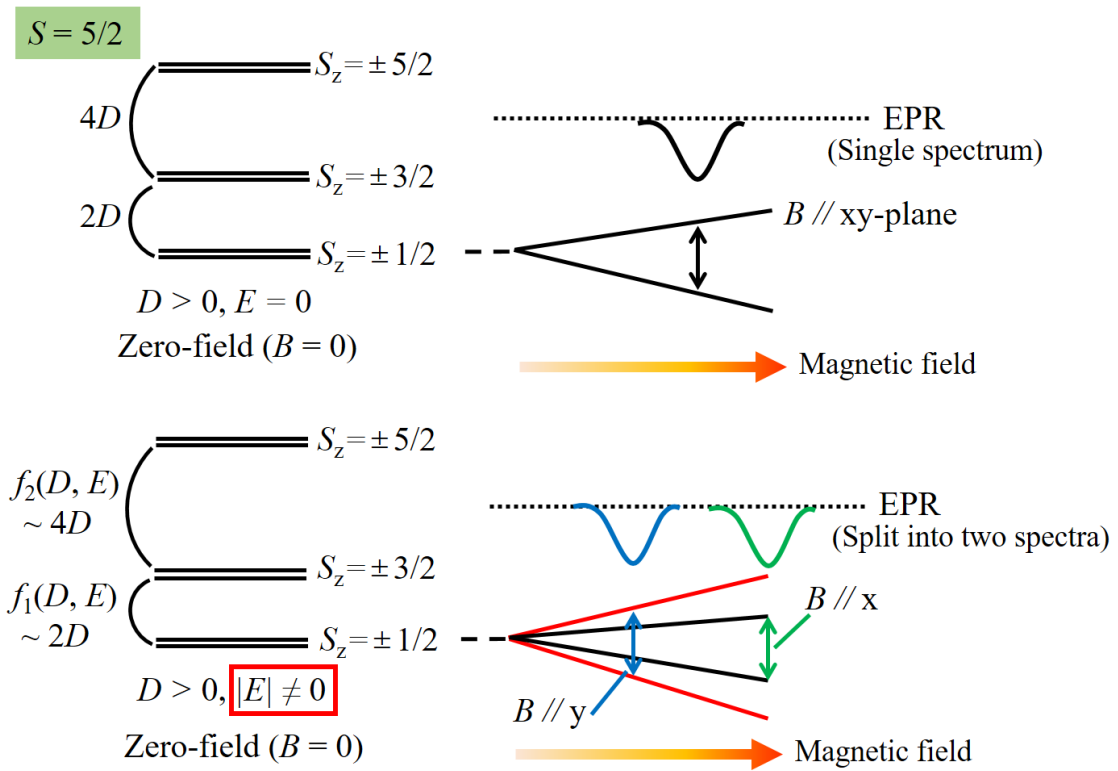


図 4-1 ヘム面内方向のゼロ磁場分裂定数  $E$  がゼロの場合とゼロでない場合における基底状態のゼロ磁場分裂と磁場中における EPR 信号の観測の様子。 $E \neq 0$  の場合、EPR スペクトルは面内異方性を反映して二つにスプリットする。

波数成分を持ったパルスの電磁波を短時間に照射することで、EPR 遷移を起こす手法である。得られた生データは時間軸を変数とするデータであるが、これをフーリエ変換することにより、周波数軸を変数に取った EPR スペクトルとして得ることが可能である。しかし、パルスの電磁波を照射する場合は、その周波数精度（分解能）がおおむね  $0.1 \text{ cm}^{-1}$  程度である。そのため彼らは論文の中でも述べているが、測定結果からヘミンクロライドの  $E$  値が  $0.1 \text{ cm}^{-1}$  より小さいと予測している。したがって、 $0.1 \text{ cm}^{-1}$  以上のエネルギー分解能を有する手法である EPR 測定を行わなければヘミンクロライドの  $E$  値を精密に決定出来ないと考えられる。

そこで本研究では、パルス磁場を用いた強磁場・テラヘルツ EPR 測定法により、ヘミンクロライドのゼロ磁場分裂定数  $D$ 、 $E$  を精密に決定することを目的とした。我々の手法では、電磁波はパルスではなく、周波数固定の連続波を用いている。この手法では、 $0.01 \text{ cm}^{-1}$  というエネルギー分解能を達成することが可能である。そのため、過去の報告例では発見出来なかったヘミンクロライドのゼロ磁場分裂の精密な見積もりが可能になると期待される。以下では、本章で行った研究の実験方法、結果、考察について詳細に説明する。

## 4-2 実験方法

本研究では、パルス磁場を用いた透過型の強磁場・テラヘルツ EPR 測定装置 [4.17, 4.18] で実験を行った。図 4-2 に実験装置の概略図を示す。購入したヘミンクロライドの粉末試料を 73 mg 試料瓶から取り出し、そのまま使用した。試料は図 4-2 内の左に示すような熱収縮チューブで作成された試料ホルダーで保持した。

ガラスデュワー上方から導入された電磁波は内径 6 mm のライトパイプを通過して磁場中心に設置された試料を透過し、下方の In-Sb 検出器に到達する。EPR 吸収が起こると試料が電磁波を吸収するため、In-Sb 検出器に到達する電磁波強度が減衰することを利用して EPR を観測する。In-Sb 検出器は 100 ns 程度の応答速度を有する。パルス磁石への放電は LC 発振回路と等価な回路で説明出来るが、スイッチに用いているサイリスタには整流作用があるため磁場波形が正

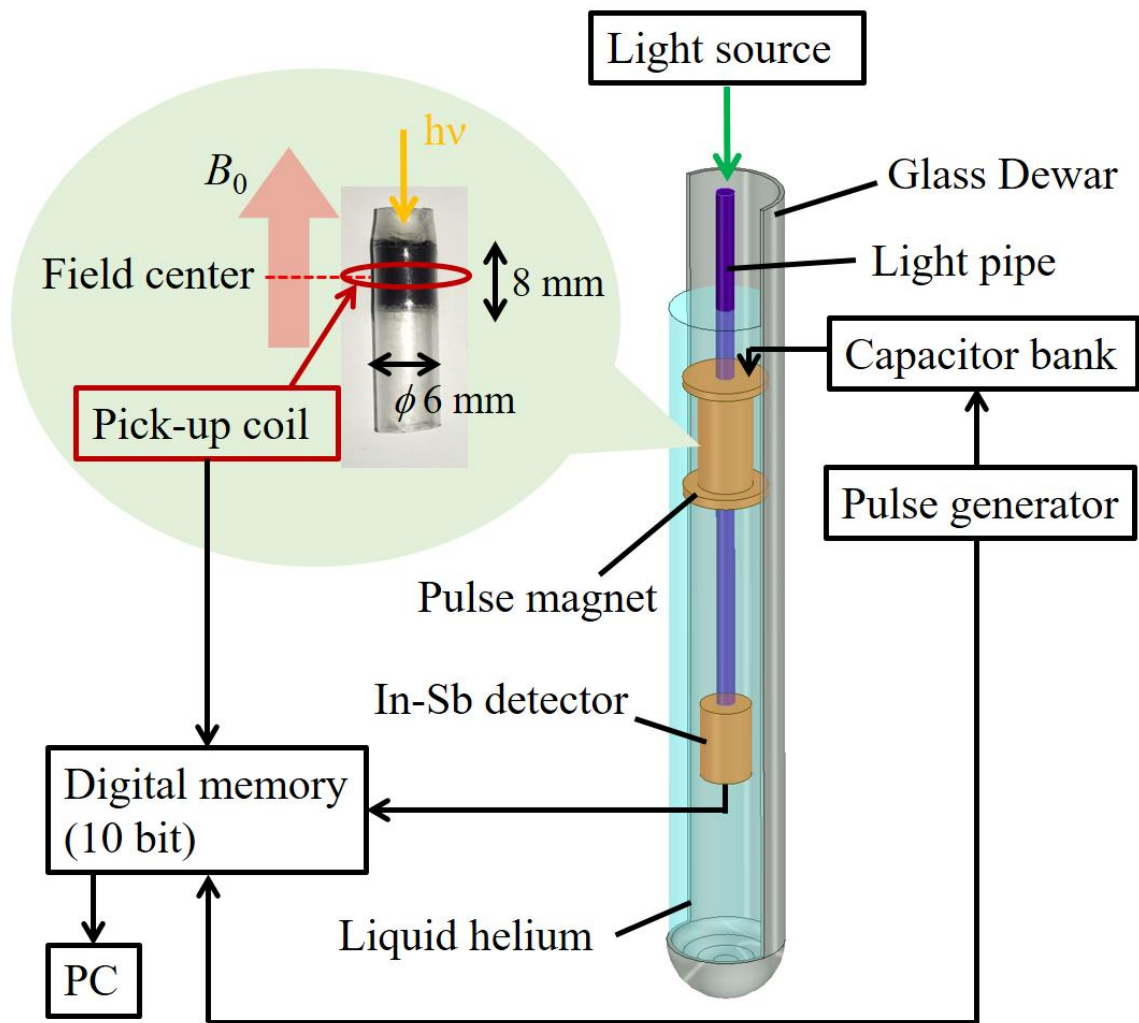


図 4-2 パルス磁場を用いた透過型の強磁場・テラヘルツ EPR 測定装置のセットアップ。

弦波の半周期の形になる。このように時間変化とともに磁場の大きさは正弦波の形で変化するので、磁場掃引速度も時間変化している。そのため最大発生磁場付近では細かくデータ点を取得出来るが、低磁場では比較的粗くなる。そこで高速に動作する In-Sb 検出器を使用することで、低磁場においても速いサンプリングレートでデータを取得し、十分なデータ点数を確保することが可能となっている。また、データの取得には縦軸分解能が 10 ビット (EPR 信号強度の信号分解能に相当) の分解能を持つ高速デジタルメモリを使用した。

発生磁場の見積もりには磁場中心に巻いたピックアップコイルを用いた。磁場発生時にピックアップコイルに生じる誘導起電力を時間積分することで発生磁場を見積もることが出来る。しかし、ピックアップコイルから見積もられる磁場の値には若干の誤差が生じる可能性がある。そこでより正確な磁場較正を行うために、EPR 標準試料である 2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル (DPPH) を試料空間に設置し、その共鳴磁場から発生磁場の補正を行った。

電磁波光源として、80-160 GHz の周波数範囲では Gunn 発振器を、200-700 GHz の範囲では後進行波管 (BWO) を使用した。この章の全ての EPR 測定は 4.2K で行った。

### 4-3 実験結果

本研究で得られた 703 GHz までの EPR スペクトルを図 4-3 に示す。まず 105 GHz の測定結果では、1 T 付近から 4 T 付近までの磁場範囲において、非対称な吸収スペクトルが観測された。みかけの  $g$  値としてはおよそ  $g = 2-6$  の範囲であり、過去に X-band の領域で報告されている EPR 測定結果[4.19]と良く一致している。

$g \sim 6$  に観測された吸収 (一般に  $g_{\text{perp}}$  吸収と呼ばれる) は、外部磁場がポルフィリン面内に印加された際に観測される。一方、 $g \sim 2$  の吸収 (一般に  $g_{\text{para}}$  吸収と呼ばれる) は、ポルフィリン面に対して垂直方向 (軸配位子方向) に磁場が印加された際に観測される。本研究では粉末試料を使用しているため、 $g \sim 6$  と  $g \sim 2$  の吸収を両端とした磁場範囲に様々な磁場方位に対応する EPR 吸収が重畳して表れている (パウダーパターン)。  $g \sim 2$  付近の吸収は、吸収が弱いため電

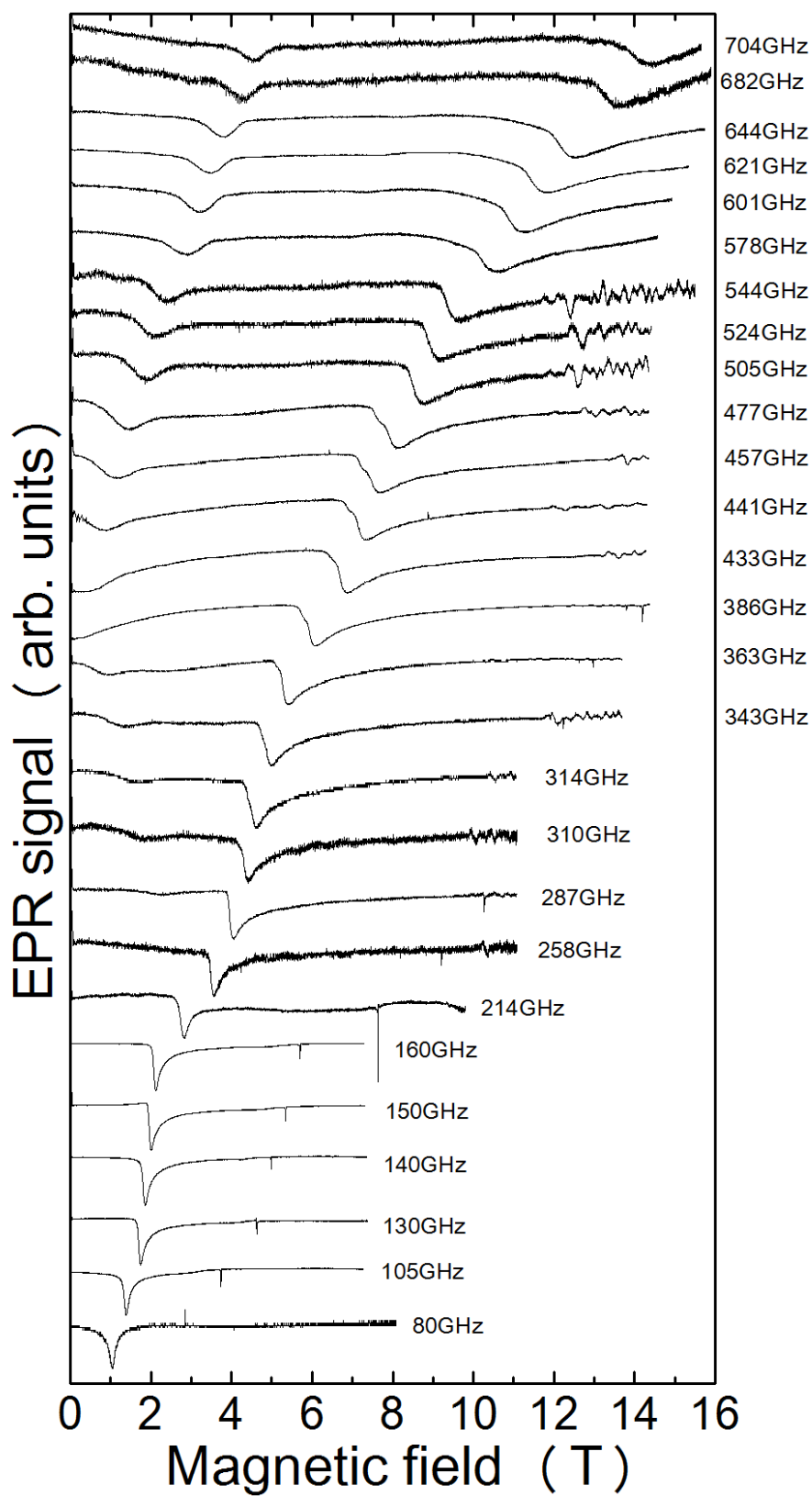


図 4-3 80 GHz から 703 GHz までのヘミンクロライドの EPR 測定結果。

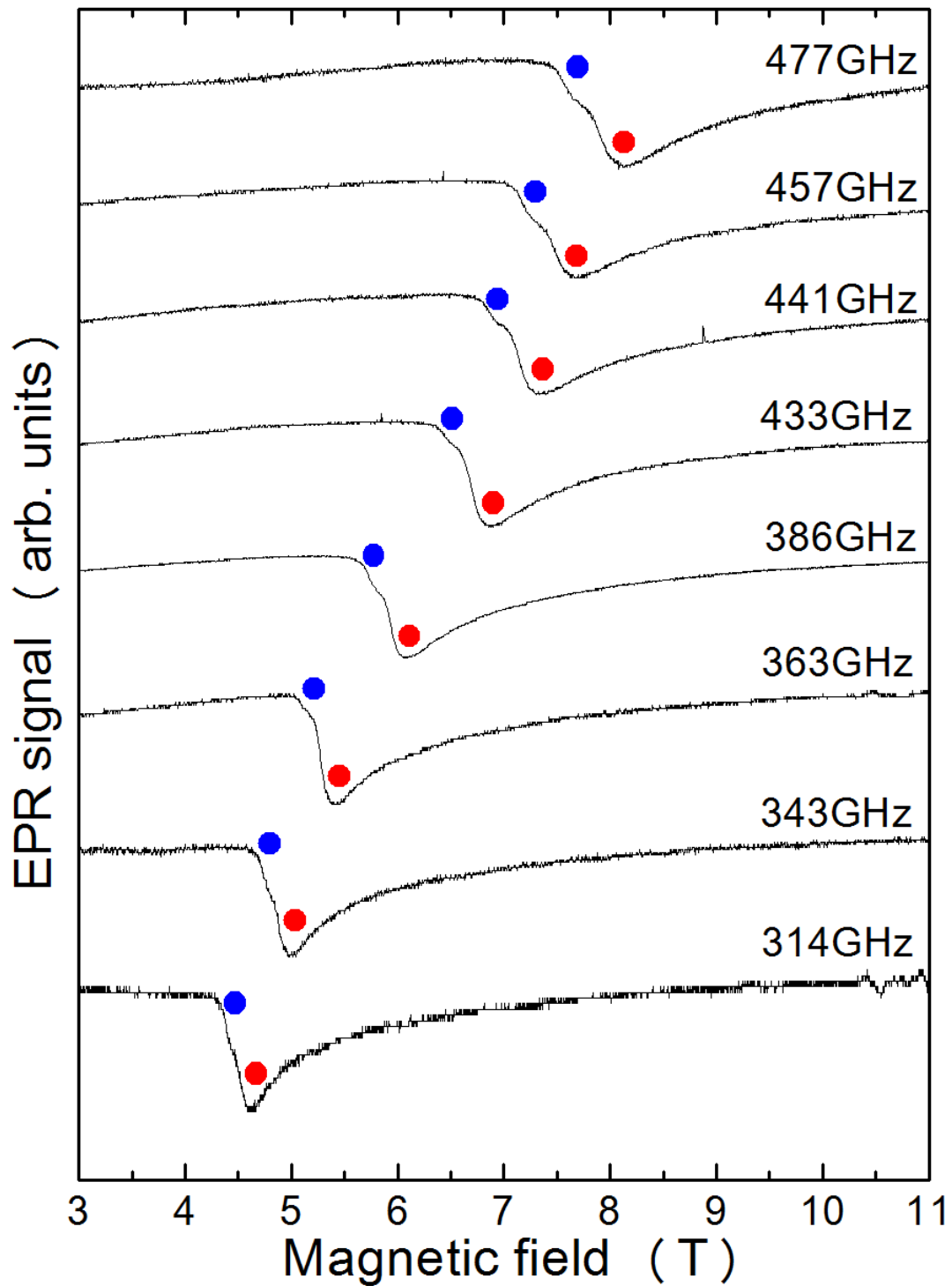


図 4-4 314 GHz から 477 GHz までの周波数範囲で得られた EPR スペクトルについて、3 T から 11 T の範囲で拡大した図。

磁波強度の比較的強い低周波数領域 (105-160 GHz) でのみスペクトルの肩として観測することが出来たが、214 GHz 以上の周波数ではノイズに埋もれてしまったために肩は観測出来なかった。105 GHz から 214 GHz までの周波数範囲では、この非対称なスペクトルで表される EPR モードのみ観測された。

次に 258 GHz 以上の周波数範囲に目を向けてみる。258 GHz から 386 GHz までの範囲では、 $g_{\text{perp}}$  吸収よりも低磁場側に新たな EPR モード ( $\alpha$  モードとする) が観測された。この新しい EPR モードの共鳴磁場は、電磁波の周波数が高くなるにつれて低磁場側へシフトしていき、400 GHz 付近ではほぼ 0 T に到達することが分かった。この  $\alpha$  モードの吸収の谷は  $g_{\text{perp}}$  吸収の谷と比べると吸収強度は弱かった。

さらに周波数を上げていくと、433 GHz 以上の周波数では、約 1 T 付近に  $\alpha$  モードとは異なる新たな EPR 吸収 ( $\beta$  モードとする) が観測された。この EPR モードは、 $\alpha$  モードとは対照的に、電磁波の周波数が高くなるにつれて高磁場側へシフトしていき、704 GHz においては 4 T で観測された。 $\beta$  モードも、 $g_{\text{perp}}$  モードと比べると吸収強度は弱かった。

過去に報告されているヘミンクロライドのテラヘルツ EPR による研究では、 $g_{\text{perp}}$  吸収と  $g_{\text{para}}$  吸収を両端とするモードおよび  $\beta$  モードについてのみ報告されていたが[4.16]、本研究で初めてヘミンクロライドの  $\alpha$  モードを観測することに成功した。

次に、314 GHz から 477 GHz までの  $g_{\text{perp}}$  吸収付近の EPR スペクトルを拡大し、 $g_{\text{perp}}$  吸収を注意深く解析してみる。図 4-4 にその拡大図を示す。これを見ると、 $g_{\text{perp}}$  吸収の大きな谷の低磁場側に肩が一つ見えている。このことから、 $g_{\text{perp}}$  吸収は二つにスプリットして観測されていることが分かった。比較的low周波数の領域では観測されなかった  $g_{\text{perp}}$  吸収の肩が、314 GHz 以上では観測されており、強磁場を印加することにより  $g_{\text{perp}}$  吸収の谷が二つにスプリットしたと考えられる。314 GHz から徐々に周波数を上げるにつれてスプリット幅は大きくなり、肩がはっきりしてくることがよく分かる。314 GHz でのスプリット幅は 300 mT 程度であるが、477 GHz では 500 mT 程度まで広がっている。ヘミンクロライドの  $g_{\text{perp}}$  吸収のスプリットの観測は本研究が初めてであり、ヘム面内の磁気異方性に関する議論が可能になった。

ただ一方で、505 GHz 以上では、こうしたスプリットが明瞭に観測されなかった。この理由については次節にて議論する。

## 4-4 考察

### 4-4.1 $g_{\text{perp}}$ 吸収のスプリットについての解釈と スピンハミルトニアンパラメータの見積もり

$g_{\text{perp}}$  吸収のスプリットは、ポルフィリン面内の磁気異方性の直接的証拠であり、ゼロ磁場分裂の面内異方性定数  $E$  がゼロでないことを示している。図 4-5 に、本研究で観測されたすべての EPR 吸収の谷部分の共鳴磁場と電磁波周波数の関係（周波数-磁場プロット）を示す。後述するスピンハミルトニアンパラメータを用いて、吸収の谷になると期待される共鳴磁場と周波数の関係をシミュレーションした曲線も示した。実線、点線、および破線はそれぞれ、配位子場の  $x$  軸、 $y$  軸、および  $z$  軸方向に外部磁場が印加された場合に対応している。 $x$  軸、 $y$  軸はおおよそポルフィリン面内に、 $z$  軸は軸配位子方向に取る事が出来る。

周波数-磁場プロットの結果から、ヘミンクロライドの鉄イオン周囲の電子状態を示すスピンハミルトニアンパラメータは以下のような解析過程で決定することが出来る。まず、 $D$  値は  $\alpha$  モードと  $\beta$  モードが 0 T に突き刺さる周波数（縦軸切片）から決定出来る。ただしこれは、 $E$  値が  $D$  値に比べて非常に小さく、ゼロ磁場分裂の大きさへの寄与が小さいと仮定した場合のみ正しい。この測定に用いたヘミンクロライドでは  $E$  値が  $D$  値に比べてかなり小さいと想定されるため有効であると考えた。次に、 $E = 0$  を仮定して、周波数-磁場プロットでシミュレーション曲線が  $g_{\text{perp}}$  の平均値を通過するように  $g_x$  と  $g_y$  を決定する。ポルフィリン面内の磁気異方性がある場合は、 $g_x$  と  $g_y$  の値は一致しないはずであるが、今回はその値の違いまで見積もることは困難であったので、 $g_x = g_y$  と仮定した。 $|E|$  値は  $g_{\text{perp}}$  吸収のスプリット幅から決定される。さらに、 $g_z$  の値は、 $\alpha$  モードと  $g_{\text{para}}$  吸収の谷のプロットの傾きから決定される。このようにして、ヘミンクロライドのスピンハミルトニアンパラメータは、 $g_x = g_y = 1.93 \pm 0.01$ 、



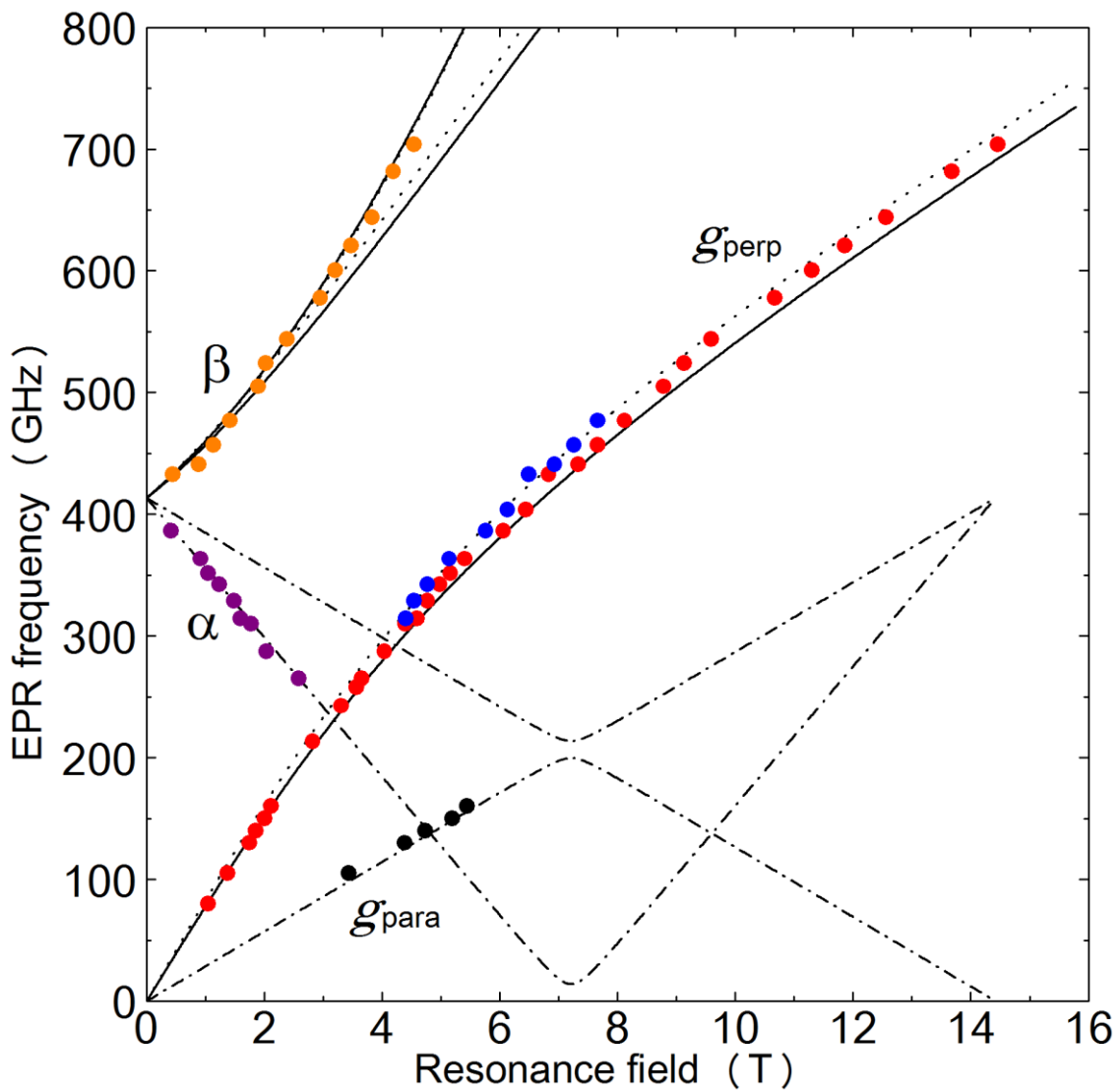


図 4-5 本研究で得られた EPR スペクトルの吸収の谷を共鳴磁場と周波数の関係でプロットしたもの。実線、点線、および破線はそれぞれ、配位子場の x 軸、y 軸、および z 軸方向に外部磁場が印加された場合に対応している。黒、赤、青、紫、橙色の●はすべて実験で得られた吸収を表している。

$g_z = 2.05 \pm 0.01$ 、 $D = 6.90 \pm 0.01 \text{ cm}^{-1}$ 、 $|E| = 0.055 \pm 0.005 \text{ cm}^{-1}$  と見積もられた。ここで、 $g_x$ 、 $g_y$ 、 $g_z$  はそれぞれ  $x$ 、 $y$ 、 $z$  軸方向の本質的な  $g$  値を表している。これらのパラメータを用いて、代表的な周波数における EPR スペクトルの再現を試みた。図 4-6 にシミュレーションの結果を、実験で得られた EPR スペクトルとともに示す。線幅の設定は各周波数によって異なるが、同じスピンハミルトニアンパラメータを用いて良い一致が得られた。

図 4-7(a)に  $B // x$ 、 $y$  の場合を、図 4-7(b)に  $B // z$  でのヘミンクロライドの基底状態のエネルギーダイアグラムを示す。この図から、 $g_{\text{perp}}$  吸収と  $g_{\text{para}}$  吸収は、それぞれ図 4-7(a)と図 4-7(b)において、最低エネルギー準位から二番目のエネルギー準位間の遷移に当たることが分かる。 $E$  値がゼロでないため、 $B // x$ 、 $y$  それぞれの場合のエネルギーダイアグラムには若干違いが生じていることが分かる。この違いは磁場が高くなるにつれてはつきりしてくることから、 $g_{\text{perp}}$  吸収が強磁場中でスプリットすると理解出来る。一方、 $\alpha$  モードは図 4-7(b)において二番目のエネルギー準位から三番目のエネルギー準位間の遷移に対応しており、 $\beta$  モードは図 4-7(a)において最低エネルギー準位から四番目のエネルギー準位間の遷移に対応していることが分かる。粉末試料の EPR 測定であるため、各モードの EPR スペクトルは図 4-7(a)、4-7(b)に示した各印加磁場方向の EPR 吸収だけでなく、全方位に磁場を印加した場合の各 EPR 信号が重ね合わされた結果である。例として図 4-8 に、314 GHz において  $\theta = 0^\circ$ 、 $\varphi = 0^\circ$  ( $B // z$ )から  $\theta = 90^\circ$ 、 $\varphi = 0^\circ$  ( $B // x$ )までの様々な角度で磁場を印加した際に期待される EPR スペクトル (単結晶の EPR スペクトル) のシミュレーションを示す。スピンハミルトニアンパラメータは上記で見積もられたものを使用した。この図を見ると、 $\alpha$  モードについては  $\theta = 0^\circ$  ( $B // z$ )から印加磁場方向を傾けていっても、 $\theta = 50^\circ$  くらいまでは共鳴磁場の位置がほとんど変化しないことが分かる。つまり、共鳴磁場の角度依存性が比較的小さな角度領域が存在することを意味している。その結果、単結晶の EPR スペクトルでは  $\alpha$  モードは  $g_{\text{perp}}$  吸収よりもかなり小さな信号強度であるにも関わらず、EPR 信号の重ね合わせの効果が大きく表れることで明瞭な EPR 吸収として観測出来ることが分かった。また、 $\beta$  モードについても同様に、 $x$ 、 $y$  軸方向に磁場を印加した場合とそこから少し印加磁場方向を傾

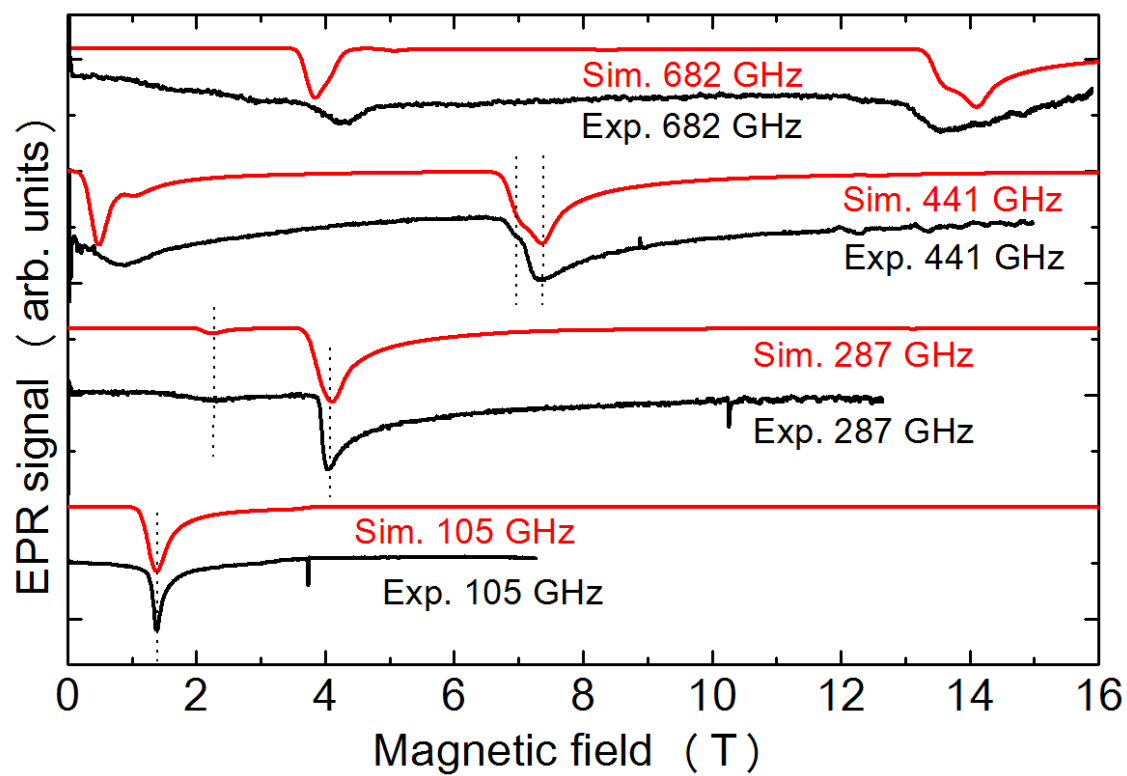


図 4-6 105 GHz、287 GHz、441 GHz、682 GHz における実験で得られた EPR スペクトル (黒) とシミュレーション結果 (赤)。

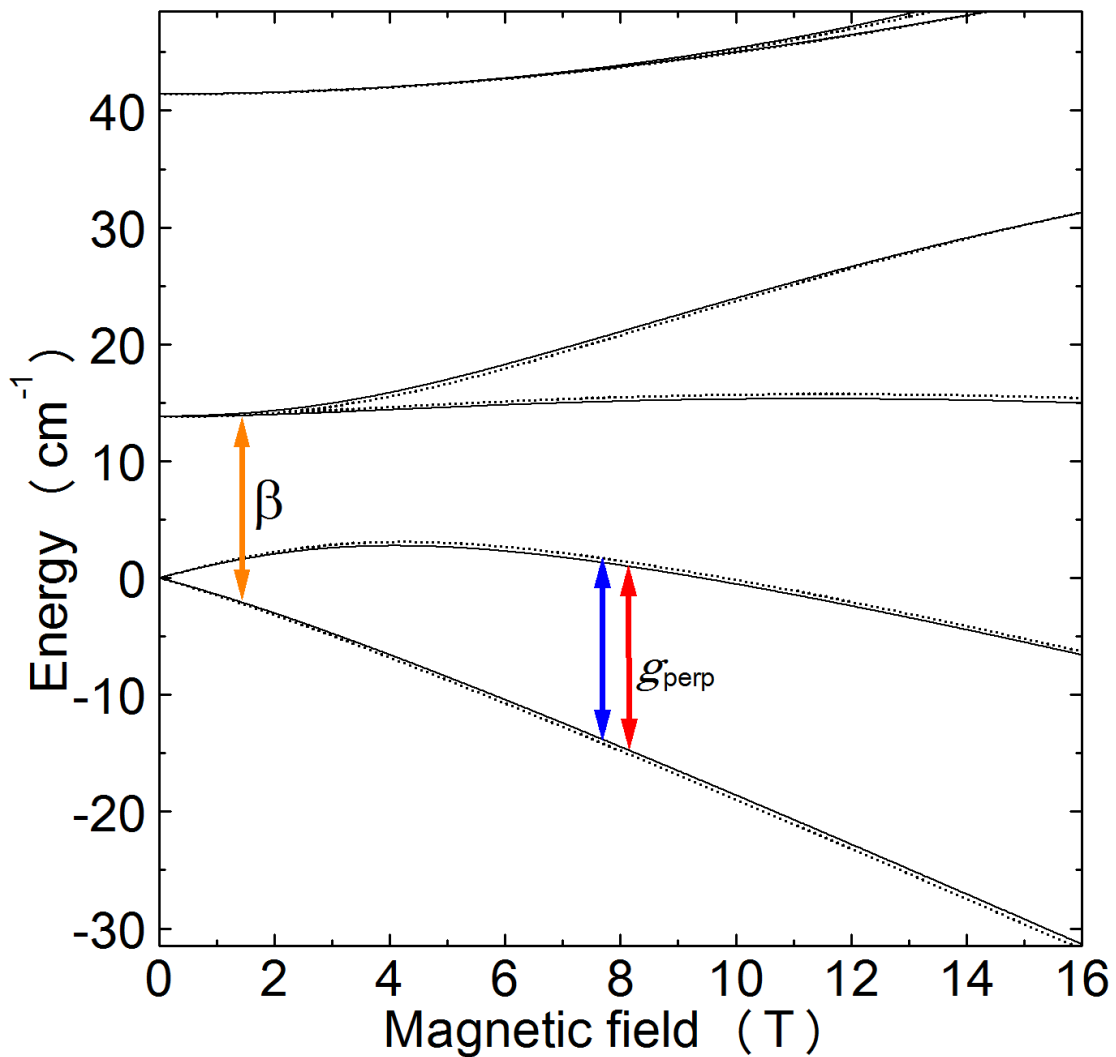


図 4-7(a) 磁場をへム面内方向 ( $B // x, y$ ) に印加した時のヘミンクロライドの基底状態のエネルギー準位図。実線は  $B // x$ 、点線は  $B // y$  を示している。青色の矢印は 441 GHz における  $B // y$  の  $g_{\text{perp}}$  吸収、赤色の矢印は 441 GHz における  $B // x$  の  $g_{\text{perp}}$  吸収、橙色の矢印は 441 GHz における  $\beta$  モード ( $B // x, y$  の区別は出来ていない) の EPR 遷移を表している。

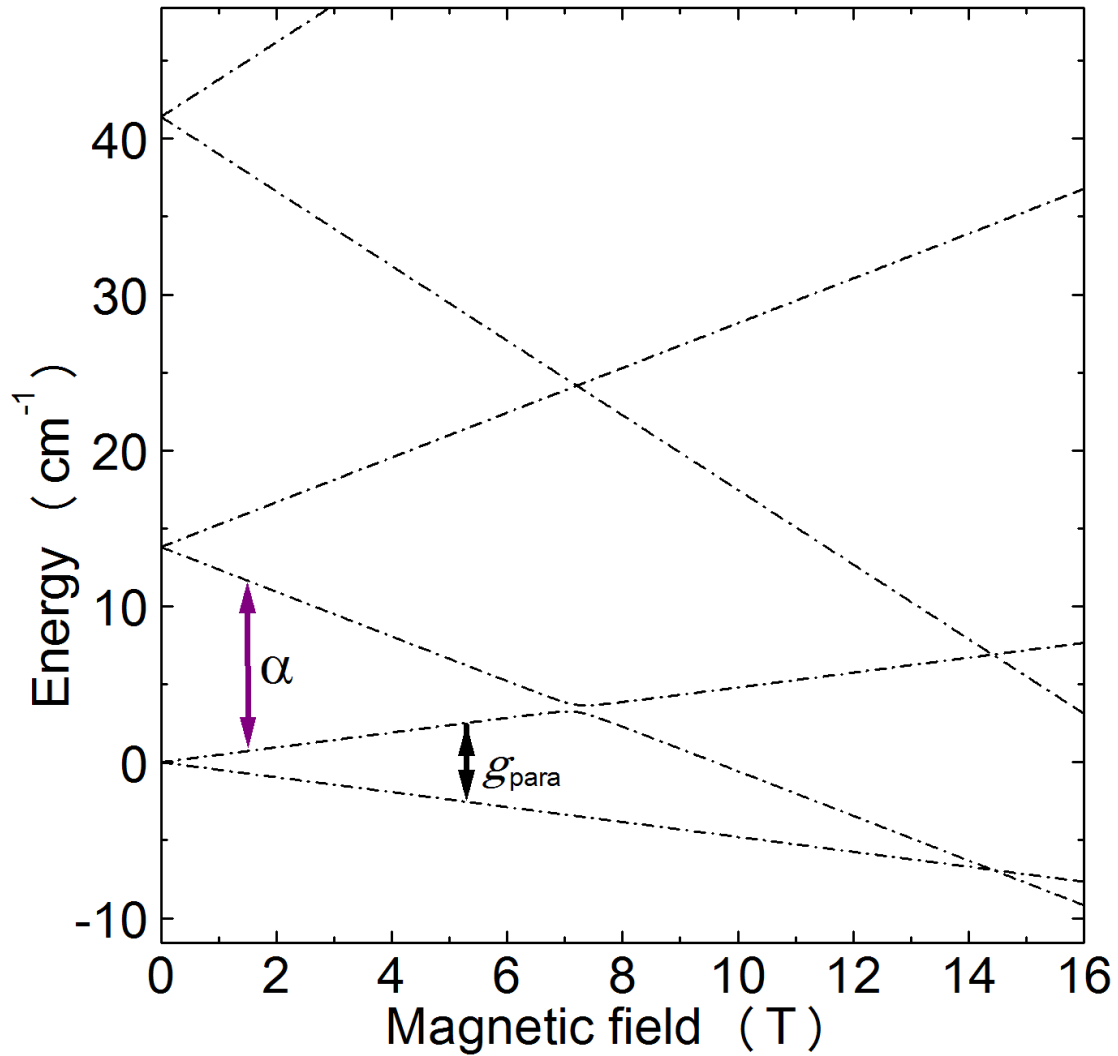


図 4-7(b) 磁場を軸配位子方向 ( $B // z$ ) に印加した時のヘミンクロライドの基底状態のエネルギー準位図。紫色の矢印は 314 GHz における  $\alpha$  モード、黒色の矢印は 160 GHz における  $g_{\text{para}}$  吸収の EPR 遷移を表している。

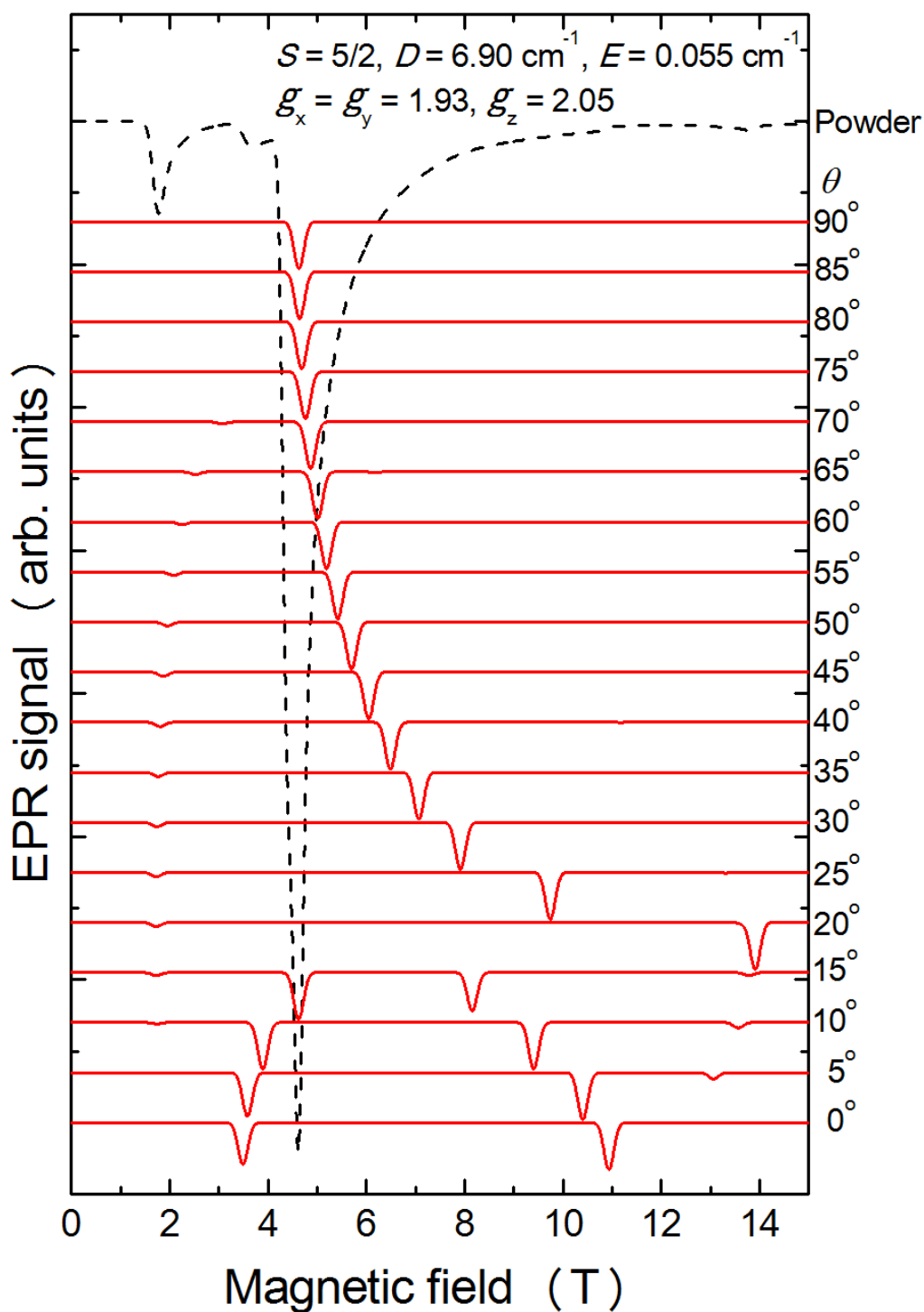


図 4-8 314 GHz における EPR 信号の角度依存性。赤の実線は様々な角度に磁場を印加した場合の単結晶の EPR スペクトルである。 $\theta = 0^\circ$ は  $B // z$ 、 $\theta = 90^\circ$ は  $B // x$  を表している。破線はパウダーパターンの EPR スペクトルである。 $\alpha$  モードの EPR 信号は 2 T 付近の小さな吸収の谷に対応する。

けた場合の共鳴磁場の位置があまり変化しないため、明瞭な吸収として観測出来る。

ただし、 $\alpha$  モードについて、図 4-7(b)のエネルギーダイアグラムで  $\alpha$  モードの吸収が観測されることはないことを注意しておく。 $B // z$  の場合には、純粋に  $\Delta S_z = \pm 1$  の条件下でのみ許容遷移となり、それ以外の条件においては EPR 禁制のため観測出来ない。しかし、印加磁場方向が  $z$  軸から少しでも傾けば、EPR 許容となり、観測可能となる。

#### 4-4.2 $g_{\text{perp}}$ 吸収のスプリットが観測されなかった周波数領域について

310 GHz 以下の周波数領域では、 $g_{\text{perp}}$  吸収のスプリットを観測することが出来なかった。これはスペクトル分解能が不十分であることが理由として挙げられる。287 GHz において EPR スペクトルのシミュレーションを行った際（図 4-6）、EPR スペクトルの本質的な線幅は  $\Delta B = 0.1$  T 程度と見積もられた。この周波数領域における共鳴磁場のスプリット幅は 0.2 T 程度であったため、スプリットがはっきりしなかったと考えられる。このことはシミュレーションからも吸収波形のスプリットが不明瞭となることが再現された。

次に、505 GHz 以上の周波数領域において、 $g_{\text{perp}}$  吸収のスプリットが観測されなかった理由について考えてみる。このあたりの周波数領域から、急に  $g_{\text{perp}}$  吸収の始まりの傾きが緩やかになっている。これは、EPR 信号の本質的な線幅が広がっていることによるものと考えられ、結果として、 $g_{\text{perp}}$  吸収の分裂による肩がぼやけてしまったと推測出来る。ではこの周波数領域から線幅がなぜ広がったのか、という点については今のところ理由が明らかではない。しかし、過去のヘム鉄の研究報告の中で、同様のスペクトル幅の増大について議論された例がある。2006 年に、Miyajima らによりアコメトミオグロビン[1.29]の多周波数 EPR 測定の結果が報告されている。それによると、 $g_{\text{perp}}$  吸収に対応する EPR 吸収では、ある周波数から急に線幅が増大している。この文献ではその原因として Orbach 過程と呼ばれる緩和過程に似たプロセスが寄与している可能性を指摘している。

Orbach 過程は、通常のスピン緩和過程（直接過程と呼ばれる）とは異なり、他のエネルギー準位を利用してエネルギー緩和を行うプロセスである。EPR により電子スピンの遷移した先のスピン準位と、別の異なるスピン準位間のエネルギー差が、電磁波のエネルギーと同程度であれば、Orbach 過程のようなエネルギー緩和のプロセスが起こりやすくなり、直接過程と Orbach 過程に似た緩和過程が同時に起こりうると考えられている。実際、 $B // x, y$  のエネルギーダイアグラムを見ると、最低エネルギー準位から二番目に低いエネルギー準位のエネルギー差と、二番目に低いエネルギー準位と三番目に低いエネルギー準位もしくは四番目に低いエネルギー準位のエネルギー差は、同程度であり、このような緩和過程の存在は否定出来ない。EPR の緩和過程では直接過程が支配的であるが、他の緩和過程も同時に寄与するようになると、全体としてのスピンのエネルギー緩和時間は短くなるため、最終的に線幅が増大すると考えられる。ミオグロビンの EPR 緩和プロセスについては磁化率測定から Orbach 過程のような緩和に関わるエネルギー準位の存在とその寄与が示唆されている[4.20]。そのため、同様のメカニズムがヘミンクロライドにおいても効いている可能性がある。

#### 4-4.3 配位子場理論を用いた実験結果の解釈

最後に、ゼロ磁場分裂の起源について議論しておく。図 4-9 に、自由な  $\text{Fe}^{3+}$  イオンの場合の  ${}^6S$  状態と  ${}^4G$  状態で表されるスピン状態が、立方対称、正方対称、斜方対称な配位子場中においてどのような修正を受けるかを示す。また、それぞれのスピン状態において実現している  $3d$  軌道上のスピン配置を模式的に示す。配位子場の影響を受けない自由な  $\text{Fe}^{3+}$  イオンは、 $3d^5$  の電子配置を持つので、基底状態は LS 多重項の表記で  ${}^6S$  ( $S = 5/2, L = 0$ ) である。 $\text{Fe}^{3+}$  イオンが弱い配位子場中に置かれると、基底状態の表記は六重項の  ${}^6A_1$  ( $S = 5/2$ ) 状態となる。この状態が、いわゆる高スピン状態である。

${}^6A_1$  の軌道角運動量は  $L = 0$  であり空間的に高い対称性を持つため、基底状態を考えるだけでは磁気異方性の効果は表現出来ない。他の励起状態との混ざり合いを考慮することで初めて、 ${}^6A_1$  で表される  $S = 5/2$  のスピン系がゼロ磁場分



裂を起こして三つの Kramers 二重項 ( $S_z = \pm 1/2, \pm 3/2, \pm 5/2$ ) に分かれることを説明することが可能となる。第一章でも述べたように、遷移金属錯体におけるゼロ磁場分裂の起源としては、スピン-軌道相互作用が支配的であることが良く知られており、このスピン-軌道相互作用を介した  ${}^6A_1$  と励起状態の混ざり合いを考慮する必要がある。磁性イオンを有するポルフィリン錯体の磁気異方性に関してはこれまでも理論的な研究が数多く報告されている[4.6, 4.12, 4.21-4.25]。

弱い配位子場中において、 $3d^5$  イオンにおける基底状態  ${}^6A_1$  の電子配置は  $(d_{xy})^1(d_{yz})^1(d_{xz})^1(d_{z^2})^1(d_{x^2-y^2})^1$  である。 ${}^6A_1$  状態とスピン-軌道相互作用を持つ励起状態の中で最もエネルギーの低い状態は、立方対称な配位子場において  ${}^4T_1$  状態 (自由な  $3d^5$  イオンにおける  ${}^4G$  状態に対応) と表記され、三つの四重項状態が縮退している。配位子場の対称性がさらに低くなると、 ${}^4T_1$  状態は正方対称な配位子場において  ${}^4E$  および  ${}^4A_2'$  と呼ばれる状態に分かれる。さらに配位子場の対称性が低くなった斜方対称な配位子場中では、 ${}^4E$  はさらに  $E_x$  および  $E_y$  状態に分かれる。 $E_x$ 、 $E_y$ 、および  ${}^4A_2'$  状態の電子配置はそれぞれ、

$$E_x : (d_{xy})^1(d_{yz})^2(d_{xz})^1(d_{z^2})^1,$$

$$E_y : (d_{xy})^1(d_{yz})^1(d_{xz})^2(d_{z^2})^1,$$

$${}^4A_2' : (d_{xy})^2(d_{yz})^1(d_{xz})^1(d_{z^2})^1,$$

である。これらの三つの励起状態は、基底状態  ${}^6A_1$  と比べると、 $d_{x^2-y^2}$  軌道上の一つの電子が  $t_{2g}$  軌道 ( $d_{xy}$ 、 $d_{yz}$ 、または  $d_{xz}$ ) のいずれか一つの軌道へ移動したと考えることが出来る。

ここで、 $Fe^{3+}$  イオンが斜方対称場中に存在すると考え、 ${}^6A_1$  状態と  ${}^4A_2'$ 、 $E_x$ 、 $E_y$  状態それぞれとのエネルギー差を  $\Delta({}^4A_2')$ 、 $\Delta(E_x)$ 、 $\Delta(E_y)$  と定義する。この場合、ゼロ磁場分裂定数  $D$ 、 $E$  は次のように書ける[1.35]。

$$D = \frac{\zeta^2}{10} \left[ \frac{2}{\Delta({}^4A_2')} - \left( \frac{1}{\Delta(E_x)} + \frac{1}{\Delta(E_y)} \right) \right] \quad (4-2)$$

$$E = \frac{\zeta^2}{10} \left[ \frac{1}{\Delta(E_x)} - \frac{1}{\Delta(E_y)} \right] \quad (4-3)$$

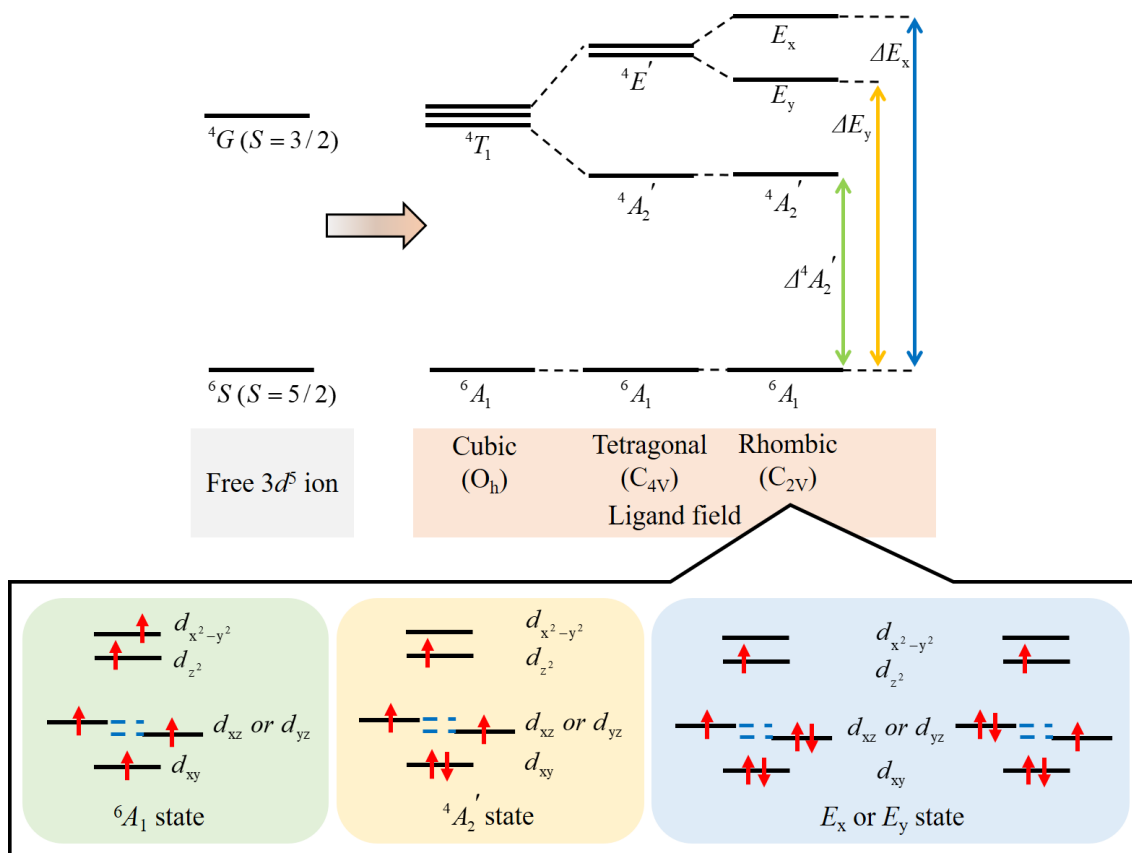


図 4-9 多重項表記による基底状態および基底状態とスピン軌道相互作用で結合する最低エネルギーの励起状態について、自由なイオンの場合と配位子場中での電子状態の分裂の様子。下には斜方対称場における各電子状態における  $3d$  軌道のスピン配置を表している。

ここで、 $\zeta$ はスピン-軌道相互作用定数である。したがって、 $E$  値は正方対称場ではゼロになるが、斜方対称場ではゼロでない。X線構造解析の結果によると[4.26]、四つの窒素原子によって形成された配位子場の  $xy$  面は 0.2 度ほど正方形から斜方形にわずかに歪んでいる。ヘミンクロライドにおけるこの小さな歪みは、ポルフィリン環に結合した側鎖の影響か、もしくは Jahn-Teller 歪みによるものと考えられる[4.27, 4.28]。

観測された  $g_{\text{perp}}$  吸収のスプリットは、4-2 式、4-3 式のように、配位子場の斜方対称性により  ${}^4E$  状態の二重縮退が解けていることを示している。本研究の結果から、ヘミンクロライドのゼロ磁場分裂定数  $D$ 、 $E$  の比は、 $|E/D| \sim 0.008$  と非常に小さいことが分かった。4-1 節で述べたように、INS 法や遠赤外分光法のような測定法ではスペクトル分解能が不十分であり、ヘミンクロライドの  $E$  値を精密に見積もることが出来なかったと考えられる。

#### 4-4.4 量子化学計算を用いた実験結果の妥当性の検討

第一章で述べたように、ヘム鉄錯体およびその誘導体の  $D$  値、 $E$  値の理論計算による精密な見積もりは成功していない。しかし、本研究において、実験結果が妥当なものであるかどうかを定性的に理論計算から評価することは重要であると考えられる。そこで量子化学計算に基づく、ゼロ磁場分裂定数の評価を行った。以下にその流れを示す。

まず、 $E$  値がゼロではないので、ヘム鉄の配位子場は斜方対称であると考えられる。この場合、 $3d$  軌道は低いエネルギーの方から、 $d_{xy}$ 、 $d_{yz}$ 、 $d_{xz}$ 、 $d_{z^2}$ 、 $d_{x^2-y^2}$  の順に、全軌道の縮退が解けた状態で存在する。 $d_{yz}$  軌道、 $d_{xz}$  軌道のどちらが低いエネルギー準位に存在（つまりエネルギー的に安定）するかは、 $E$  値の符号で決まっており、 $E$  値が正であれば  $d_{yz}$  軌道の方が安定し、負であれば  $d_{xz}$  軌道の方が安定であることになる。今回の実験結果から、 $E$  値の正負を決めることは出来ないため、ここでは  $d_{yz}$  軌道と  $d_{xz}$  軌道とのエネルギー準位の大小関係は考えない。

$D$  値と  $E$  値を、理論計算からそれぞれ独立に求めようとした場合、4-2 式、4-3 式を見ると分かるように、スピン-軌道相互作用定数  $\zeta$  を求める必要がある。

自由な  $\text{Fe}^{3+}$  イオンのスピン-軌道相互作用定数については知られているが[4.14]、今回の計算ではこの値をそのまま用いることは出来ない。そのため、 $D$  値と  $E$  値を独立に導出することは困難である。一方、4-2 式、4-3 式から  $|E/D|$  を求めると、

$$\left| \frac{E}{D} \right| = \left| \frac{\frac{1}{\Delta(E_x)} - \frac{1}{\Delta(E_y)}}{\frac{2}{\Delta(^4A_2')} - \left( \frac{1}{\Delta(E_x)} + \frac{1}{\Delta(E_y)} \right)} \right| \quad (4-4)$$

と書くことが出来るため、スピン-軌道相互作用定数に依存しない表式となる。そこで量子化学計算からパラメータである  $\Delta(^4A_2')$ 、 $\Delta(E_x)$ 、 $\Delta(E_y)$  を理論的に求め、4-4 式に代入することで  $|E/D|$  の値が妥当かどうかを評価した。

本研究では、神戸大学大学院理学研究科化学専攻の小堀康博教授が所有する Gaussian09 と呼ばれる量子化学計算ソフトを利用した[4.26]。このソフトでは密度汎関数理論 (DFT : Density Functional Theory、電子密度を試行関数として用いた第一原理計算手法) による分子軌道計算が可能であり、分子上の電子スピン密度を計算することで EPR など分光学的実験結果の裏付けなどに利用されている。本研究では、ヘミンクロライドの原子座標データを入力し[4.27]、B3LYP/6-31g(d, p) と呼ばれる基底汎関数を用いて、ゼロ磁場分裂の式に関わる基底状態 ( $S = 5/2$ ) および励起状態 ( $S = 3/2$ ) について DFT 計算を実行した。基底状態に対しては時間発展のない DFT 計算、励起状態に対しては時間発展を考えた TD-DFT 計算 (TD : Time Dependent) を行った。

計算結果の詳細な解析方法については Appendix-3 に記述するが、最終的に量子化学計算から  $\Delta(^4A_2') = 2329 \text{ cm}^{-1}$ 、 $\Delta(E_x) \sim 8371 \text{ cm}^{-1}$ 、 $\Delta(E_y) \sim 8447 \text{ cm}^{-1}$ 、 $\Delta(E_x) - \Delta(E_y) = 125 \text{ cm}^{-1}$  という値が得られた。4-4 式を変形して、

$$\left| \frac{E}{D} \right| = \left| \frac{\Delta(E_x) - \Delta(E_y)}{\frac{2\Delta(E_x)\Delta(E_y)}{\Delta(^4A_2')} - \Delta(E_x) - \Delta(E_y)} \right| \quad (4-5)$$

と書き直し、上述の値を代入すると  $|E/D| = 0.002$  という結果が得られた。従って、実験結果から得られた  $|E/D| \sim 0.008$  と比べると、両者の間でオーダーは一

致していることが分かる。このことから、実験結果の妥当性が DFT 計算からも支持されたと考えている。

## 4-5 まとめ

本研究では、ヘムタンパク質モデル錯体のヘミンクロライドに対して、パルス磁場を用いて、磁場掃引型の強磁場・テラヘルツ EPR 測定を行った。703 GHz までの広い周波数領域において EPR 信号を観測することに成功し、ゼロ磁場分裂定数および  $g$  値の主値を決定することに成功した。特に、ポルフィリン面内の磁気異方性を示すゼロ磁場分裂定数  $E$  を決定したのは本研究が初めてである。このことは磁場掃引型の強磁場・テラヘルツ EPR 測定法が有する高いスペクトル分解能がこうしたヘム鉄錯体およびその誘導体である金属ポルフィリン錯体の電子状態解析に有効であることを意味している。

最近では遷移金属錯体のゼロ磁場分裂定数の起源を説明するため、第一原理計算に基づいた理論的なアプローチが積極的に進められている。こうした配位子場理論の枠を超えた理論計算でも、現状では実験で得られる  $D$  値の傾向を定性的に説明することが出来るだけで、定量的な一致は見られない。そのため、 $D$  値よりも小さい  $E$  値の理論的計算はさらに難しく、現状ではほとんど考慮されていない。そのため、将来的には  $D$ 、 $E$  値両方について十分に説明出来るよう、さらなる理論的計算手法の進展が望まれる。本研究で得られた成果はそのような理論的研究の妥当性をテストする上で、良い試金石になるのではないかと期待している。

## [参考文献]

- [4.1] L. R. Milgrom, *The Colours of Life: An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*, (Oxford University Press, New York, 1997).
- [4.2] A. N. Vzorov, D. W. Dixon, J. S. Trommel, L. G. Marzilli, R. W. Compans, *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3917 (2002).
- [4.3] K. M. Smith (Ed.), *Porphyrins and Metalloporphyrins*, (Elsevier, Amsterdam, 1975).
- [4.4] A. Sienkiewicz, J. Krzystek, B. Vilenko, G. Chatain, A. J. Kosar, A. S. Bohle, L. J. Forró, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 4534 (2006).
- [4.5] C. Duboc, T. Phoeurg, S. Zein, J. Pécaut, M.-N. Collomb, F. Neese, *Inorg. Chem.* **46**, 4905 (2007).
- [4.6] M. Idešicová, J. Titiš, J. Krzystek, R. Boča, *Inorg. Chem.* **52**, 9409 (2013).
- [4.7] J. Nehrkorn, B. M. Martins, K. Holldack, S. Stoll, H. Dobbek, R. Bittl, A. Schnegg, *Mol. Phys.* **111**, 2696 (2013).
- [4.8] G. C. Brackett, P. L. Richards, W. S. Caughey, *J. Chem. Phys.* **54**, 4383 (1971).
- [4.9] M. Horitani, H. Yashiro, M. Hagiwara, H. Hori, *J. Inorg. Biochem.* **102**, 781 (2008).
- [4.10] A. J. Bearden, T. H. Moss, W. S. Caughey, C. A. Beaudreau, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **53**, 1246 (1965).
- [4.11] F. Paulat, N. Lehnert, *Inorg. Chem.* **47**, 4963 (2008).
- [4.12] K. Sakai, H. Masumoto, K. Ichimura, H. Kojima, *Appl. Opt.* **17**, 1709 (1978).
- [4.13] H. Uenoyama, *Biochim. Biophys. Acta: Gen. Subj.* **230**, 479 (1971).
- [4.14] S. E. Stavretis, M. Atanasov, A. A. Podlesnyak, S. C. Hunter, F. Neese, Z.-L. Xue, *Inorg. Chem.* **54**, 9790 (2015).
- [4.15] S. C. Hunter, A. A. Podlesnyak, Z.-L. Xue, *Inorg. Chem.* **53**, 1955 (2014).
- [4.16] J. Nehrkorn, J. Telser, K. Holldack, S. Stoll, A. Schnegg, *J. Phys. Chem. B* **119**, 13816 (2015).
- [4.17] M. Motokawa, H. Ohta, N. Maki, *Int. J. Infrared Millimeter Waves* **12**, 149 (1991).

- [4.18] S. Kimura, H. Ohta, M. Motokawa, S. Mitsudo, W.-J. Jang, M. Hasegawa, H. Takei, *Int. J. Infrared Millimeter Waves* **17**, 833 (1996).
- [4.19] T. Yonetani, H. Schleyer, *J. Biol. Chem.* **242**, 3926 (1967).
- [4.20] M. M. Dorio, J. Freed (Eds.), *Multiple Electron Resonance Spectroscopy* (Plenum Press, New York and London, 1979).
- [4.21] F. Neese, E. I. Solomon, *Inorg. Chem.* **37**, 6568 (1998).
- [4.22] Q.-Z. Lü, Y. Lu, J.-J. Wang, *Chi. J. Chem. Phys.* **19**, 227 (2006).
- [4.23] R. Takeda, M. Shoji, S. Yamanaka, K. Yamaguchi, *Polyhedron* **24**, 2238 (2005).
- [4.24] K. Atak, R. Golnak, J. Xiao, E. Suljoti, M. Pflüger, T. Brandenburg, B. Winter, E. F. Aziz, *J. Phys. Chem. B* **118**, 9938 (2014).
- [4.25] O. P. Charkin, N. M. Kilmenko, D. O. Charkin, H.-C. Chang, S.-H. Lin, *J. Phys. Chem. A* **111**, 9207 (2007).
- [4.26] D. F. Koenig, *Acta Crystallogr.* **18**, 663 (1965).
- [4.27] S. Yamauchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **77**, 1255 (2004).
- [4.28] S. Yamauchi, K. Takahashi, S. S. M. Islam, Y. Ohba, V. Tarasov, *J. Phys. Chem. B* **114**, 14559 (2010).
- [4.29] See <http://www.hpc.co.jp/gaussian.html/> for information of Gaussian software.

## 第 5 章

Pressure Effect on Zero-Field Splitting Parameter of Hemin: Model Case of Hemoproteins under Pressure



## 5-1 イントロダクション

圧力は、近年タンパク質の研究において重要な物理的パラメータとして認識されつつある[5.1, 5.2]。静水圧を与えると、タンパク質の内部および外部の相互作用、共有結合および水素結合の形成や切断、もしくは溶媒飽和度に変化が起こる。タンパク質は構造中に余分な体積、すなわち「空隙」を持っており、空隙があることで、そのタンパク質が特別な対象に対してのみ選択的に生化学反応や機能活性を起こすことが可能となる。また、タンパク質にある値以上の圧力を印加すると、タンパク質は不可逆な変性を起こしてしまう。最初の例として、**Bridgeman** が卵の卵白に圧力を印加することで変性させた例が知られている[5.3]。典型的には、タンパク質の変性は **0.1 GPa** 程度の圧力で起こるとされる。

タンパク質には天然の状態と変性状態という二つの熱力学的平衡状態が存在しているとされ、両者で互いに構造が異なっている[5.4, 5.5]。常圧の自然環境下では天然状態に平衡が傾いており、生化学的な活性を示す。しかし、圧力を印加し高圧環境を作ると、ルシャトリエの原理に従って変性状態へと熱平衡状態が移動し、それに伴って構造も変化する。ある程度圧力が低い間ではこの変化が可逆的に起こる。しかし、さらにある圧力以上印加すると、タンパク質の  $\alpha$  ヘリックス構造が壊れて（ほどけて）しまい、不可逆的に変性し凝集してしまう。アルツハイマー病の原因物質であるアミロイド繊維もタンパク質の部分変性から生じる凝集体であり、アミロイド繊維の研究に対して圧力軸からの研究も行われている[5.6, 5.7]。このように圧力下におけるタンパク質構造の変化は常圧でタンパク質が本来有する構造揺らぎを拡大したものであると解釈され、常圧では見えにくいタンパク質の構造に関する情報が得られるので、高圧下での研究はタンパク質構造解析のための重要な手段となっている[5.8]。

圧力下でタンパク質およびそのモデル錯体の電子構造を研究する方法として、EPR 法[5.9-5.12]、NMR 法[5.1, 5.13-5.15]、円二色性分光法[5.12]、X線回折[5.16]、ラマン分光法[5.17, 5.18]、光分光法[5.19, 5.20]、および他の方法[5.21, 5.22]を含む様々な分光技術が用いられている。例えば、**McCoy** らは[5.9]、圧力下で部分特異的にスピンラベルを行ったタンパク質の X-band EPR 測定による研究を行

い、タンパク質の圧力下における柔軟性および立体構造の変化について議論した。このように高圧下でのタンパク質研究では、圧力による立体構造の変化に関して議論した報告が圧倒的に多い[5.9-5.22]。しかし、タンパク質に対して圧力をかけることによる効果は、立体構造の変化について議論するだけではすべてを理解することは出来ない。例えば、金属タンパク質および金属酵素において、圧力を与えることによってタンパク質の機能活性に関与する部分に局所的な構造変化がもたらされる。その結果、タンパク質全体の立体構造だけでなく機能活性部位および金属イオンの電子状態が強く影響を受ける[5.23-5.25]。したがって、金属イオン錯体の局所電子構造に対する圧力の影響を調べることは重要である。しかしながら、金属イオンを含む生理的機能活性中心に対する圧力効果については、これまで間接的な手法でしか研究されていない。例えば、ヘムタンパク質中の鉄イオンの電子構造については、光分光法[5.17, 5.26]やNMR法[5.27, 5.28]により圧力下の研究が報告されている。これらの研究ではヘム鉄の配位子およびヘムの側鎖に着目し、圧力を印加することでその部分に構造変化が起きていることを示唆する実験結果が得られている。

一方、EPR法は圧力下における金属イオン周囲の電子構造を高いスペクトル分解能で選択的かつ直接的に調べることが出来るという点で独特であり、他の分光学的手法に比べて有利である[1.29, 4.7, 4.9]。圧力印加の条件下で、ミクロスコピックな観点から鉄イオン周囲の電子状態を明らかに出来れば、圧力軸という物理的パラメータの視点に基づく鉄ポルフィリン錯体の新しい電子状態に関する知見を得ることが可能になる。しかし、圧力下における鉄ポルフィリン錯体のゼロ磁場分裂定数の変化に着目した実験は、これまでメスバウアー分光でしか報告されておらず[5.23, 5.25]、EPR測定もこれまで報告例がない。このような背景には、鉄ポルフィリン錯体が一般に大きなゼロ磁場分裂を有しており、より詳細なEPRの解析を行うためには圧力下で強磁場・テラヘルツEPR測定を行うことが必要となるためである。また、こうした広い周波数範囲において圧力下でEPR測定が可能な研究施設は世界的にも数が少なく、手軽に測定出来ないという現状もその理由の一つに挙げられる[5.29-5.34]。

これまで、常圧下における鉄ポルフィリン錯体のゼロ磁場分裂定数の決定と、その起源を探る研究は多数報告されている。例えば、ポルフィリンの側鎖にフ

エニル基が四つ付いた構造の鉄-テトラフェニルポルフィリンクロライド ([Fe(TPP)]Cl) のゼロ磁場分裂定数については  $D = 6.33 \text{ cm}^{-1}$  であるが、ヘミンクロライドについては第四章で見積もられたように  $D = 6.90 \text{ cm}^{-1}$  である。このようにポルフィリン側鎖の置換基が異なるだけでゼロ磁場分裂定数の値に違いが出ていることから、ポルフィリンの側鎖が鉄イオン周囲の電子構造に影響を与えていることが分かる。また、2015年に Stavretis らが行った非弾性中性子散乱実験から、鉄-テトラフェニルポルフィリン ([Fe(TPP)]X) の軸配位子であるハロゲン原子 X をフッ素 F、塩素 Cl、臭素 Br、ヨウ素 I と変えていくことにより、ゼロ磁場分裂定数の値が  $D = 4.49, 6.33, 8.8, 13.4 \text{ cm}^{-1}$  と増大することが報告されている[4.14]。また、この文献では同時に量子化学計算によって、 $D$  値の理論的見積もりも行っている。

このように最近のヘム鉄およびその誘導体を用いた研究では、鉄イオン周囲の電子構造に関するパラメータの精密決定を行うと同時に、量子化学計算によるゼロ磁場分裂の起源を探る試みが行われている。こうした量子化学計算では、錯体の X 線構造解析のデータを用いて電子密度分布の計算が行われる。その際に化学的相互作用の取り入れ方を工夫することにより、実験結果に近いゼロ磁場分裂定数が得られるかどうかを議論している。しかし、第一章、第四章でも簡単に述べたように、現時点では鉄ポルフィリン錯体のゼロ磁場分裂定数については、符号およびその大きさのオーダーが一致はするものの、精密な一致には至っていない。一方、ポルフィリン構造を持たない鉄錯体および他の金属イオン種錯体の多くでは、ゼロ磁場分裂の大きさがポルフィリン錯体と比べて小さく、こうした量子化学計算によっても精密な再現の得られている例が多い[4.5]。このような背景から、鉄ポルフィリン錯体の圧力効果を調べることは、新たな実験的知見を得るだけでなく、こうした理論計算手法の発展に実験的なサイドから貢献し、結果的に、ヘム鉄の電子状態の理解へ繋がっていくと期待される。

そこで本研究では、ハイブリッド型圧力セルを使用して[3.1, 5.35-5.37]、常圧および高圧力下において、ヘムタンパク質のモデル物質であるヘミンクロライドの強磁場・テラヘルツ EPR 測定を行い、最大発生圧力 2.0 GPa までの範囲でゼロ磁場分裂定数  $D$  の圧力依存性を詳細に調べた。本章の実験から、圧力印加

に伴うヘミンクロライドのゼロ磁場分裂定数の系統的なシフトが観測された。本章ではこの結果に基づいて、ヘミンクロライドのゼロ磁場定数について解析・考察を行った。本章で開発する圧力下における EPR 測定技術・解析技術は汎用性が高く、他のヘムタンパク質および他の金属タンパク質/金属酵素に対しても適用可能である。そのため、本章で開発した手法はミクロスコピックな観点からそれら生体分子の機能活性部位に対する圧力効果を解明していく上で有用であると考えている。次節より、本研究の実験方法、結果、考察について詳細に説明する。

## 5-2 実験方法

図 5-1 に、圧力下における強磁場・テラヘルツ EPR 測定装置のセットアップを示す[3.1, 5.35-5.37]。本研究では透過型の EPR 装置により、ヘミンクロライド粉末試料に対して常圧下および圧力下において強磁場・テラヘルツ EPR 測定を行った。光源として 80-160 GHz の範囲では Gunn 発振器、200-515 GHz の範囲では後進行波管 (BWO) を使用した。図 5-1 に示すように、圧力セルの上部からセル内に導入された電磁波は、試料に吸収されるもしくは透過し、圧力セルの反対側から出ていく。電磁波のカットオフ周波数は、圧力セル内部の直径が 5 mm であるので、約 50 GHz である。圧力セルを透過した電磁波は、クライオスタットの底部に配置された In-Sb 検出器によって検出される。Gunn 発振器使用時は、電源に付属している内部変調機構によって AM 変調をかけた。一方、BWO 使用時は、メカニカルチョッパーにより機械的に電磁波のライトパイプへの導入強度を AM 変調した。In-Sb 検出器で観測した信号はロックインアンプで検出し、参照信号との同期信号のみを取り出すことで高感度な EPR 測定を可能にしている。

本研究で使用した圧力下強磁場・テラヘルツ EPR 測定装置のスピン感度は、DPPH 粉末の EPR 信号の信号雑音比によって事前に見積もられており、その値はおおよそ  $10^{13}$  spins/gauss 程度である。パルス磁場を用いた第四章の手法と比べると感度は高いが、超伝導磁石を用いた従来の透過型の実験装置と比較するとやや（一桁程度）感度が落ちる。その理由として、電磁波が圧力セルを透過す

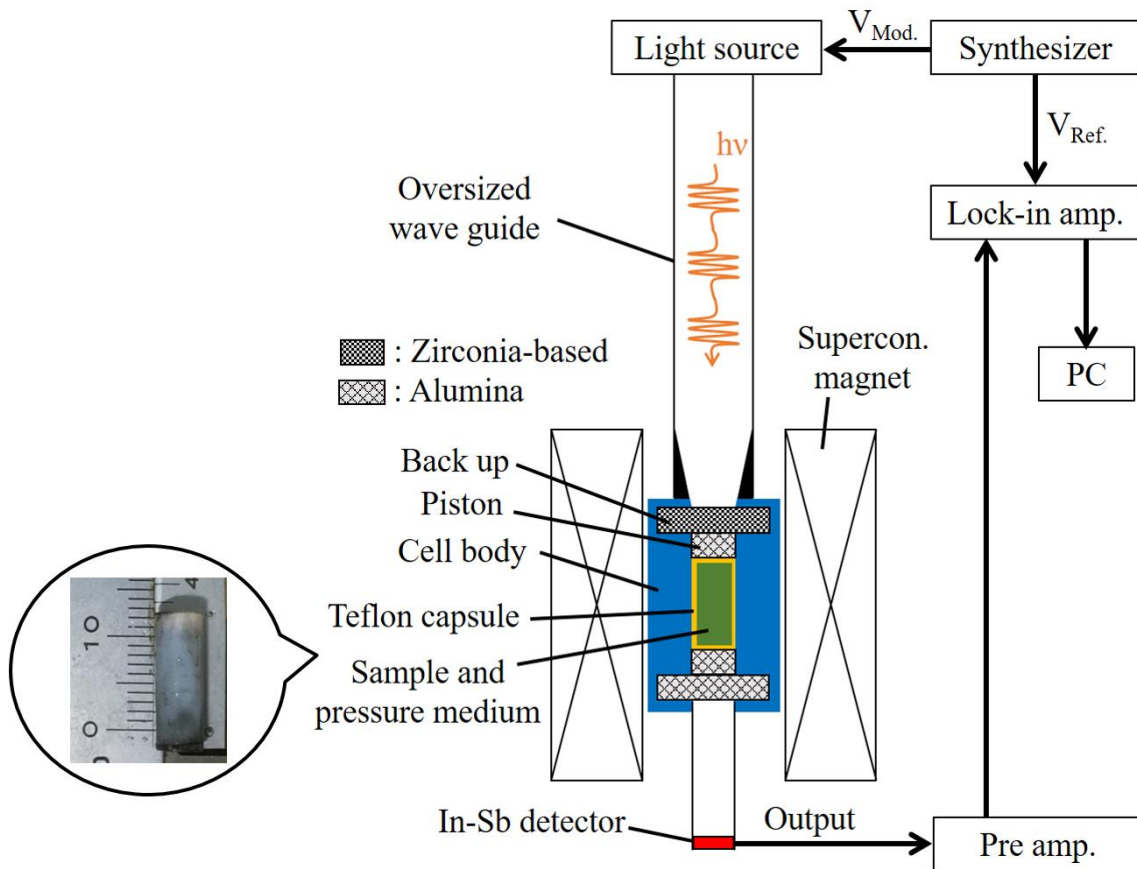


図 5-1 圧力下における強磁場・テラヘルツ EPR 測定装置のブロックダイアグラム。左の写真は本研究で使用したテフロンカプセルであり、ヘミンクロライドの粉末をダフニーオイル 7373 とともに封入している。

る際に生じる電磁波の減衰が挙げられる。すなわち、電磁波の一部が圧力セルの入口で反射される影響や、圧力セル内のジルコニアベースのセラミックス部品による電磁波の吸収などがその原因として挙げられる[5.36]。

外部からの印加磁場は 0.5 T/min の速度で掃引した。試料であるヘミンクロライドの粉末は、購入した試料瓶から取り出したものをそのまま使用した。圧力媒体のダフニーオイル 7373（出光興産株式会社より購入）とともにテフロンカップセルに詰めた。測定に用いた試料の質量は 66 mg であった。

実験データを解析するために、1-7 式に示したスピンハミルトニアンの数値対角化を行い、電磁波の周波数と共鳴磁場の関係を計算した。1-7 式においては、交換相互作用や双極子相互作用などの分子間に働く相互作用については考慮に入れていない。異なる分子に含まれる鉄イオン間にはたらく交換相互作用はゼーマン項と比較して十分に小さい ( $J \approx 0.1 \text{ cm}^{-1}$ ) [5.38] ことが報告されている。また双極子相互作用はさらに小さく、無視出来ると考えられる。本章では小さいながらも有限の大きさを示す交換相互作用の効果を、EPR スペクトルのシミュレーションにおける線幅として取り込んでいる。また、本研究で使用する圧力媒体は 2.2 GPa まで静水圧を維持出来るが、圧力媒体が凍結する低温下では圧力の不均一性が発生する。そのため、次節で示すように EPR スペクトルの線幅の増大が観測された。本研究における EPR 測定はすべて 4.2 K で行った。

### 5-3 実験結果

図 5-2(a)-(e)に、印加圧力  $P = 0, 0.51, 1.00, 1.52, 1.96 \text{ GPa}$  の条件下で得られたヘミンクロライド粉末試料の EPR スペクトルを示す。全測定の流れは以下の通りである。まず、試料を室温で圧力媒体（ダフニーオイル 7373）と混合しテフロンカップセルに密封した後、圧力セル内にセットした。

まず、圧力を印加せず 4.2 K に冷却し、常圧下 ( $P = 0 \text{ GPa}$ ) での EPR 測定を行った。測定後、常温に戻した。

次に圧力  $P = 0.51 \text{ GPa}$  を印加した。再度 4.2 K に冷却し、圧力  $P = 0.51 \text{ GPa}$  下で EPR 測定を行った。測定後、常温に戻してから、圧力セル内部を一度常圧

に戻した。この流れを繰り返して行い、 $P = 1.00$  GPa、 $1.52$  GPa、 $1.96$  GPa の条件を印加圧力の低い順に行った。

各圧力におけるデータは同じ粉末試料について得られたものであり、 $1.96$  GPa での測定後、再び常圧に戻した際、再度常圧での EPR 測定を  $4.2$  K にて行っている。その際、初めに常圧で測定した際の EPR 測定結果と同様の結果を得ている。そのため、本研究で印加した圧力範囲においては、EPR スペクトルは圧力変化に対して可逆的であることを確認している。(Appendix-4 にその結果を示した。)

過去に報告されているメスバウアー分光の結果によれば[5.23]、ヘミンクロライドにおける  $\text{Fe}^{2+}$  と  $\text{Fe}^{3+}$  の比は圧力に依存し、およそ  $5$  GPa 以上の圧力では  $\text{Fe}^{2+}$  の割合が徐々に増加する結果が報告されている。しかし、本研究における最大印加圧力は  $2$  GPa 程度であるため、本研究で観測している EPR 測定結果は、すべて  $\text{Fe}^{3+}$  由来の信号に起因するものと考えられる。そのため、 $\text{Fe}^{3+}$  のスピン状態を仮定して解析することは十分妥当であると考え、以下の解析を実施した。

### 5-3.1. 常圧下における強磁場・テラヘルツ EPR 測定の結果

まず、常圧での結果を議論するため、図 5-2(a)に常圧下における測定結果を示す。低周波数領域から高周波数領域へ行くにつれて、観測されるスペクトルがどのように変化したかに注目する。第四章でも示したように  $80$ - $160$  GHz の周波数では、X-band EPR 測定で観測可能なパウダーパターンに対応するスペクトルが観測された[4.19]。最も強い吸収は、 $g \sim 6$  付近 (今後  $g_{\text{perp}}$  と書く) に観測された。一方、 $g \sim 2$  付近には多数のピーク構造が観測された。これはヘミンからの信号に加え、ジルコニアベースのセラミックスパーツに含まれる不純物由来の信号に起因していると考えられる。セラミックスパーツには機械的特性を改良するために Ni イオンや Mn イオンなど不純物が添加されていることが分かっているが、その組成や割合などは不明であるため、それぞれのピークがどの磁性種由来かを同定することは出来ていない。これら多数のピーク構造が観測されたために、ヘミンクロライドの  $g \sim 2$  信号 (今後  $g_{\text{para}}$  と書く) は明瞭には

観測されなかった。しかし、 $g_{\text{perp}}$  の吸収の谷から  $g \sim 2$  付近に向かって、信号が緩やかに小さくなっていく様子が確認出来たことから、得られた信号はヘミンクロライドのパウダーパターンのスペクトルを反映していることが分かった。

また予想した通り、これらの吸収の共鳴磁場は周波数を上げるにつれて高磁場側へシフトしていった。 $g_{\text{perp}}$  吸収は 515 GHz までの全観測周波数で観測することが出来た。また、 $g_{\text{para}}$  吸収は 293 GHz を超える周波数では掃引可能な最大磁場 10 T よりも高磁場側に現れるため、観測することは出来なかった。

また本研究においては、第四章で見られた  $g_{\text{perp}}$  吸収の谷のスプリットは観測されなかった。これは、圧力媒体が低温で凍結することにより圧力の不均一性を生じ、スペクトルがブロードニングしてしまったためと考えられる。

293 GHz 以上の周波数領域では、 $g_{\text{perp}}$  吸収の低磁場側に二種類の EPR モード（以下、 $\alpha$ モードと $\beta$ モードと表記）が観測された。 $\alpha$ モードは測定周波数を上げるにつれて低磁場側にシフトし、最終的にゼロ磁場に近づいた。一方、およそ 400 GHz 以上の周波数で観測された $\beta$ モードは、測定周波数を上げるにつれて高磁場側へシフトした。この結果から、400 GHz 付近のある周波数では、ゼロ磁場で  $\alpha$  と  $\beta$  両モードが同時に観測されると考えられる（ゼーマン分裂がないためその区別はつかない）。この周波数は、第四章で示したヘミンクロライドの基底状態における Kramers 二重項間 ( $S_z = \pm 1/2$  と  $S_z = \pm 3/2$ ) のゼロ磁場分裂に対応している。

図 5-3 に、常圧下において得られたすべての EPR 吸収の谷について共鳴磁場と周波数の関係を示す。実線や点線で示す曲線は、1-7 式を解いて得られた図 5-4(a)、5-4(b)のエネルギーダイアグラムを用いて作成した。実線と点線は、それぞれ印加磁場方向が  $B \parallel x, y$  ( $\theta = 90^\circ$ ) と  $B \parallel z$  ( $\theta = 0^\circ$ ) の場合に対応している。これらの図を作成するために必要なスピンハミルトニアンパラメータを決めるにあたっては、図 5-3 で測定結果とシミュレーション曲線が良く一致するようにパラメータを変えて決めた。結果として、スピンハミルトニアンパラメータは  $g_x = g_y = 1.93$ 、 $g_z = 2.05$ 、および  $D = 6.90 \text{ cm}^{-1}$  と見積もられた。 $E$  値については、圧力媒体の凍結によるスペクトルのブロードニングにより見積もることは出来なかったため、図 5-3、5-4(a)、5-4(b)では  $E = 0$  として計算した。この結果は、第四章の結果を良く再現している。



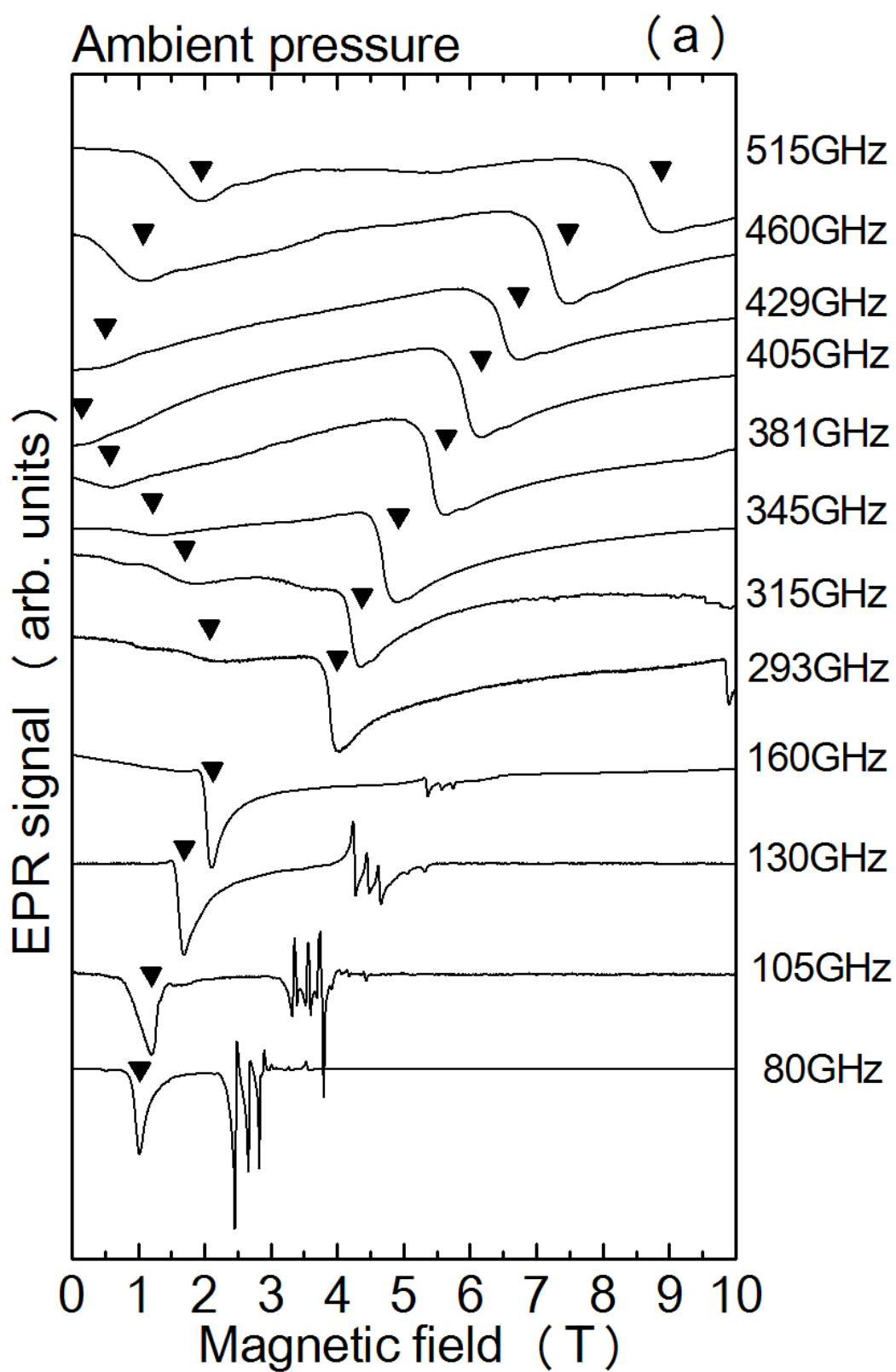


図 5-2(a) 常圧下におけるヘミンクロライドの EPR 測定結果。

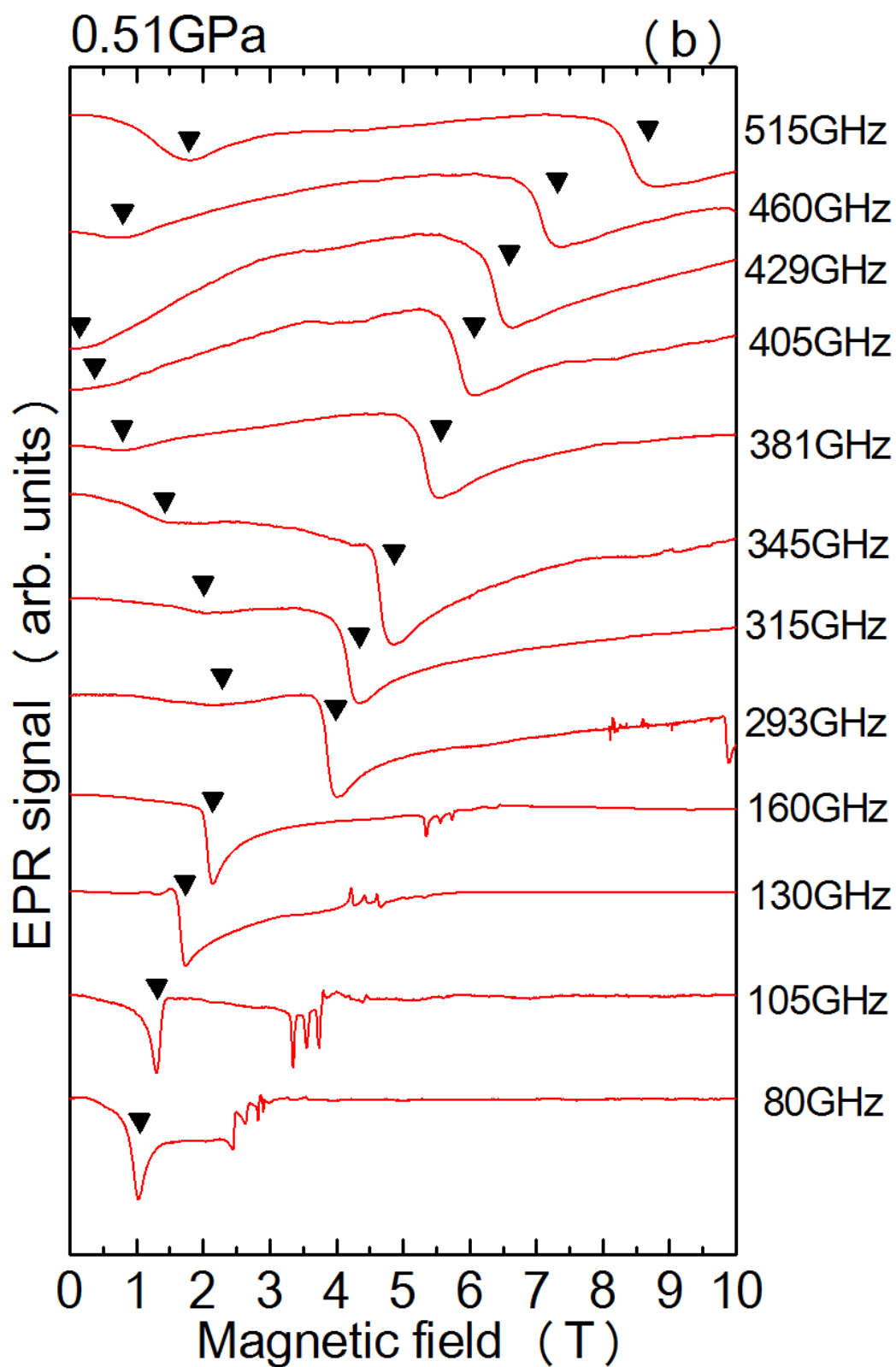


図 5-2(b) 印加圧力 0.51 GPa におけるヘミンクロライドの EPR 測定結果。

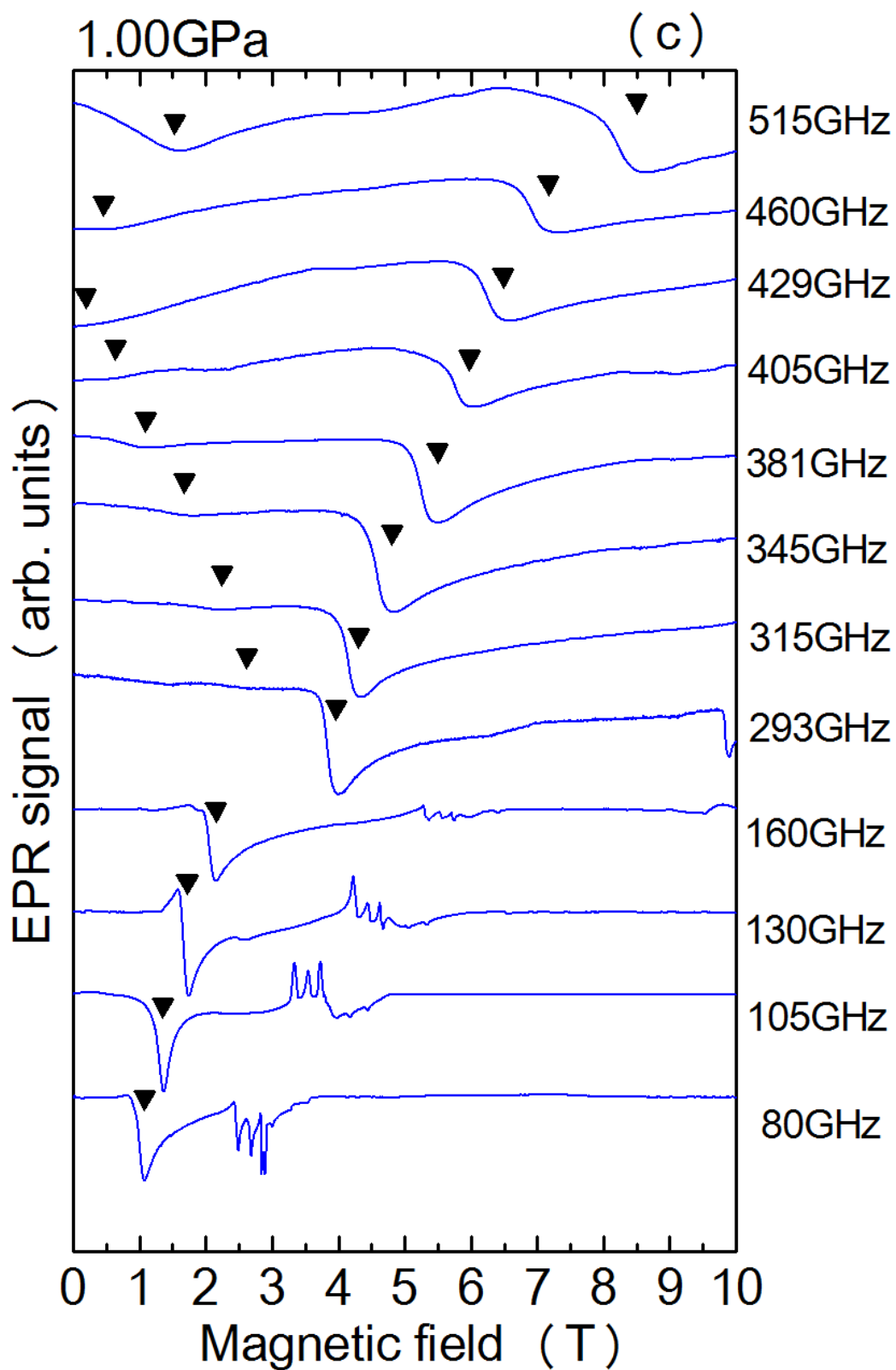


図 5-2(c) 印加圧力 1.00 GPa におけるヘミンクロライドの EPR 測定結果。

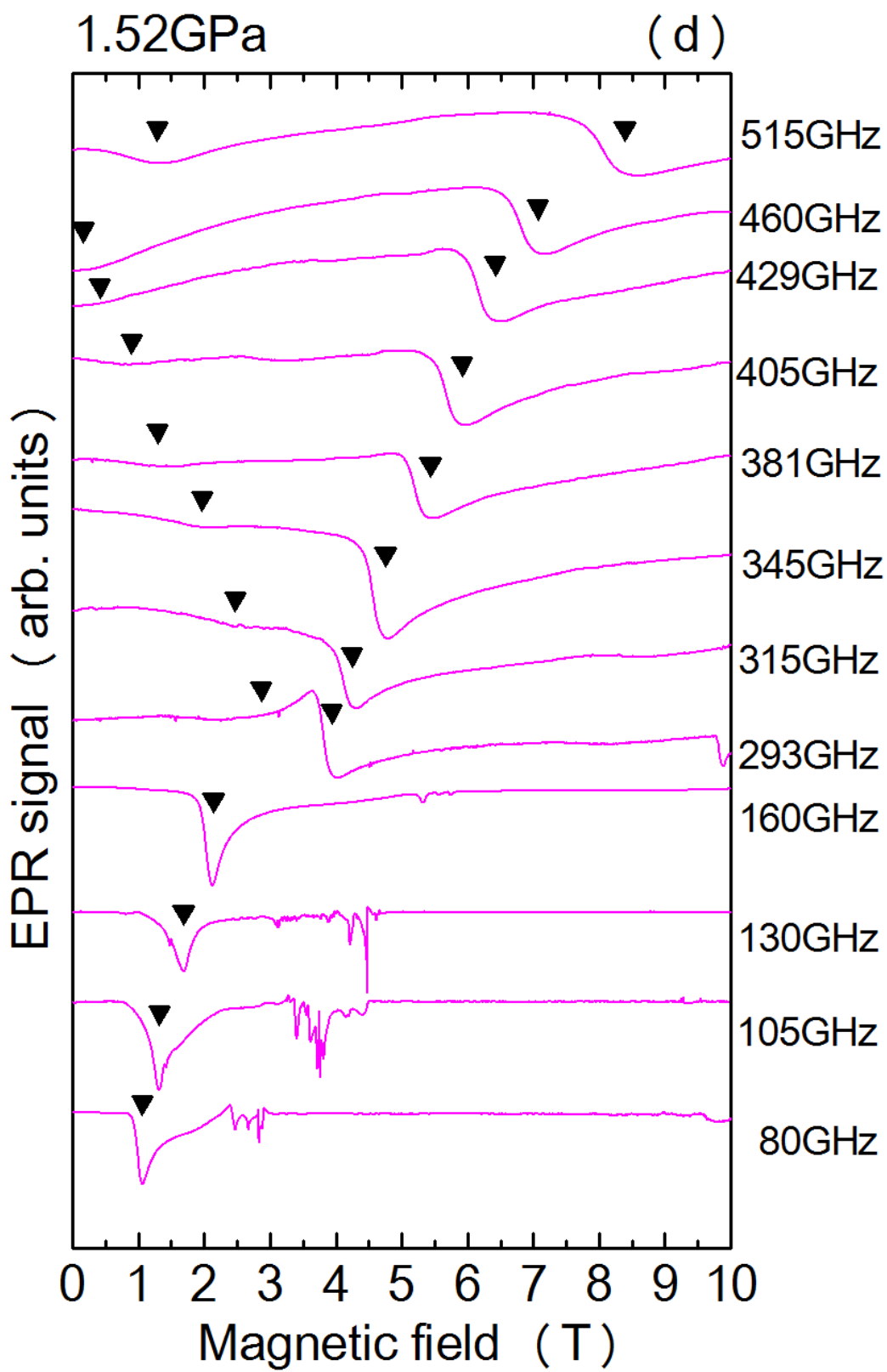


図 5-2(d) 印加圧力 1.52 GPa におけるヘミンクロライドの EPR 測定結果。

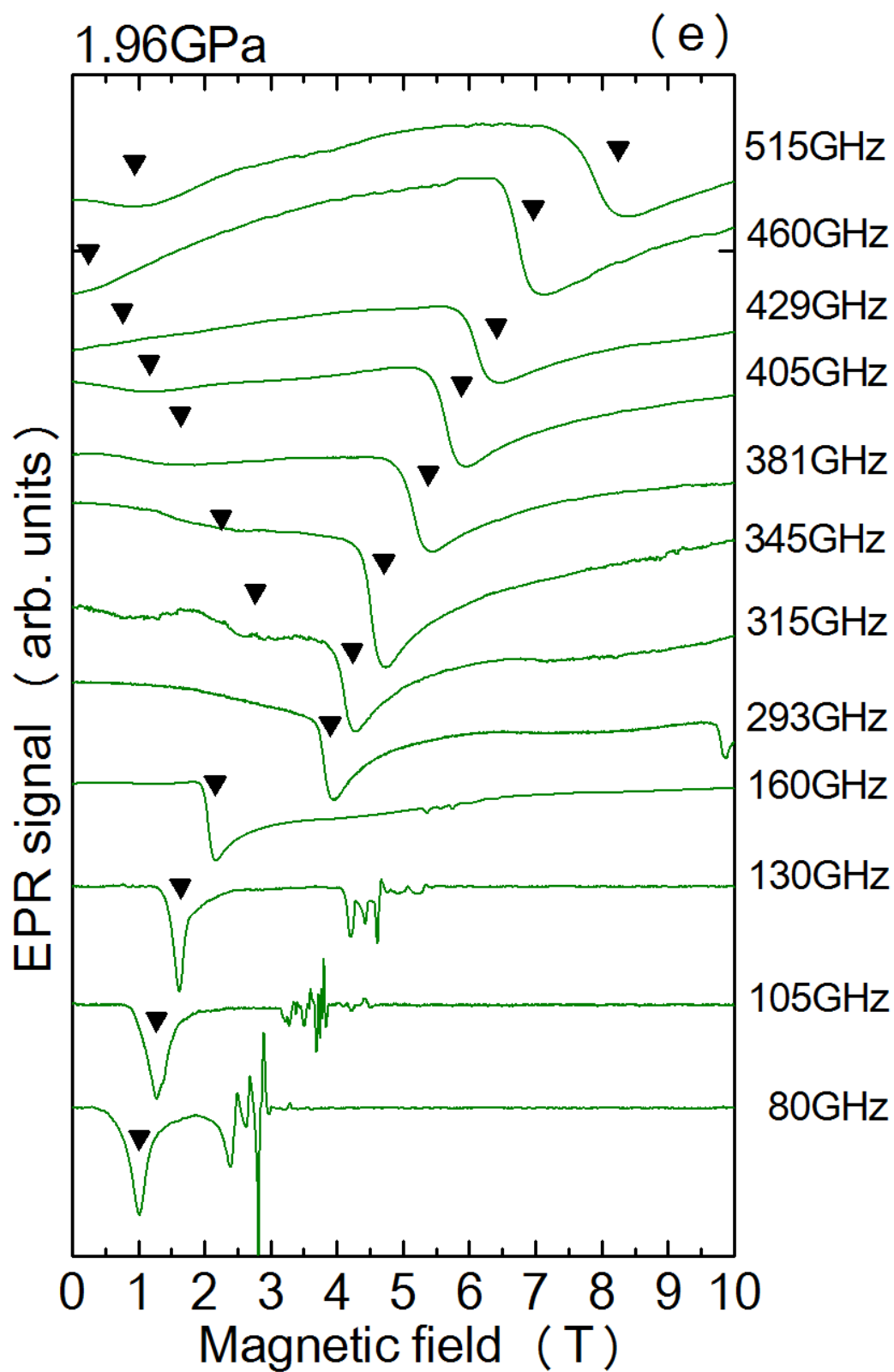


図 5-2(e) 印加圧力 1.96 GPa におけるヘミンクロライドの EPR 測定結果。

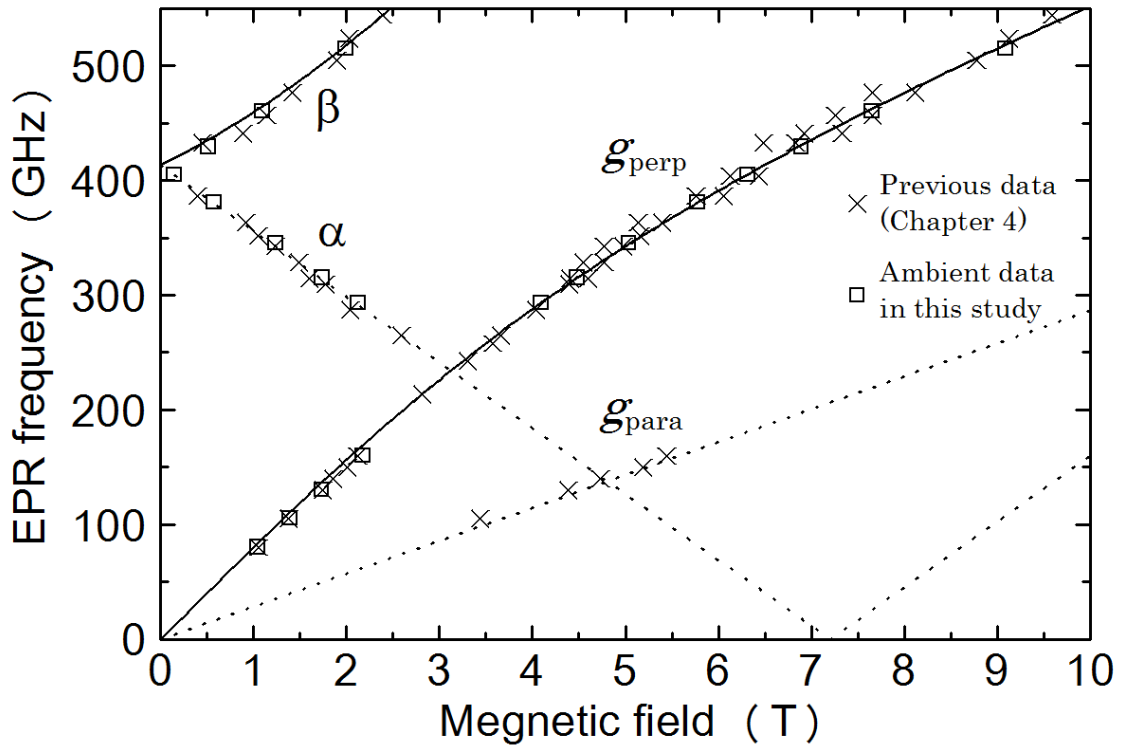


図 5-3 常圧下において得られた EPR 吸収の共鳴磁場と周波数の関係をプロットしたもの。□は本研究で得られた結果、×は第四章で得られた結果である。

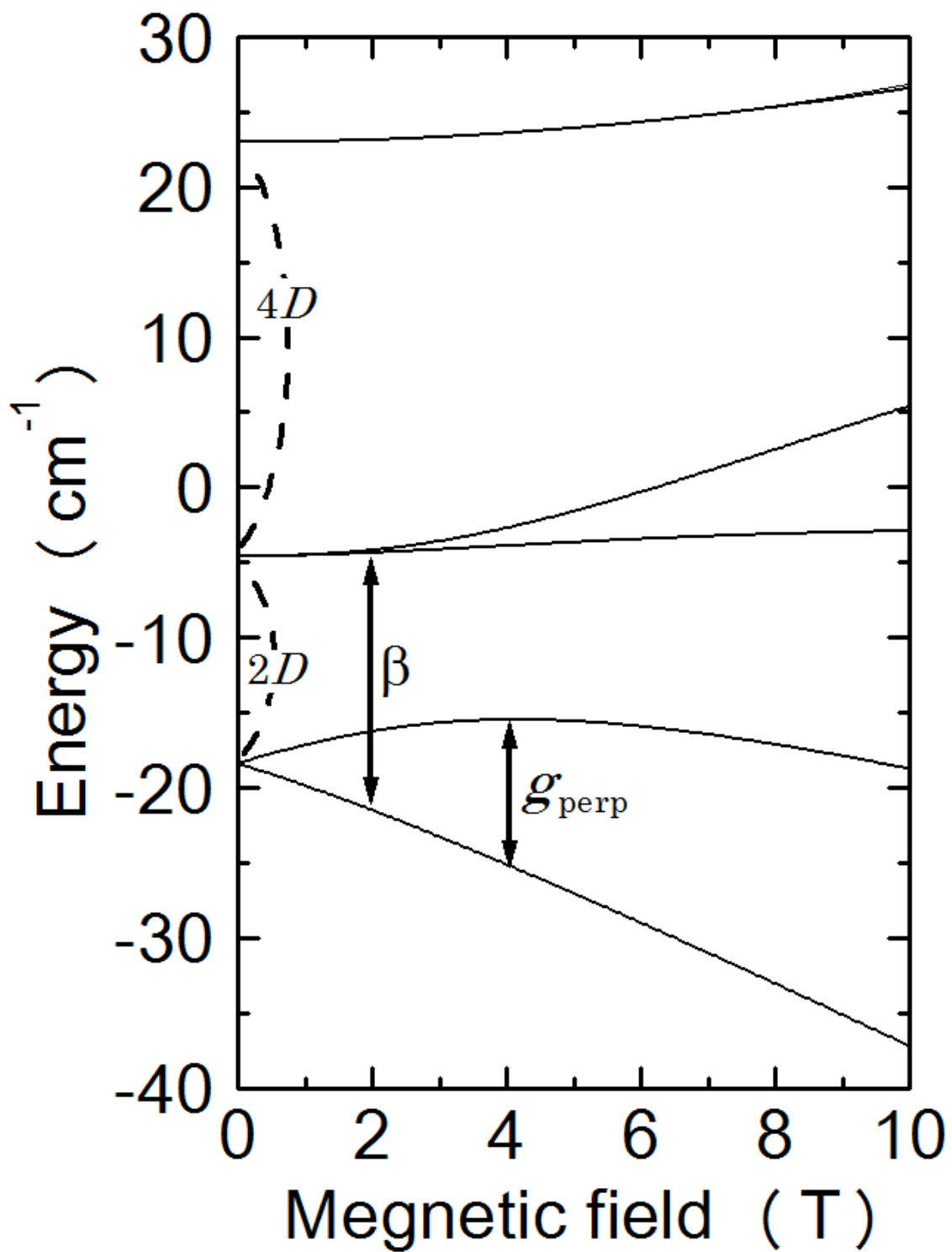


図 5-4(a) ポルフィリン面内方向 ( $B // x, y$ ) に磁場を印加した際のヘミンクロライドのエネルギーダイアグラム。

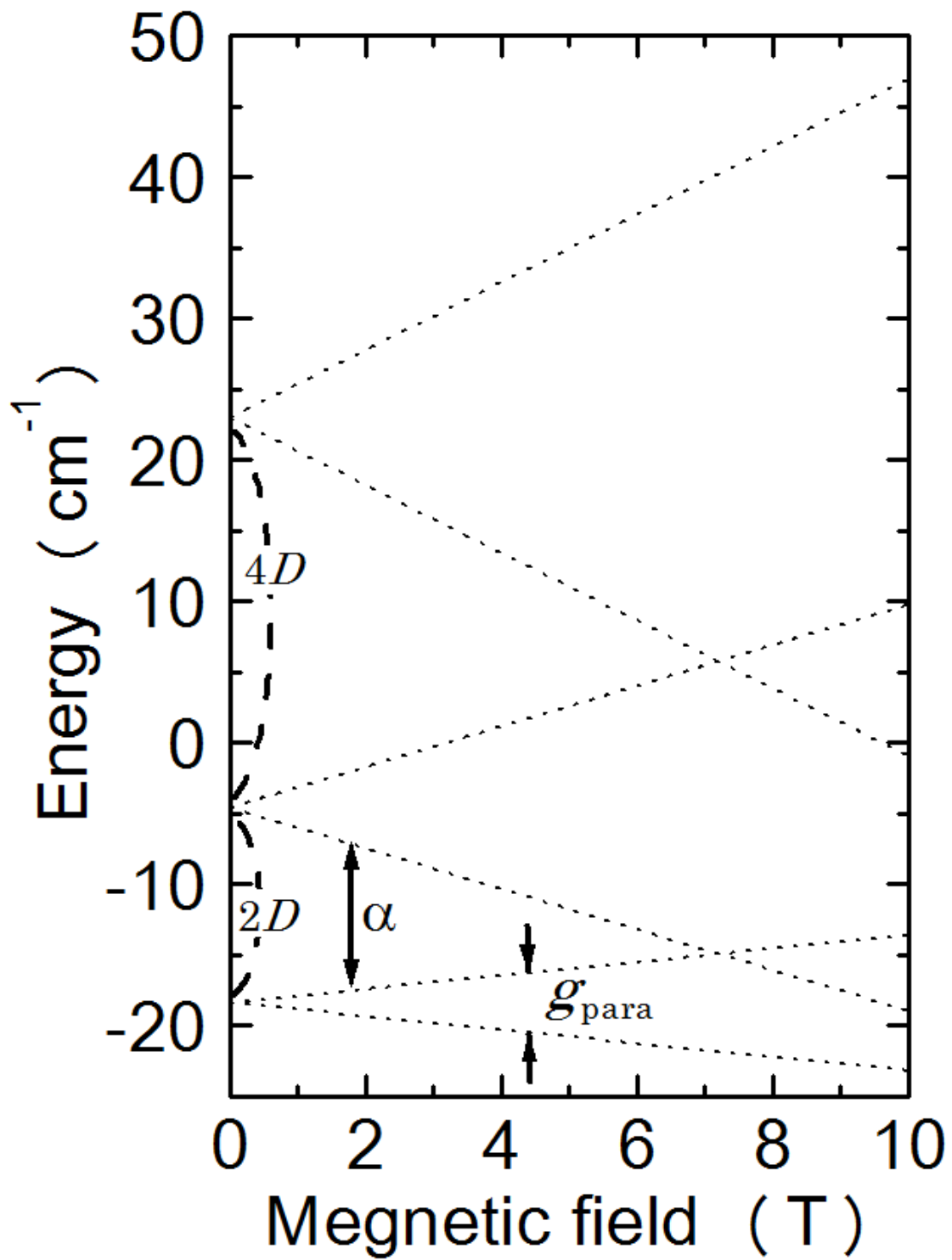


図 5-4(b) 軸配位子方向 ( $B \parallel z$ ) に磁場を印加した際のヘミンクロライドのエネルギーダイアグラム。



### 5-3.2. 圧力下における強磁場・テラヘルツ EPR 測定の結果

次に、圧力下におけるヘミンクロライドの EPR スペクトルについて議論する。図 5-2(b)-(e)に示すように各圧力において最大磁場 10 T、最高周波数 515 GHz の範囲で  $g_{\text{perp}}$  吸収、 $\alpha$  モード、 $\beta$  モードを観測した。図 5-5(a)-(c)に、160 GHz、381 GHz、515 GHz それぞれにおける EPR スペクトルの圧力依存性を示す。これらの周波数以外の圧力依存性を比較する図については Appendix-4 に示した。図 5-6 には、すべての圧力下において得られた EPR スペクトルの吸収の谷について、共鳴磁場と周波数の関係でまとめたものを示す。これらの図を用いて、 $g_{\text{perp}}$  吸収、 $\alpha$  モード、 $\beta$  モードそれぞれについて議論していく。

まず  $g_{\text{perp}}$  吸収の谷の磁場位置に着目すると、350 GHz 以下の周波数ではほとんど共鳴磁場のシフトは見られなかった。しかし、350 GHz を超えると、印加圧力を高くするにつれて共鳴磁場が徐々に低磁場側にシフトしていくことが分かる。350 GHz 以下においては、シフト量が小さく、かつ圧力媒体の固化によるスペクトルのブロードニングが影響して吸収の谷のシフトが明瞭に確認出来なかったと考えられる。この結果は X-band や W-band 帯のような 100 GHz 未満の低周波数での EPR 測定装置を用いて、ヘミンクロライドの  $g_{\text{perp}}$  吸収の圧力依存性を観測することは困難であることを意味している。従って、本研究のように強磁場・テラヘルツ領域における EPR 測定を行うことは圧力効果を調べる上で非常に有用であると言える。

次に  $\alpha$  モードと  $\beta$  モードについて着目する。まず  $\alpha$  モードは印加圧力を高くするにつれて共鳴磁場が高磁場側にシフトした。一方、 $\beta$  モードは印加圧力を高くするにつれて共鳴磁場が低磁場側にシフトした。したがって、図 5-6 からゼロ磁場分裂に対応する 0 T での  $\alpha$  モードと  $\beta$  モードの交点が、高周波数側へシフトしていることが明らかとなった。

$\beta$  モードについては、ゼロ磁場付近において共鳴磁場の大きな圧力依存性が見られる。すなわち、低磁場であるほど、圧力による共鳴磁場のシフトが大きいと言える。一方で、高磁場になるほど、圧力による共鳴磁場の変化は小さく

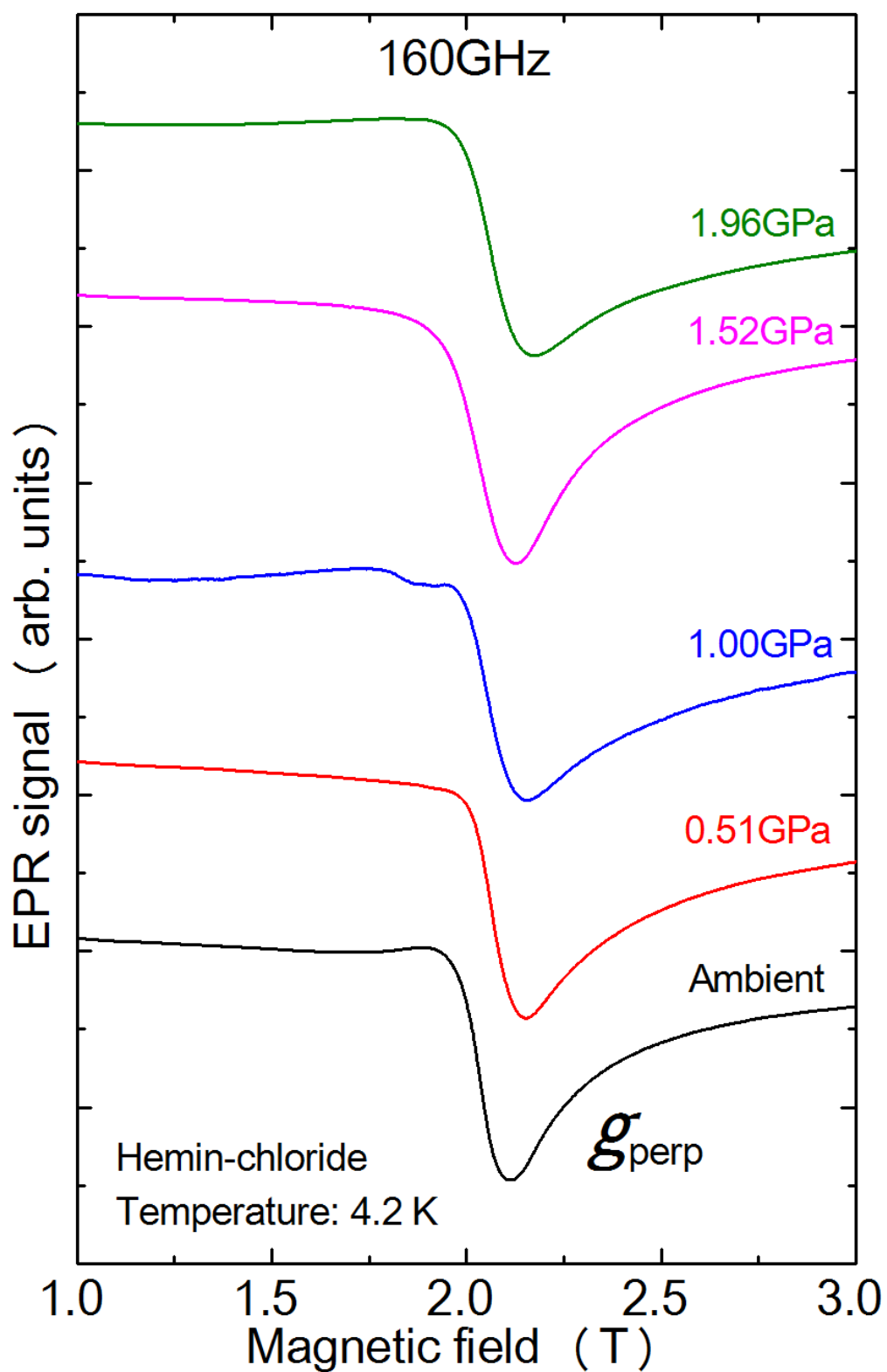


図 5-5(a) 160 GHz において得られたヘミンクロライドの EPR スペクトルの圧力依存性。

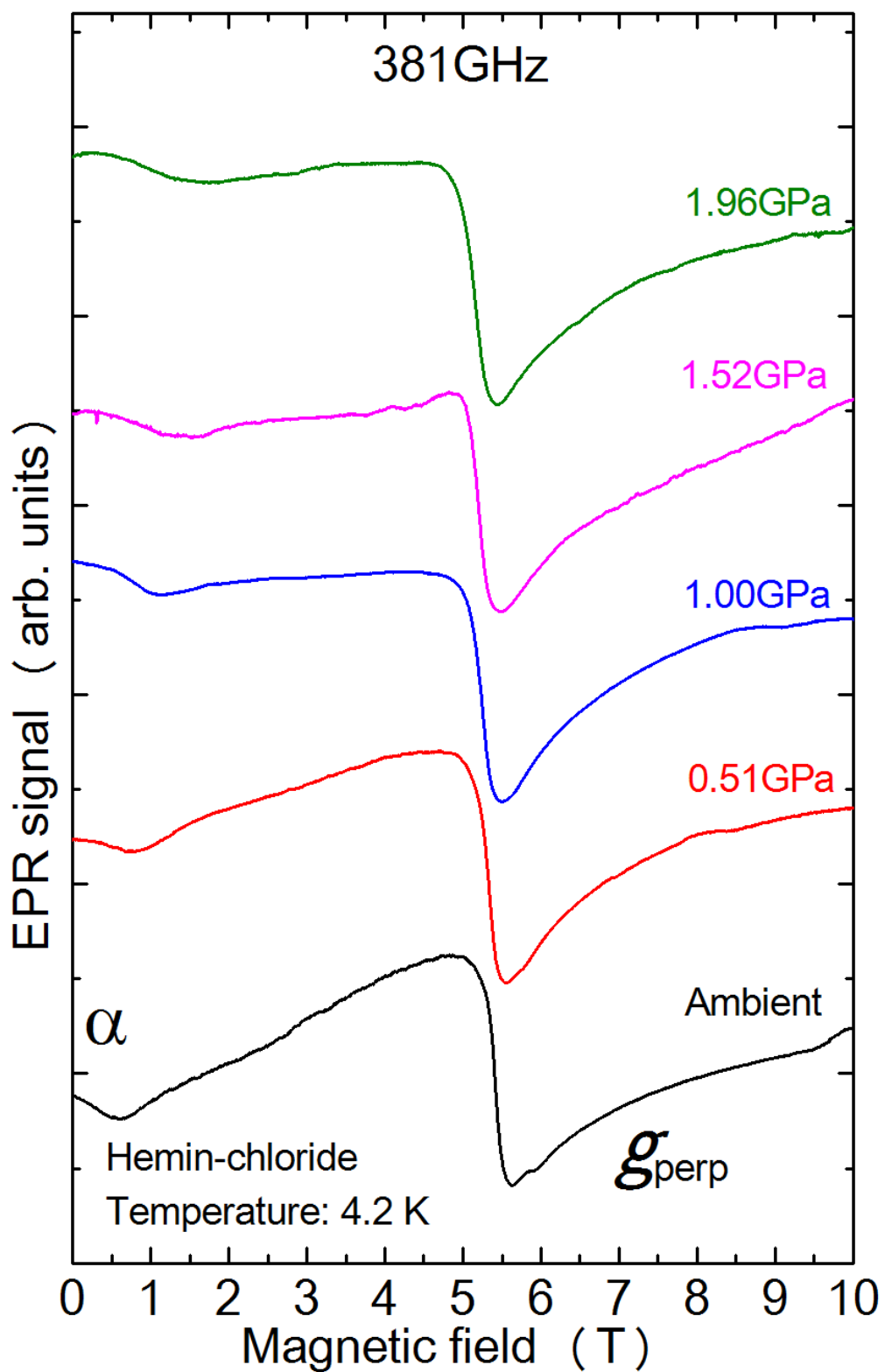


図 5-5(b) 381 GHz において得られたヘミンクロライドの EPR スペクトルの圧力依存性。

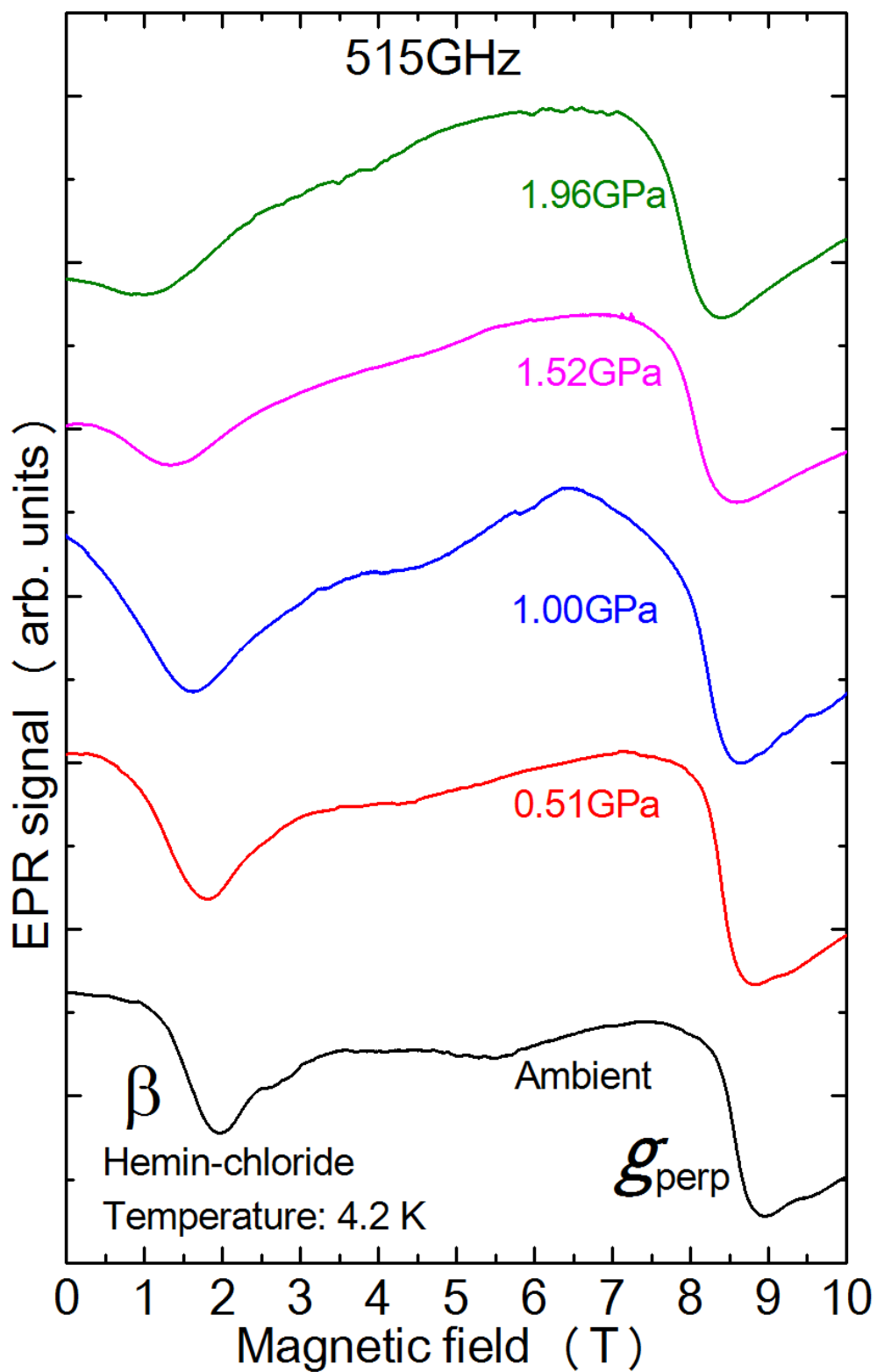


図 5-5(c) 515 GHz において得られたヘミンクロライドの EPR スペクトルの圧力依存性。

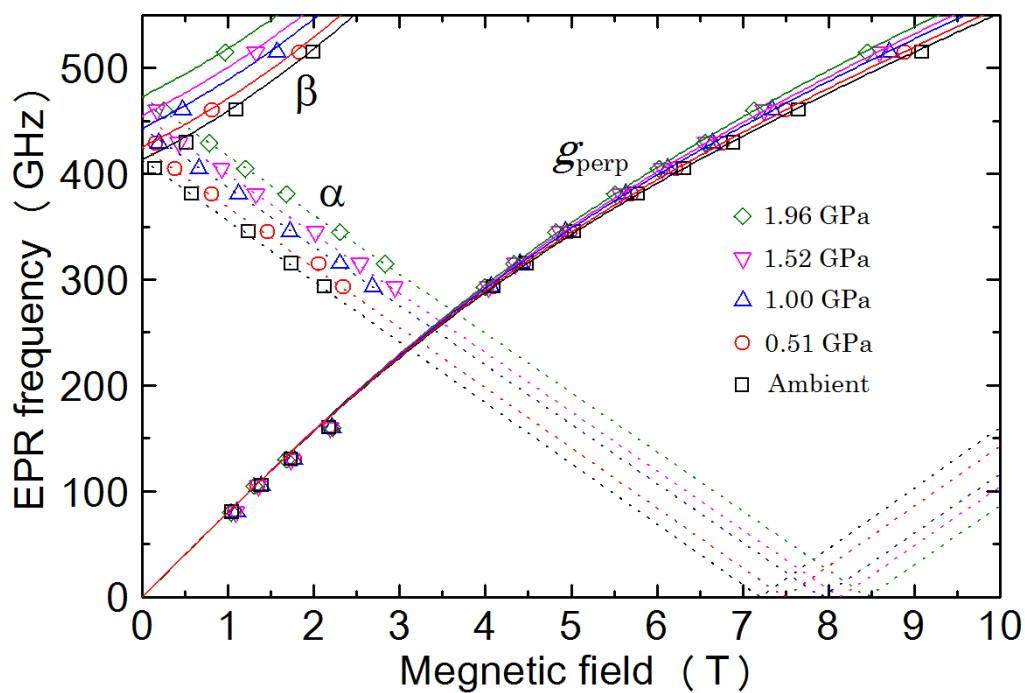


図 5-6 全ての圧力下における共鳴磁場と周波数の関係。

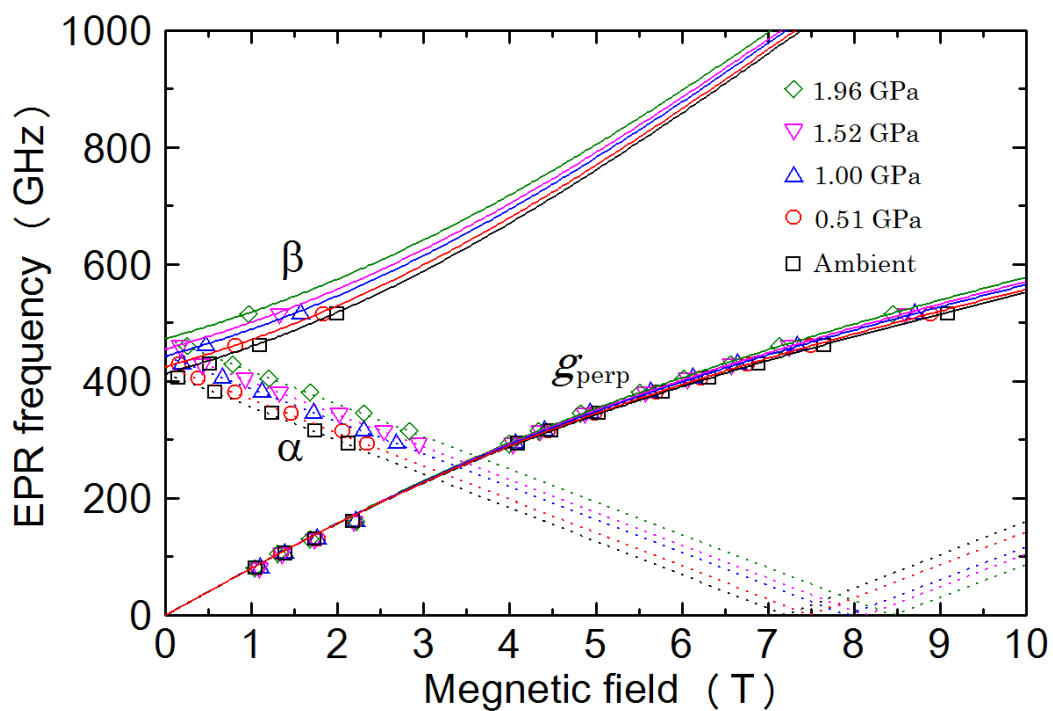


図 5-7 図 5-6 の周波数範囲を 1,000 GHz まで拡張したもの。βモードの収束していく様子が分かる。

なっているように見える。このような観測結果が得られた理由についてはスピンハミルトニアン<sup>1</sup>のゼロ磁場分裂項とゼーマン項の効果を比較することで理解出来る。すなわち低磁場極限 ( $D \gg g\mu_B B$ ) では、ゼーマン項の影響が小さくゼロ磁場分裂項の変化がより直接的に共鳴磁場に反映される。一方、高磁場極限 ( $D \ll g\mu_B B$ ) においてはゼロ磁場分裂定数  $D$  の影響が十分小さくなり、実質的にゼーマン相互作用の効果のみで共鳴磁場が決まる。こうした特徴は、図 5-6 中の  $\beta$  モードのシミュレーション曲線からも確認出来る。参考のため、図 5-6 の周波数範囲を 1,000 GHz まで拡張したものを図 5-7 に示した。高周波・高磁場領域に行くほど各圧力におけるシミュレーション曲線は収束していく振る舞いがみられる。これは圧力変化による影響が高磁場極限では小さくなっていることを意味している。

ここで、スピンハミルトニアンパラメータの決め方について説明しておく。まず、図 5-6 においてゼロ磁場における  $\alpha$  モードおよび  $\beta$  モードの交点から  $D$  値を決定することが出来る。次に観測された  $g_{\text{perp}}$  吸収を再現出来るよう  $g_x$  および  $g_y$  を決定する。そして、 $\alpha$  モードに対応するシミュレーションの直線の傾きから  $g_z$  値を決定する。 $E$  値の寄与は  $D$  値に比べて小さいため ( $|E/D| < 0.01$ )、本研究における解析では常圧時と同様に  $E = 0$  として無視した。図 5-8 に、 $D$  値と  $g_z$  値の圧力依存性を示す。これらの解析の結果、2 GPa までの加圧を行うと、ヘミクロライドの  $D$  値は  $6.90 \text{ cm}^{-1}$  から  $7.90 \text{ cm}^{-1}$  へ増加することが明らかとなった。ヘム鉄における  $D$  値の圧力依存性を精密に測定した過去の報告例はなく、本研究により初めて成功した。

また  $g_z$  値は、印加圧力を高くするにつれて 2.05 から 2.00 へと減少する結果が得られた。一方、 $g_x$  および  $g_y$  値も変化している可能性があるが、正確に見積もることは困難であった。したがって、図 5-6 のすべての圧力下におけるシミュレーションにおいては、5-3.1 節で述べた常圧下の EPR 測定で見積もられた値 ( $g_x = g_y = 1.93$ ) を使用した。

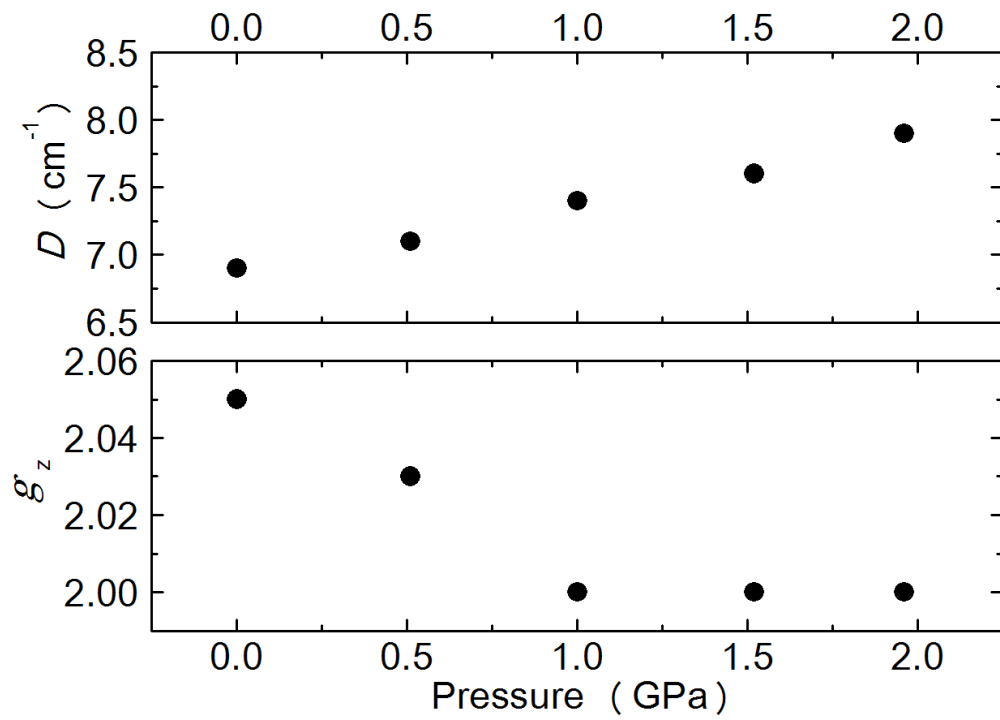


図 5-8 本研究で得られたゼロ磁場分裂定数  $D$  と  $g$  テンソルの主値  $g_z$  の圧力依存性。

## 5-4 考察

### 5-4.1. 圧力効果によるヘム鉄周囲の電子構造の変化と ゼロ磁場分裂定数 $D$ の関係

ヘミンクロライドの軸配位子方向のゼロ磁場分裂定数  $D$  については常圧下において数多くの報告がある[4.7, 4.8, 4.13-4.16, 5.39]。ここでまず、 $D$  値の圧力に対する依存性について議論する。前述のように、EPR スペクトルが圧力の不均一性のために広がっており、本研究では  $E$  値を実験的に導くことは出来なかった。そこで以下の議論では  $E$  値をゼロとして進め、正方対称な配位子場を考える。

第四章で議論したように、正方対称な配位子場中における  $\text{Fe}^{3+}$  イオンの基底状態は  ${}^6A_1$  状態であり、また、 ${}^6A_1$  状態とスピン-軌道相互作用で結合可能な励起状態の中で最も低い状態は  ${}^4E$  状態と  ${}^4A_2$  状態である。 ${}^6A_1$  状態と  ${}^4A_2$ 、 ${}^4E$  状態それぞれとのエネルギー差を  $\Delta({}^4A_2)$ 、 $\Delta({}^4E)$  と定義すると、ゼロ磁場分裂定数  $D$  は、

$$D = \frac{\zeta^2}{5} \left[ \frac{1}{\Delta({}^4A_2)} - \frac{1}{\Delta({}^4E)} \right] \quad (5-1)$$

と書ける。今回の実験結果では圧力をかけるにつれてゼロ磁場分裂項が増大したことから、その理由を  $\Delta({}^4A_2)$ 、 $\Delta({}^4E)$  の圧力変化という観点から考察する。

圧力を加えることにより分子は圧縮されるが、一般に分子構造の異方性がある場合、圧縮率は一様ではない。ヘミンクロライドにおいては、ポルフィリン環が炭素原子の共有結合で構成されており、ポルフィリン面内はかなりリジッドな構造であると考えられる。そのため、ポルフィリン面に対して垂直な方向に分子構造を圧縮する方が容易であると考えられる。したがって、圧力を印加した場合、 $\text{Fe}^{3+}$  イオンと軸配位子である Cl 原子との間の結合長は  $\text{Fe}^{3+}$  イオンと四つの N 原子との間の結合長の変化と比べて変化しやすいことが推測される。このように平面的な分子構造に起源をもつ異方的な圧力効果は他の類似錯体でも確認されている。例えば、ヘムタンパク質の高圧下における振動分光研究に



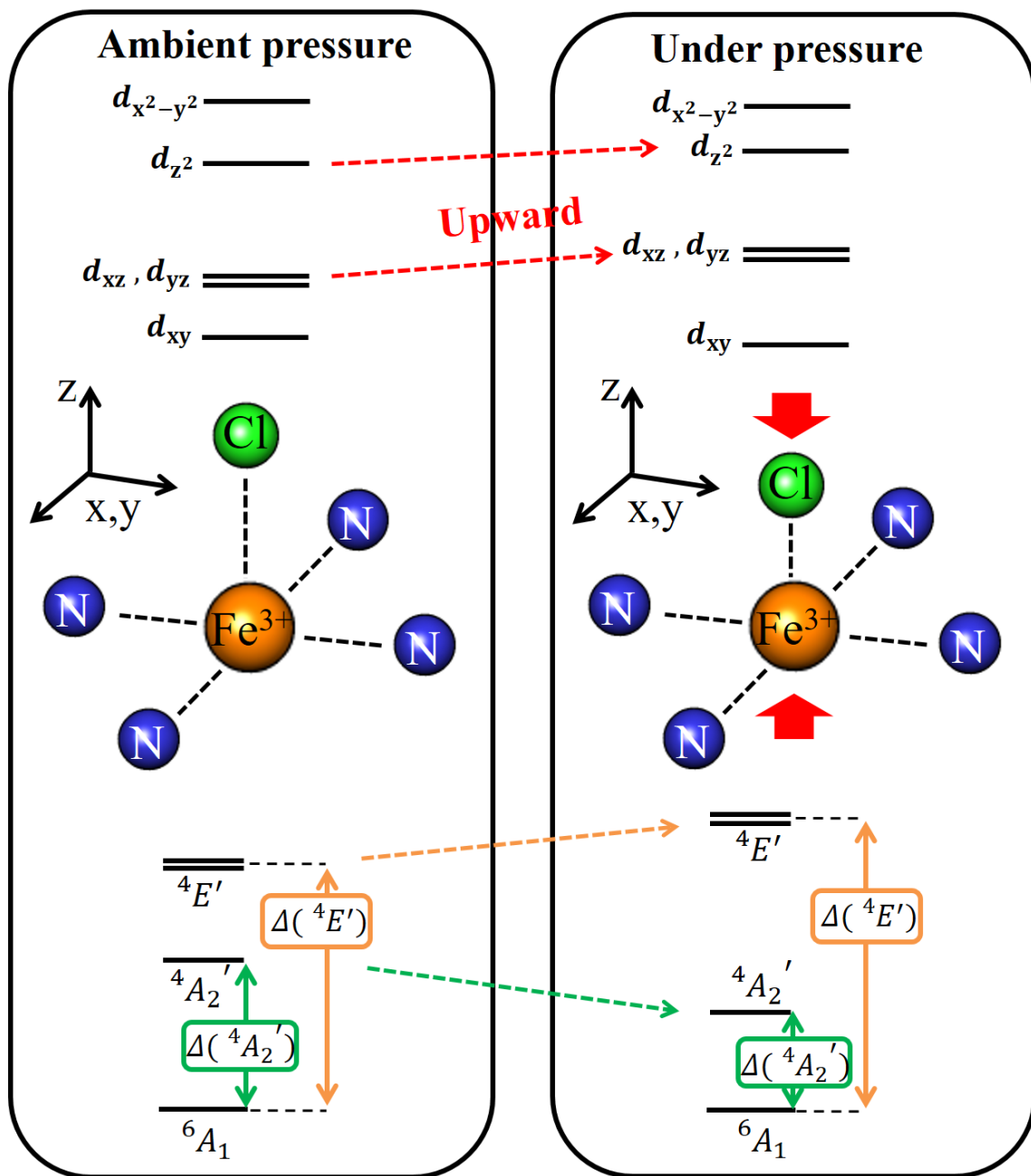


図 5-9 ヘミンクロライドの  $\text{Fe}^{3+}$  イオン周囲の配位子場に対する圧力効果。左は常圧下、右は高圧下を示している。

においては、へムの骨格構造はわずかしか変化しなかった一方で、軸配位子方向は圧力の影響を大きく受けたという報告がなされている[5.17, 5.40, 5.41]。

このような構造変化を仮定すると、五つの  $3d$  軌道のエネルギー準位の相対的な関係の変化および  $\Delta(^4A_2)$  と  $\Delta(^4E)$  の変化について推測出来る。図 5-9 に、本研究の結果から推測される圧力印加に伴う  $D$  値増大のメカニズムを示した。ポルフィリン面内は圧力の影響を受けにくいことから、 $d_{xy}$  軌道のエネルギー準位のレベルはほとんど変化しないと考えられる。一方、軸配位子方向は圧力の影響を大きく受け、鉄イオンと軸配位子の結合長が小さくなっていると考えられる。したがって、 $z$  軸方向（軸配位子方向）の距離が縮まり、クーロン反発の効果が大きくなる。その結果、 $z$  軸方向に電子分布を持つような  $d_{xz}$  および  $d_{yz}$  軌道のエネルギーレベルは高くなる。よって、 $d_{xy}$  軌道に二つ目の電子を配置した電子状態に比べ、 $d_{xz}$  および  $d_{yz}$  軌道に二つ目の電子を配置した電子状態の方がより大きな系のエネルギー上昇をもたらす。 $t_{2g}$  軌道全体としてのエネルギーの平均値は変わらないので、 $d_{xz}$  および  $d_{yz}$  軌道のエネルギーレベルが上昇すれば、必然的に  $d_{xy}$  軌道がより安定となり、 $d_{xy}$  軌道のエネルギーレベルは下降する。その結果、エネルギー差  $\Delta(^4E)$  は増加し、逆に  $\Delta(^4A_2)$  は減少する。5-1 式を見ると、第一項は大きくなり、第二項は小さくなるはずである。本研究で観測された圧力印加に伴うゼロ磁場分裂項の増大はこのようなメカニズムにより説明出来ると考えている。過去に報告されているメスバウアー分光の結果からも同様の  $3d$  軌道のエネルギー準位の変化が示唆されており、上述の議論を支持する結果が得られている[5.23]。

ここまでの議論はあくまでも定性的な説明であるが、おおむね実験結果をうまく説明することが出来ている。より定量的な説明を行うためには、他の分光学的手法によるデータの積み重ねや、理論計算手法の発展を待つ必要がある。そのためには高圧下におけるヘミンクロライドの分子構造のデータが必要不可欠であり、今後は圧力下 X 線構造解析の実験が強く望まれる。

現時点で、へם鉄錯体およびその誘導体のもつ大きなゼロ磁場分裂の起源を理論計算により定量的に説明した報告例はない。2015 年に行われた  $[\text{Fe}(\text{TPP})]\text{X}$  ( $\text{X} = \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$ ) の非弾性中性子散乱実験によれば[4.14]、量子化学計算と実験で得られたゼロ磁場分裂定数の絶対値を一致させるためには多くのパラメ

ータを考慮する必要性が指摘されている。例えば共有結合性やスピン-軌道相互作用定数、および相対論的効果など、配位子場だけでなく多数の化学的相互作用のパラメータを考慮し、取り込み方を工夫する必要があると言及している。彼らは、軸配位子のハロゲン元素を変えていく「化学修飾」により分子全体としての電子状態を変えることで、 $D$  値の変化が起こることを実験的に示した。しかし、軸配位子として配位する原子の種類が変われば上述のような化学的相互作用の強さがすべて異なるため、それぞれの試料に対する結果を比較し議論することは非常に複雑で、どの化学的相互作用が効いているか見当をつけるのは困難である。

一方、本研究の結果から、圧力という物理的パラメータが化学修飾とは異なる  $D$  値の制御方法であると分かった。その利点として、圧力を制御パラメータに用いる場合、当然ながら軸配位子の種類を変える必要はない点が挙げられる。そのため、同じ化学結合条件を維持しながら可逆的かつ連続的に構造変化させることが可能である。したがって、強磁場・テラヘルツ EPR 測定法により圧力効果を調べる本研究の手法は、金属タンパク質および金属酵素を含め、様々な遷移金属錯体におけるゼロ磁場分裂の起源および性質を調べるための独特かつ有用な方法であると考えている。

#### 5-4.2 ヘムタンパク質や他の金属タンパク質・酵素への応用

これまで報告されているタンパク質に対する圧力効果の研究は、主にタンパク質の活性と密接な関係があるとされる分子構造の変化に焦点を当てたものがほとんどである、例えば、これらに該当する実験的研究としては NMR[5.1, 5.13-5.15]、X 線回折[5.16]、赤外分光、ラマン分光等[5.17, 5.18]が報告されている。一方、金属タンパク質の場合、機能活性部位に存在する金属イオンの電子構造がタンパク質活性において重要な役割を果たすにもかかわらず、その金属イオン周囲への圧力効果に関する研究は限られている[5.23-5.25]。

本研究で用いた圧力下における強磁場・テラヘルツ EPR 測定法は、原理的にはあらゆる EPR 活性を持つスピン種を検出することが可能であり、ヘム鉄以外の異なる金属イオンを含むタンパク質にも応用することが可能である。強磁

場・テラヘルツ EPR 測定法は、分子構造、価数など局所環境の微細な変化に対して非常に敏感であり、高いスペクトル分解能で金属タンパク質および金属酵素の活性部位を調べるために使用することが出来る[1.29, 4.7, 4.9]。過去には、ダイヤモンドアンビルセルを使用した圧力下における強磁場・テラヘルツ EPR 測定例が報告されている[5.33, 5.34]。ダイヤモンドアンビルセルを用いる場合は 10 GPa 以上の圧力を印加出来るという利点があるが、試料空間が非常に狭いため低濃度試料に対しては不適であり、十分な感度を得ることは容易ではない。そのため本研究で採用したハイブリッド型圧力セルを用いた測定手法の方が、試料量を稼ぐことが出来、感度面での優位性がある。したがって、ハイブリッド型圧力セルはタンパク質活性部位への圧力効果を研究する上でより実用的な手法としてみなすことが出来る。

現在の感度では、1 mT の EPR 線幅の試料を測定したい場合、 $1.6 \times 10^{-10}$  mol の試料を用意すれば信号検出が可能である。この感度は、分子量が 60,000 g/mol の物質であれば 10  $\mu$ g の試料質量を用意することに対応しており、試料準備の点からは現実的な試料量である。しかし金属タンパク質の EPR 信号では 10 mT から 1 T 近い線幅を持つ例も報告されている。そのため、あらゆる金属タンパク質やそのモデル物質に対しても本実験手法を適用可能とするには、さらなる感度向上も必要になると予想される。さらに測定感度を上げるためには、コルゲート導波管を組み合わせ、電磁波伝達経路の最適化を行うことなどが有用ではないかと考えている[5.42]。またジャイロトロンなどの高出力電磁波光源との組み合わせも有効な改良策として考えられる。

金属タンパク質中の金属イオンの多くは、タンパク質構造の一部を担うアミノ酸残基によって配位結合されている。外部から圧力を加えると、タンパク質全体の構造変化が誘発され、さらにそれを受けてアミノ酸残基の配位状態も影響を受ける。このような理由から、金属タンパク質・金属酵素中の軸配位子の方が、本研究で使用したヘミンクロライドの軸配位子である Cl 原子よりも圧力による効果を敏感に受けるはずである。その結果、配位子場全体への圧力の効果も金属タンパク質や金属酵素の方がモデル物質よりも大きく現れると考えられる。本研究では酸化型  $\text{Fe}^{3+}$  のヘミンクロライドの電子状態を EPR により調べたが、大部分のヘムタンパク質が還元型  $\text{Fe}^{2+}$  の状態で生理的機能活性を持つ。

したがって、将来的には還元型  $\text{Fe}^{2+}$  のヘムタンパク質およびヘミンを含めたヘム鉄錯体の圧力効果を研究する必要がある[1.43, 5.43]。

## 5-5 まとめ

本研究では、ヘムタンパク質モデル錯体であるヘミンクロライドのゼロ磁場分裂定数  $D$  の圧力依存性を調べるために、最大磁場 10 T、最高周波数 515 GHz までの範囲において、常圧、0.51 GPa、1.00 GPa、1.52 GPa、1.96 GPa までの各圧力下で強磁場・テラヘルツ EPR 測定を行った。ヘミンクロライド分子の構造に由来する圧縮率の異方性に対応して  $\text{Fe}^{3+}$  イオン周囲の局所的な電子状態の変化が確認された。軸配位子方向のゼロ磁場分裂定数  $D$  は、常圧から 1.96 GPa の圧力印加により  $6.90 \text{ cm}^{-1}$  から  $7.90 \text{ cm}^{-1}$  へと約 30 % 増大した。圧力下における結晶構造データは存在しないため、実際にどのような圧縮率でヘミンクロライド分子に構造変化が起こっているのかは定性的な議論の域を超えないが、配位子場理論に基づいて  $D$  値の圧力依存性について定性的な説明を行うことに成功した。

圧力は、連続的かつ可逆的に物質の電子状態を制御可能な物理的パラメータとして認識されている。配位子である原子・分子種を変える化学修飾による研究方法では、様々な化学的相互作用を変えて電子状態を変化させているため、実験結果の直接的な比較が容易ではない。それと比較して、圧力効果を用いた電子状態研究は、磁性イオンと配位子間の距離を変えることでゼロ磁場分裂定数の変化を起こすことが出来るため、ゼロ磁場分裂の起源について、より定量的かつ、より詳細に調べていくことが可能な手法であると言える。本研究の成果をもとに、今後、金属ポルフィリン錯体や金属タンパク質の電子状態に関する実験的研究および量子化学計算などを用いた理論的研究が発展していくことを期待している。

## [参考文献]

- [5.1] K. Akasaka, *Chem. Rev.* **106**, 1814 (2006).
- [5.2] K. Heremans, L. Smeller, *Biochim. Biophys. Acta.* **1386**, 353 (1998).
- [5.3] P. W. Bridgman, *J. Biol. Chem.* **19**, 511 (1914).
- [5.4] J. F. Brandts, R. J. Oliveira, C. Westort, *Biochemistry* **9**, 1038 (1970).
- [5.5] S. A. Hawley, *Biochemistry* **10**, 2436 (1971).
- [5.6] L. Smeller, P. Rubens, K. Heremans, *Biochemistry* **38**, 3816 (1999).
- [5.7] E. Chatani, H. Naiki, Y. Goto, *J. Mol. Biol.* **359**, 1086 (2006).
- [5.8] F. Hirata, K. Akasaka, *J. Chem. Phys.* **142**, 044110 (2015).
- [5.9] J. McCoy, W. L. Hubbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 1331 (2011).
- [5.10] M. T. Lerch, Z. Yang, C. Altenbach, W. L. Hubbell, *Met. Enzymol.* **564**, 29 (2015).
- [5.11] M. T. Lerch, Z. Yang, E. K. Brooks, W. L. Hubbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 1201 (2014).
- [5.12] M. T. Lerch, J. Horwitz, J. McCoy, W. L. Hubbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 4714 (2013).
- [5.13] L. M. Nguyen, J. Roche, *J. Magn. Reson.* **277**, 179 (2017).
- [5.14] J. Jonas, L. Ballard, D. Nash, *Biophys. J.* **75**, 445 (1998).
- [5.15] A. Maeno, D. Sindhikara, F. Hirata, R. Otten, F. W. Dahlquist, S. Yokoyama, K. Akasaka, F. A. A. Mulder, R. Kitahara, *Biophys. J.* **108**, 133 (2015).
- [5.16] H. Yamada, T. Nagae, N. Watanabe, *Acta Cryst.* **D71**, 742 (2015).
- [5.17] O. Galkin, S. Buchter, A. Tabirian, A. Schulte, *Biophys. J.* **73**, 2752 (1997).
- [5.18] M. Klepacka, K. Bajdor, A. Jeżewski, *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **7/48**, 275 (1998).
- [5.19] B. I. Swanson, S. F. Agnew, M. R. Ondrias, R. G. Alden, *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 341 (1986).
- [5.20] J.-B. Rouget, T. Aksel, J. Roche, J.-L. Saldana, A. E. Garcia, D. Barrick, C. A. Royer, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 6020 (2011).
- [5.21] D. W. Wood, T. N. Andersen, H. Eyring, *J. Phys. Chem.* **70**, 360 (1966).
- [5.22] V. V. Mozhaev, K. Heremans, J. Frank, P. Masson, C. Balny, *Proteins* **24**, 81 (1996).

- [5.23] A. R. Champion, H. G. Drickamer, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **58**, 876 (1967).
- [5.24] J. Silver, R. F. George, J. R. Miller, C. A. McCammon, D. J. Evans, G. J. Leigh, Inorg. Chem. **38**, 4256 (1999).
- [5.25] M. Blume, Phys. Rev. Lett. **18**, 305 (1967).
- [5.26] M. C. Marden, G. Hui Bon Hoa, F. Stetzkowski-Marden, Biophys. J. **49**, 619 (1986).
- [5.27] I. Morishima, M. Hara, J. Am. Chem. Soc. **104**, 6833 (1982).
- [5.28] R. Kitahara, M. Kato, Y. Taniguchi, Protein Sci. **12**, 207 (2003).
- [5.29] H. Ohta, S. Okubo, T. Sakurai, T. Goto, K. Kirita, K. Ueda, Y. Uwatoko, T. Saito, M. Azuma, M. Takano, J. Akimitsu, Physica. B **294**, 624 (2001).
- [5.30] A. V. Kornilov, P. J. M. van Bentum, J. S. Brooks, J. S. Qualls, J. A. A. J. Perenboom, V. M. Pudalov, Synth. Met. **103**, 2246 (1999).
- [5.31] T. Sakurai, A. Taketani, T. Tomita, S. Okubo, H. Ohta, Y. Uwatoko, Rev. Sci. Instrum, **78**, 065107 (2006).
- [5.32] T. Sakurai, M. Tomoo, S. Okubo, H. Ohta, K. Kudo, Y. Koike, J. Phys.: Conf. Ser., **150**, 042171 (2009).
- [5.33] A. Prescimone, C. Morien, D. Allan, J. A. Schlueter, S. W. Tozer, J. K. Manson, S. Parsons, E. K. Brechin, S. Hill, Angew. Chem. Int. Ed. **51**, 7490 (2012).
- [5.34] K. Thirunavukkuarasu, S. M. Winter, C. C. Beedle, A. E. Kovalev, R. T. Oakley, S. Hill, Phys. Rev. B **91**, 014412 (2015).
- [5.35] K. Fujimoto, T. Sakurai, S. Okubo, H. Ohta, K. Matsubayashi, Y. Uwatoko, K. Kudo, Y. Koike, Appl. Magn. Reson. **44**, 893 (2013).
- [5.36] T. Sakurai, R. Matsui, K. Kawasaki, S. Okubo, H. Ohta, K. Matsubayashi, Y. Uwatoko, K. Kudo, Y. Koike, Appl. Magn. Reson. 2015, **46**, 1007 (2015).
- [5.37] T. Sakurai, S. Okubo, H. Ohta, J. Magn. Reson. **280**, 3 (2017).
- [5.38] J. Ernst, J. Subramanian, J.-H. Fuhrhop, Z. Naturforsch. A **32**, 1129 (1977).
- [5.39] P. L. Richards, W. S. Caughey, H. Eberspaecher, G. Feher, M. Malley, J. Chem. Phys. **47**, 1187 (1967).
- [5.40] R. G. Alden, J. D. Satterlee, J. Mintrovich, I. Constantindis, M. R. Ondrias, B. I. Swanson, J. Biol. Chem. **264**, 1933 (1989).

- [5.41] C. Jung, O. Ristau, H. Schulze, S. G. Sligar, *Eur. J. Biochem.* **235**, 660 (1996).
- [5.42] B. Náfrádi, R. Gaál, A. Sienkiewicz, T. Fehér, L. Forró, *J. Magn. Reson.* **195**, 206 (2008).
- [5.43] S. O. Obare, T. Ito, M. H. Balfour, G. J. Meyer, *Nano Lett.* **3**, 1151 (2003).





## 第 6 章

Force-detected ESR Measurements in a Terahertz Range  
up to 0.5 THz and Application to Hemin

## 6-1 イントロダクション

第四章、第五章では、透過法による強磁場・テラヘルツ ESR 測定装置を用いて、ヘム鉄錯体の一つであるヘミンクロライドの EPR 測定を多重極限環境下で行い、ヘム鉄イオン周囲の電子状態について実験的に調べた。これらの実験で使用した試料は数十 mg のオーダーであった。ヘミンクロライドなどヘムタンパク質モデル錯体は分子量が約 1,000 g/mol 以下と小さいので、10-100 mg 程度試料を用意すれば透過法で EPR 測定が十分に可能となる。しかし、実際のヘムタンパク質の場合は、分子量が 10,000 g/mol を超えるため、同じ質量の粉末試料を用意しても単純計算でスピン数が 1/10 以下となり、ESR 信号の S/N も 1/10 以下になることが予想される。ヘム鉄錯体と同程度の S/N の信号を得ようとするれば、10 倍以上の質量のヘムタンパク質を用意する必要があるが、そのような 100 mg-1 g オーダーという多量の試料を用意出来るヘムタンパク質の種類は限られる。また、粉末試料ではなく溶液試料にすると、粉末試料よりもスピン濃度が下がるため、さらに試料体積を稼ぐ必要がある。このような状況では限られた試料空間に十分量のスピンを含む試料を搭載出来ないので、ヘムタンパク質などスピン濃度の薄い試料の透過法による ESR 信号観測は非常に困難である。そのため、より高感度な強磁場・テラヘルツ ESR 測定法を開発し、必要試料量を格段に減らすことが強く望まれている。

こうした問題を解決するため、本章ではカンチレバーを用いた力検出型の強磁場・テラヘルツ ESR 測定法を開発を行った。この方法では、微小試料をカンチレバーの先端部に搭載し、外部磁場を印加しながら電磁波を照射する。ESR 吸収が起こると試料の磁化が変化するため、ファラデー法によりカンチレバーにはたらく力の変化として ESR 信号を検出することが可能である。ここではまず力検出型 ESR 測定法の歴史について説明する。

1991 年に Sidles により AFM (原子間力顕微鏡) と MRI を組み合わせた磁気共鳴力顕微鏡 (MRFM: Magnetic Resonance Force Microscopy) の構想が提案され [6.1]、1992 年に Rugar らがカンチレバーを用いて DPPH の ESR 信号を検出することに成功した [6.2]。この研究成果は、磁気共鳴を力として検出した最初の報告例となった。その後 1994 年に Rugar らは同様の手法により硝酸アンモニウム

中のプロトンの NMR 信号の観測に成功した[6.3]。これらの報告を機に力検出型の磁気共鳴法の開発が進み、ESR では 2004 年に Rugar らによりファラデー法を用いて単一スピン検出の感度が達成され[6.4]、100 nm までの深さで 3 次元ナノイメージングが可能になった。その後、2007 年に Mamin らは NMR イメージングの分解能を 90 nm まで拡張した[6.5]。さらに 2009 年には Degen らが MRFM によるタバコモザイクウイルス中のプロトンの NMR 信号の 3 次元イメージングに成功した[6.6]。これら一連の MRFM 技術の発展と今後の展望については Poggio と Degen が 2010 年に報告している[6.7]。

上に挙げた、Rugar を中心とする研究グループによる MRFM 技術の開発において、ESR 信号の検出は 1-10 GHz 程度のマイクロ波の領域でのみ進められた。彼らの開発はナノスケールでのイメージングに主眼が置かれたものであったため、測定領域を強磁場・高周波数へ拡張することによるスペクトルの分解能向上は趣向されていなかった。しかし 2000 年代半ばからは高分解能スペクトルの取得を主眼に置いた研究も積極的に行われるようになった。

2006 年に Ohta や Ohmichi らは東京大学物性研究所において約 800 ng の Co-Tutton 塩 ( $\text{Co}^{2+}$ ) の単結晶をピエゾ抵抗検知型カンチレバーの先端に搭載し、50-130 GHz の範囲で ESR 信号の観測に成功した。この測定では、Co-Tutton 塩の磁気トルクの変化をカンチレバーで機械的に検知しており、カンチレバーを用いた高周波 ESR 測定ではこれが最初の報告である[6.8]。この実験では外部磁場としてパルス磁場を使用しており、カンチレバーを用いた ESR 測定法をパルス磁場と組み合わせられることも実証している。ピエゾ抵抗検知型カンチレバーは、カンチレバーの根元にドーブされたピエゾ抵抗の変化として変位を検出することが可能な MEMS (Micro Electro Mechanical Systems: 微小電気機械システム) の一つである。その後、2007 年に Cruickshank と Smith は 94 GHz でのカンチレバーを用いた力検出型 ESR 測定に成功した[6.9]。また 2008 年には Toda らがカンチレバーと高強度ミリ波光源ジャイロトロンとを組み合わせることで 300 GHz における力検出型 ESR 測定法の開発に成功した[6.10]。こうした研究により、機械検出型 ESR 測定法は強磁場・テラヘルツ領域での高感度な新しい ESR 測定法として知られるようになった。ただし、Cruickshank と Smith、Toda らの研究では、94 GHz もしくは 300 GHz での固定周波数で動作する ESR 測定

装置であったため、多周波数での ESR 測定には対応していない。第二章でも説明したように、強磁場や高周波数の電磁波を用いて ESR 測定を行うことにより、高分解能なスペクトルが得られるだけでなく、強磁場中での磁気相転移を反映した ESR 信号の観測や、大きなゼロ磁場分裂準位間の ESR 信号の観測などが可能となる。特に、こうした強磁場・テラヘルツ領域で観測される ESR 信号の解析においては、周波数と共鳴磁場の関係を多周波数で調べ、分光学的観点からスピン系の電子状態について議論を行うことが重要である。そのため、多周波数測定に対応した力検出型 ESR 測定法は分光的な測定の見地から非常に重要である。2006 年に報告された Ohta や Ohmichi らの ESR 測定装置は多周波数での ESR 測定を可能としている点で特徴的である[6.8]。彼らはオーバーサイズのライトパイプを用いて電磁波をカンチレバー上の試料に到達させることで、50-130 GHz までの周波数領域において ESR 信号を観測した。さらに Ohmichi らは 2008 年にピエゾ抵抗検知型カンチレバーを用いた多周波数 ESR 測定法の改良を行い、80-240 GHz までの周波数領域における ESR 測定に成功した[6.11]。2009 年には、Ohmichi らは 2006 年の自らの報告[6.8]を追試する形で、Co-Tutton 塩の ESR 信号を 80-130 GHz の範囲で観測した[6.12]。その後、磁気トルクを検出するカンチレバー-ESR 測定法の最高周波数は Ohmichi らのグループにより更新され続け、2010 年には 310 GHz[6.13]、2012 年には 370 GHz[6.14]、そして 2015 年には 1.1 THz が達成された[6.15]。また Ohmichi らは角度回転機構の導入により 80 GHz における Co-Tutton 塩の ESR 信号の角度依存性取得にも成功している[6.16]。

磁気トルクを検出する手法は、測定試料として磁気異方性を持つ単結晶であることが必要条件となるため、磁気異方性のない試料や粉末試料への適用は原理的に不可能であった。そこで Ohmichi らは 2010 年代前半からファラデー法を利用した力検出型多周波数 ESR 測定法の開発も進めてきた。Fabry-Perot 干渉計を利用した高感度変位検出システムを組み合わせ、80-150 GHz までの多周波数における DPPH の ESR 信号の観測に成功している。また、高周波 ESR の標準試料[6.17]として用いられる MgO 中の不純物  $Mn^{2+}$  (0.2%濃度) の超微細構造分裂の観測にも成功している[6.18]。この装置の測定感度は市販の X-band や W-band の ESR 装置と同程度の  $10^9$  spins/gauss を達成している。

力検出型多周波数 ESR 測定法は、試料空間に電磁波を導入するオーバーサイズのライトパイプを用いている。そのため、広い周波数領域の電磁波を伝播することが可能な反面、電磁波の減衰による感度低下は避けられない。そこで多周波数 ESR 測定の特長を維持しつつ少しでも感度を向上させるためには、カンチレバーにはたらく力を大きくする必要がある。そのためにファラデー法で試料にはたらく磁場勾配を強くすることや、低バネ定数のカンチレバーを用いるなど、新たな方策を考える必要がある[6.19-6.21]。

筆者は 2016 年に、磁場勾配発生用の磁石をフェライト磁石から Dy 磁石に変えることで、感度を一桁向上させることに成功した[6.22]。これにより銅テトラフェニルポルフィリン (Cu-TPP、 $S = 1/2$ ) と呼ばれる金属ポルフィリン錯体の EPR 信号を 370 GHz までのテラヘルツ領域で観測することに成功した。しかし一方で、強磁場中ではカンチレバーの変位が大きくなり過ため、Fabry-Perot 干渉計を構成する光ファイバー端面とカンチレバー裏面の間の平行度が悪化してしまうという問題が生じた。その結果、干渉強度の変化が直線領域から大きく外れてしまい、広い磁場範囲で高い感度を保ちながら ESR 測定をすることが困難となった。ヘミンクロライドなどのヘム鉄錯体やヘムタンパク質等の EPR スペクトルは、テラヘルツ領域では T オーダーの広い磁場範囲に観測されるため、このままではヘム鉄の EPR 測定に適用することが困難である。

そこで本研究では、高い感度を維持しながらも広い磁場範囲の ESR 測定を可能にすることを目的に、カンチレバーを用いた力検出型多周波数 ESR 測定装置の改良を行った。その評価として、カンチレバーにヘミンクロライドを搭載し、500 GHz までの多周波数で EPR 測定を行った。

## 6-2 実験方法

### 6-2.1 実験のセットアップ

図 6-1(a)にカンチレバーを用いた力検出型多周波数 ESR 測定法のセットアップを示す。外部磁場を発生させるために最大発生磁場 15 T の超伝導磁石を使用した。電磁波光源として、160 GHz までは Gunn 発振器、160 GHz を超える周波

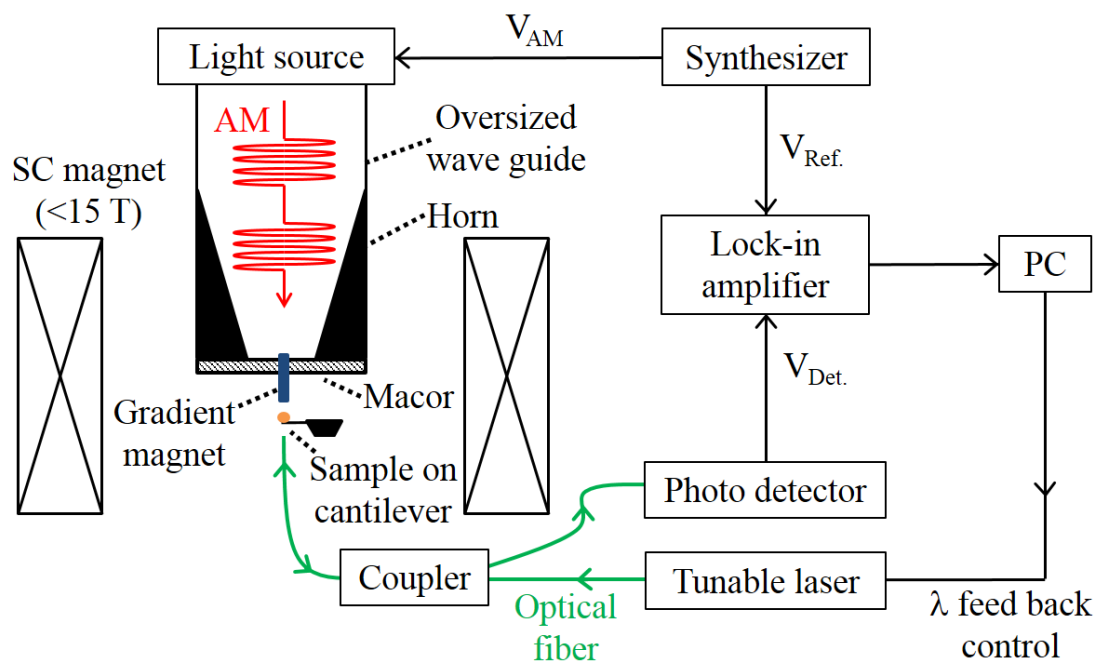


図 6-1(a) カンチレバーを用いた力検出型 ESR 測定法のセットアップ。

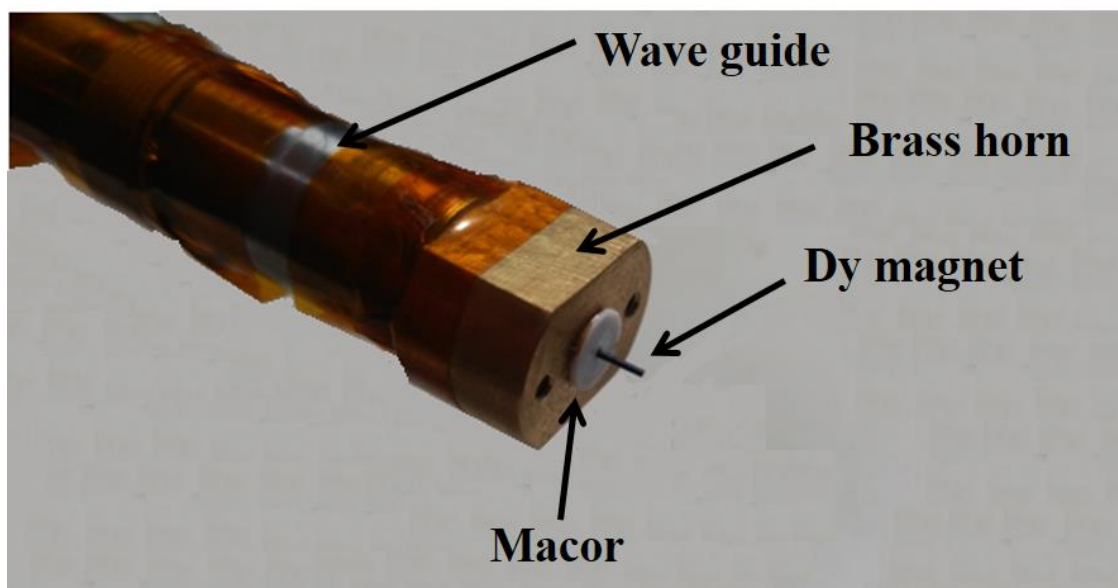


図 6-1(b) ホーン出口の様子。出口にはマコールを貼り付け、その中央に Dy 磁石を設置している。

数では後進行波管 (BWO) を使用した。光源から出た電磁波はステンレス製のライトパイプ (内径 12 mm) を通り、真鍮製のホーンを通過して試料が搭載されているカンチレバーに照射される。ライトパイプの直径は電磁波の波長よりも大きいので、多周波数の電磁波を試料空間まで伝えることが出来る。ホーン出口の直径は 4 mm であるため、カットオフ周波数は約 80 GHz である。

試料付近に磁場勾配を発生させるため、長さ 1.7 mm、直径 0.5 mm の Dy ロッドを、図 6-1(b) に示すようにマコールを用いてホーン出口に保持した。マコールは、マイクロ波やテラヘルツ波を透過しやすいセラミックスの一種である。図 6-2(a) に、本研究で自作したカンチレバーホルダーを示す。図 6-2(b) にカンチレバー付近の拡大図を示す。試料を搭載したカンチレバーは市販のアライメントディスク上にセットし、薄い真鍮の板で固定している。図 6-2(c) はカンチレバー、Dy 磁石、光ファイバーの位置関係が分かるように真正面から撮影した写真である。カンチレバー先端裏面の直下に光ファイバーを固定し、光ファイバー端面との間で Fabry-Perot 干渉計を構成した。

シンセサイザの出力を用いて外部から電磁波強度を AM 変調し、同期信号をロックインアンプの参照信号として用いた。電磁波強度を変調することでカンチレバーの振動振幅が同じ周期で変調を受け、ロックインアンプで検出される。カンチレバーの振動振幅が変化することとして二つの効果を考慮する必要がある。一つは Photothermal 効果による影響である。電磁波強度を周期的に変調することでカンチレバーとカンチレバー周辺の温度が周期的に変調を受ける。この影響で、カンチレバーは ESR 信号とは無関係に常時、振動が励起される。もう一つは ESR 信号に由来する成分である。2-34 式で示したように ESR 吸収時には試料の磁化が変化するため、試料に働く磁場勾配力も変化しカンチレバーの振動振幅が変化する。従って、ロックインアンプで検出している変調周波数に同期した信号はこの両者の和に対応している。

図 6-3 に、ヘミンクロライドを搭載したカンチレバーの写真を示す。試料瓶から数十  $\mu\text{m}$  程度の大きさのヘミンクロライド微結晶一粒を取り出し、少量の二液混合型エポキシ系接着剤 (商品名: アラルダイト) でカンチレバー上に接着した。

試料の質量  $m_{\text{sample}}$  は、試料搭載前のカンチレバーの固有振動数から、試料搭



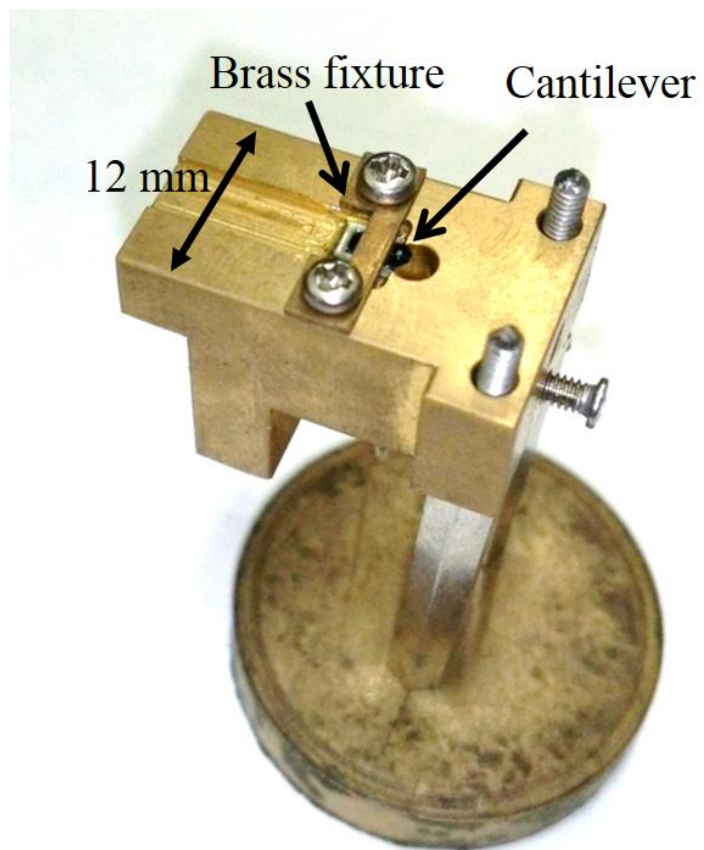


図 6-2(a) カンチレバーホルダーの全体写真。

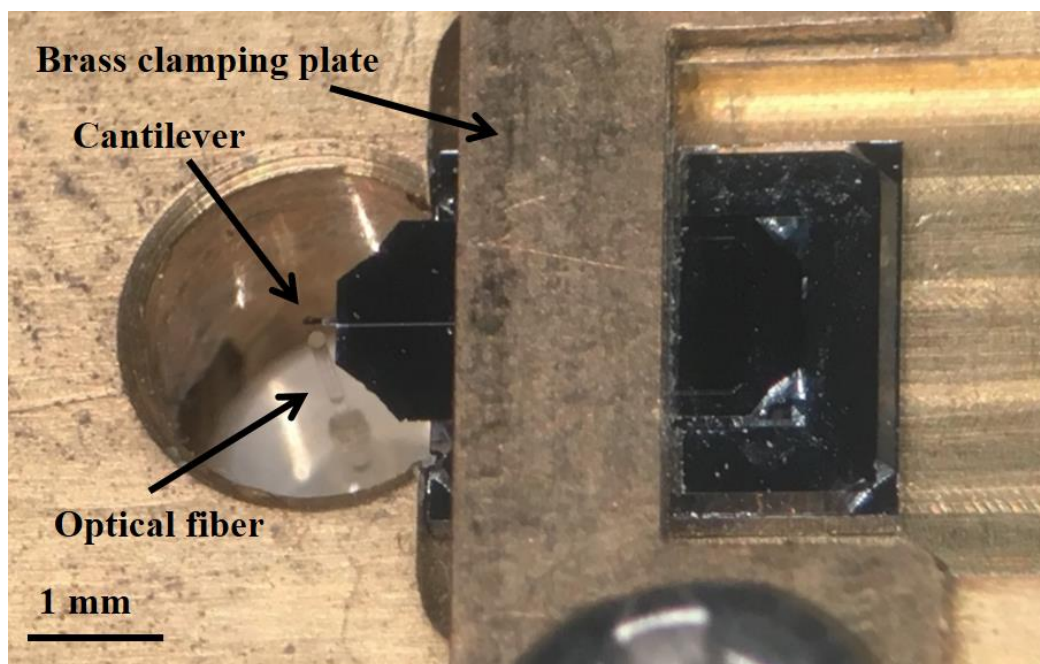


図 6-2(b) カンチレバーホルダーの拡大写真。

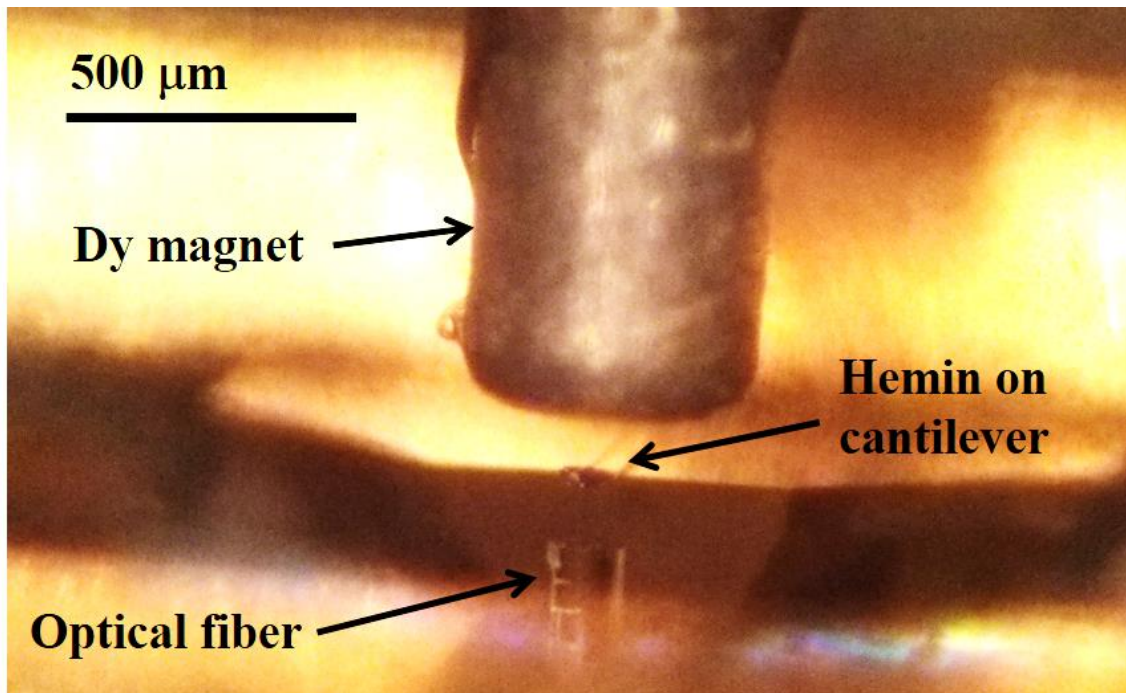


図 6-2(c) カンチレバーホルダー真正面からの写真。カンチレバー上にはヘミンクロライドの微結晶が載っている。

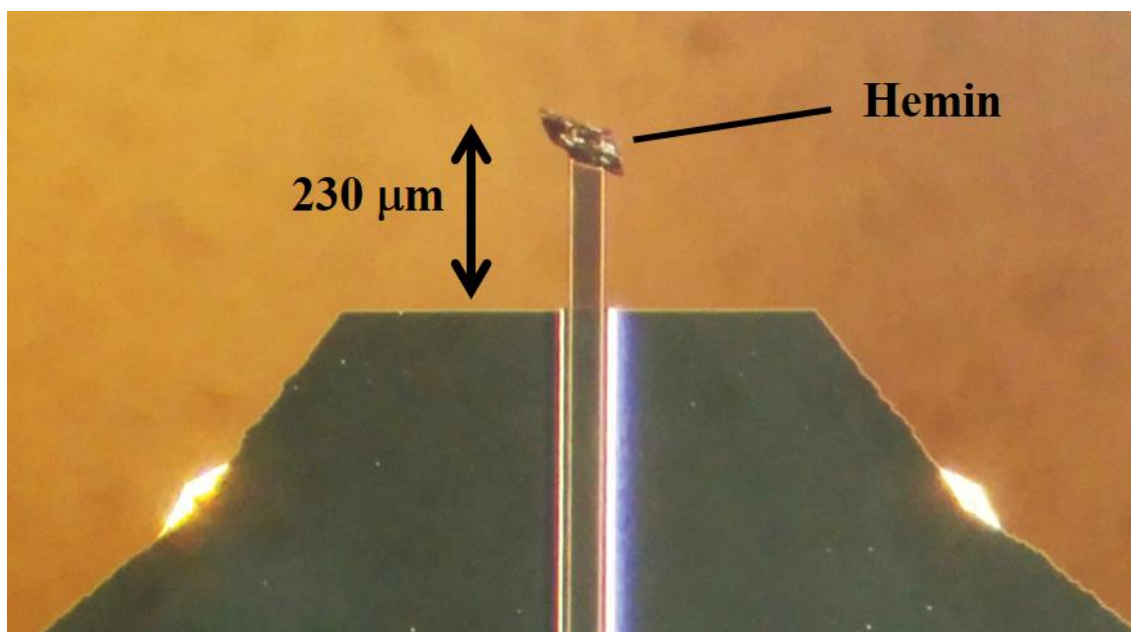


図 6-3 ヘミンクロライドの微結晶を搭載したカンチレバーの写真。

載後のカンチレバーの固有周波数がどれだけシフトしたかを測定することで見積もることが可能である。計算式は以下の通りである。

$$m_{\text{sample}} = \frac{k_c}{(2\pi)^2} \left( \frac{1}{f_{\text{on}}^2} - \frac{1}{f_{\text{off}}^2} \right) \quad (6-1)$$

ここで、 $f_{\text{on}}$  は試料搭載時のカンチレバーの固有振動数、 $f_{\text{off}}$  は試料搭載前のカンチレバーの固有振動数である。計算の結果、質量は約 16 ng と見積もられた。また、試料のサイズは約  $100 \times 50 \times 10 \mu\text{m}^3$  であり、本研究で使用する電磁波の波長よりも十分短い。つまり電磁波の振動磁場  $B_1$  が試料内部で空間的に均一であり、電磁波が試料中の各スピンに対して均一に作用することを意味している。測定はすべて 4.2 K で行った。

## 6-2.2 検出可能変位のダイナミックレンジ拡張

Fabry-Perot 干渉計を利用した変位検出測定では、出来る限り高感度測定を実現するために、キャビティ長の最適化もしくはレーザー光の波長の最適化を行う必要がある。つまり、3-6 式より干渉計のキャビティ長が変化すれば光の干渉強度も変化するので、キャビティ長の変化に対して干渉強度の変化が大きくなる条件で測定を行えば高感度な変位検出が可能となる。低温でも動作するピエゾアクチュエータを用いてキャビティ長を変化させることで最適化する方法が一般的には採用されている[6.23-6.26]。しかし、ピエゾアクチュエータは低温では駆動範囲が狭いことや、試料空間の直径が 30 mm 程度しかなくピエゾアクチュエータを組み込むための十分なスペースを確保するのが容易でない。そこで、本章では使用するレーザー光源の波長可変性を利用し、レーザー光の波長を変えることで測定条件の最適化を行った。

手順としては、はじめに PACT (Passive Component Test) と呼ばれるテストを行う。この PACT ではレーザーモジュールから出力するレーザー光の波長を少しずつ変えていき、フォトディテクタで干渉強度を測定する。図 6-4 に PACT の測定例を示す。この PACT は 6-3 節で述べるヘミンクロライドの EPR 測定で使用了試料がカンチレバー上に搭載された状態で行った。この図を見ると分

かるように、レーザー光の波長の変化とともに検出される干渉強度は周期的に変化する。波長に対して干渉強度が大きく変化するのは変曲点付近であるので、変曲点付近の波長を選ぶことで最大の検出感度を得ることが出来る。また、PACTの結果から、Fabry-Perot干渉計のキャビティ長を求めることが出来る。キャビティ長  $d$  を求める式は、

$$d = \frac{\lambda_1 \lambda_2}{2(\lambda_1 - \lambda_2)} \quad (6-2)$$

で与えられる[6.27]。ただし、 $\lambda_1 > \lambda_2$  である。ここで、 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$  は PACT で最大（または最小）の干渉強度を与える連続した二つの波長にあたる。例えば図 6-4 では、 $\lambda_1 = 1496.0 \text{ nm}$ 、 $\lambda_2 = 1511.5 \text{ nm}$  なので、 $d = 72942 \text{ nm} = 73.0 \text{ }\mu\text{m}$  である。

DPPH ( $S = 1/2$ ) など、スピンの小さく、磁化の小さい試料を測定する際には、磁場掃引に伴う干渉強度の変化は比較的小さい。そのため、T オーダーの広い磁場範囲で測定を行っても、干渉強度が周期的に変化するほどカンチレバー先端が変位することは生じにくい[6.18]。しかし、本章で取り上げるヘミンクロライド ( $S = 5/2$ ) では磁化が大きいため、T オーダーの磁場範囲を掃引すると、しばしば干渉強度の周期的振動（フリッジ）が何度も観測されるほどカンチレバー先端が変位する。そのため、ESR が起こると予想される磁場付近で PACT を再度とり直し、最適な干渉条件を構成し直す必要があった。このことは、逆に言えば、未知試料の ESR 測定を行う場合、共鳴磁場があらかじめ分からないのでレーザーの波長設定が手探りとなり、効率的に測定が行えない。また、PACT で得られた波形の傾きの大きさはロックインアンプで読み取る電圧の大きさに対応する。つまり、カンチレバーの変位が大きくなり直線的な領域（3-10 式）から外れてくると、測定感度がカンチレバーの変位に依存するようになる（例えば、干渉強度が最大（最小）の点ではカンチレバーの変位に対し、出力変化がないので測定感度はゼロになる）。そのためヘミンクロライドのような試料に対する測定では、広い磁場範囲の ESR 測定を行うことは実質的に不可能である。このように磁場に対するダイナミックレンジの狭さは Fabry-Perot 干渉計を用いた手法の大きな問題点であり、測定可能な試料にも厳しい制限がかかっていた。

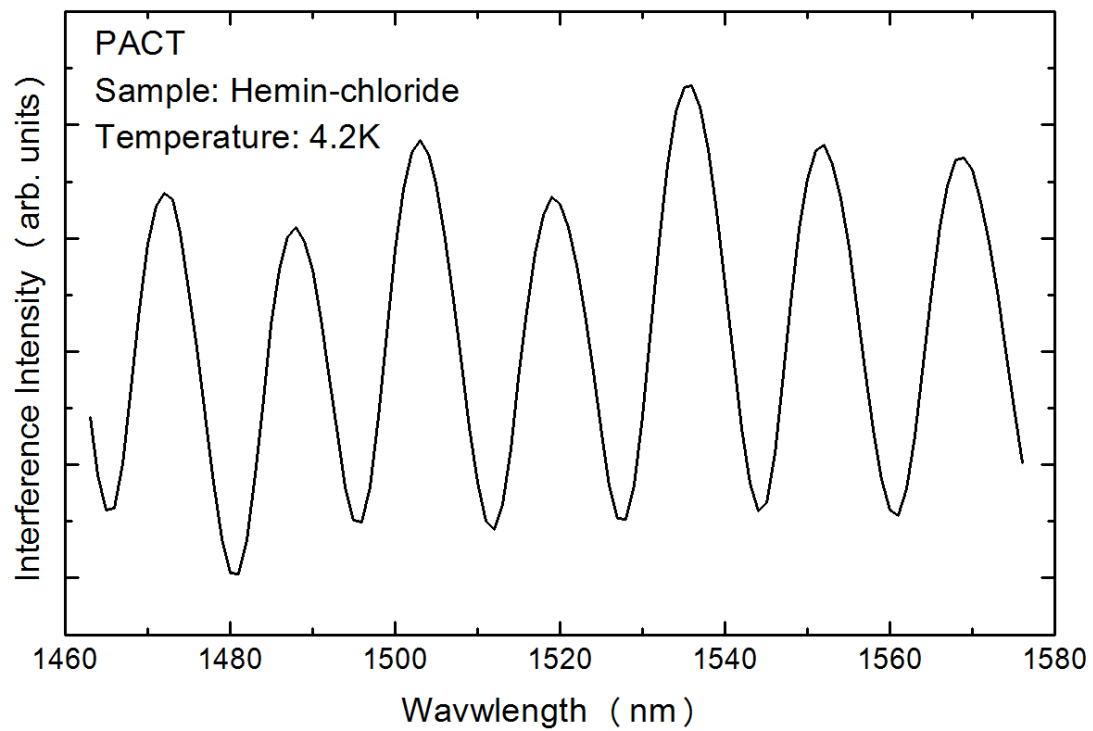


図 6-4 Fabry-Perot 干渉計において周波数掃引を行った際に観測される干渉強度の周期的振動（フリッジ）。

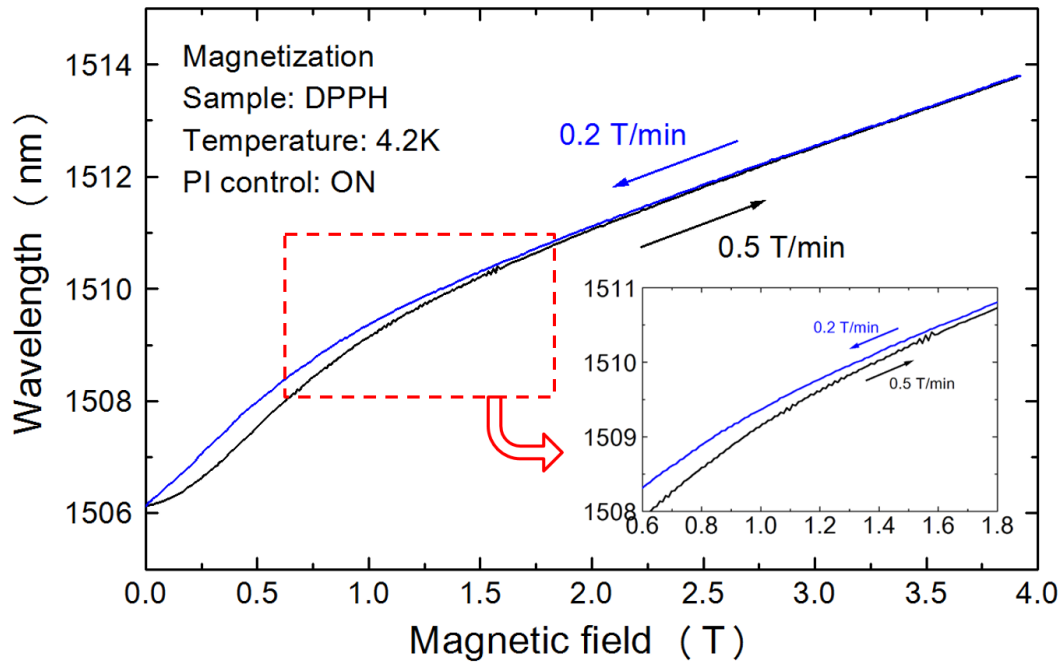


図 6-5(a) レーザー光の波長に PI 制御を行いながら測定した DPPH 粉末試料の磁化測定結果。挿入図は、0.6 T から 1.8 T の間を拡大したもの。

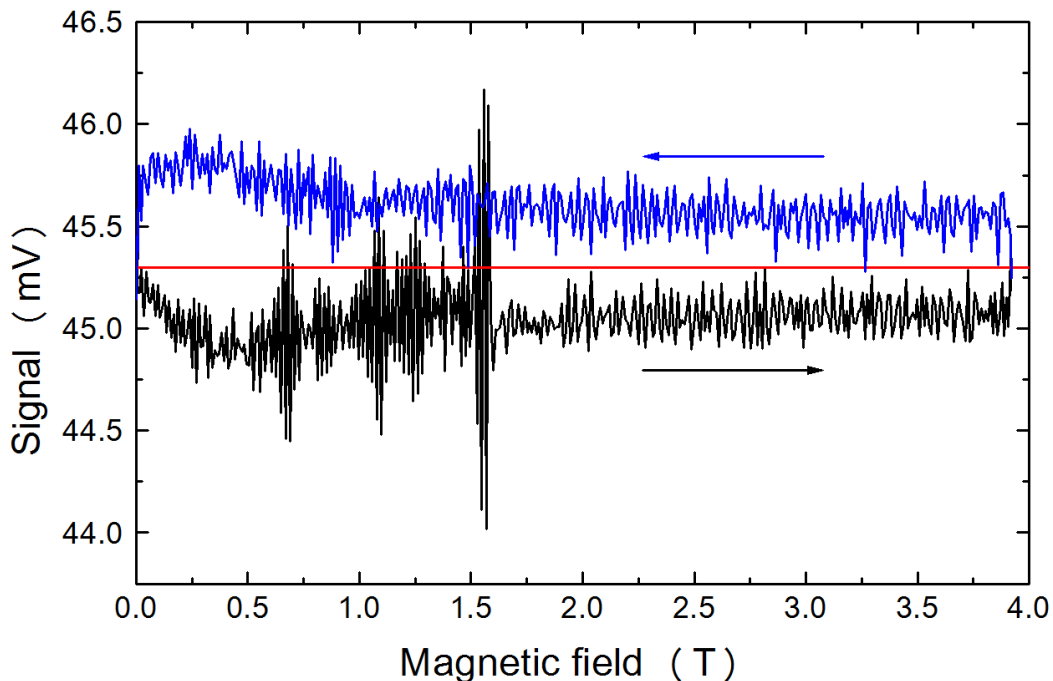


図 6-5(b) フォトディテクタによって測定された干渉強度の電圧換算値。赤の実線は測定前に設定した PI 制御の基準電圧値(45.3 mV)のレベルを表す。

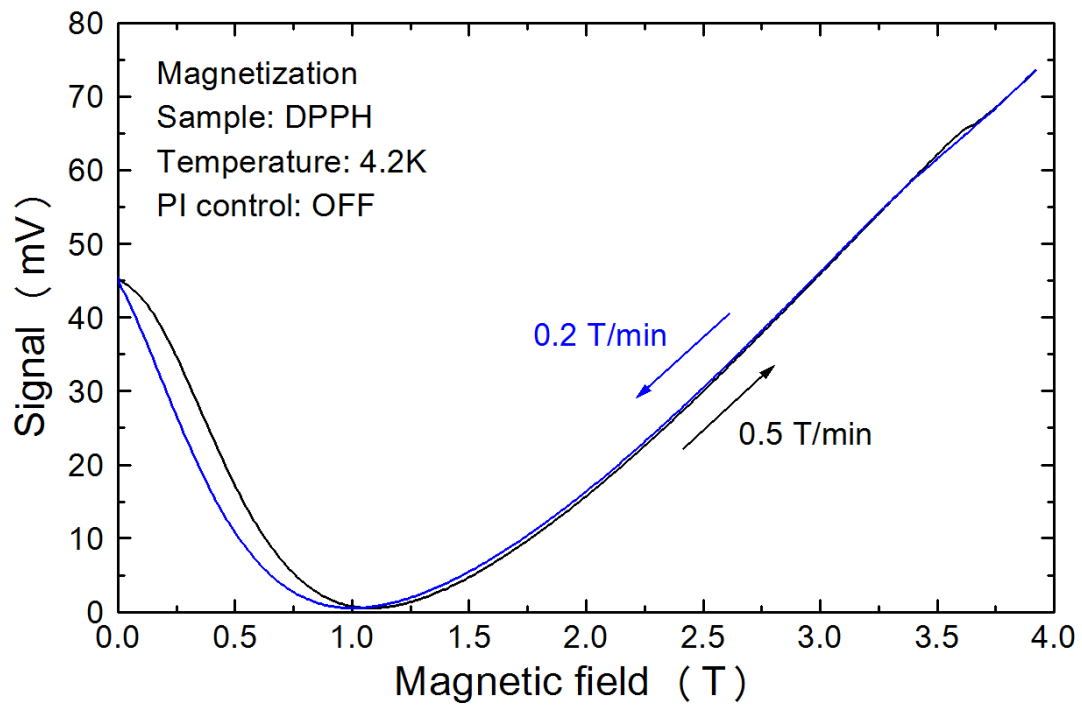


図 6-5(c) 波長を固定して、PI 制御を行わずに DPPH 粉末試料の磁化測定を行った結果。



この問題を解決するため、本研究では Fabry-Perot 干渉計に用いるレーザー光の波長コントロールを行った。すなわち、干渉強度が PACT で得られた干渉強度の変曲点、つまり周期の山と谷のちょうど中間の値に常に一定に保たれるよう調節出来れば、検出感度が変位に依存しなくなり、検出可能な変位領域も拡大する。

これを実現するために、以前より使用していたレーザーモジュール (Agilent 81989A) の「波長可変性」を活用することにした。具体的には、開始波長と、その波長での干渉強度に対応する電圧値を決めておき、その基準電圧からのずれが生じた場合、もとの基準電圧に戻すように波長を変えるような制御を行えばよい。本研究では、PI 制御の手法を利用して、波長のコントロールを行った。PI 制御は、あらかじめ設定しておいた基準値からのずれを計算し、基準値に戻そうとするフィードバック制御のことを言う。今回であれば、フォトディテクタで読み取った電圧が、基準値として設定した電圧からずれているかをある一定時間ごとに計算し、ずれが大きい場合は大きく波長を変化させ、ずれが小さいときは小さく波長を変化させることで、基準電圧に戻るよう波長にフィードバックをかける。このような PI 制御のプログラムは LabVIEW を用いて自作した。 $d_0$  を測定開始時のキャビティ長、 $\lambda_0$  を測定開始時のレーザー波長、 $d_p$  を測定中のキャビティ長、 $\lambda_p$  を測定中のレーザー波長とすると、キャビティ長と波長の関係は、

$$d_p = \frac{d_0 \lambda_p}{\lambda_0} \quad (6-3)$$

と書ける。この式に従って波長をコントロールするよう制御すれば良い。

図 6-5(a)に、DPPH (試料質量 : 130 ng) をカンチレバーに搭載し、6-3 式に従う PI 制御を行いながら 4 T まで磁場掃引した結果を示す。キャビティ長が一定になるようにフィードバックをかけているので、縦軸はレーザーの発振波長となっている。また、図 6-5(b)に干渉強度を示すフォトディテクタの出力電圧値を示す。この測定では、0 T において PI 制御の基準電圧を 45.3 mV に設定し、0 T → 4 T → 0 T と磁場を掃引した。0 T から 4 T へ磁場を上げるときは 0.5 T/min、4 T から 0 T へ磁場を下げるときは 0.2 T/min の掃引速度で行った。全体的に、

PI 制御がうまく機能しており、滑らかに波長をコントロール出来ていることが分かる。なお、磁場を上げた時と下げた時で 2 T 付近まで磁化の曲線が重なっていないが、これは Dy 磁石の磁化が飽和していない領域のため、ヒステリシスが変位に影響していると考えられる。

図 6-5(a)の挿入図を見ると分かるように、磁場を 0 T から 4 T へ上げる際、0.8 T から 1.7 T 付近において、波長コントロールのエラーが大きく、ギザギザとした波長掃引になっていることが分かる。特に図 6-5(b)を見ると、0.8 T から 1.7 T 付近では 0.5 T/min で掃引すると基準電圧に戻すために波長を大きく動かし過ぎていてエラーが大きくなっていることが分かる。一方、0.2 T/min で磁場を下げる際には同じ磁場領域であってもエラーが小さく安定している。

これは、波長の変更には有限の時間が必要であることが原因として挙げられる。波長可変レーザーでは内部の回折格子を用いて出力波長を変えているので、PC から波長変更の指令が送られてから実際にその波長が出力されるまでに有限の応答速度が必要である。そのため PC から指令を送る時間のインターバルを 1 秒程度取っておかないと、波長可変レーザーが誤作動を起こし故障してしまう。0.2 T/min で掃引した場合は、0.5 T/min で掃引した場合に比べて安定した波長変化となっていることから、磁場掃引速度に限界があるように見える。そこで、速い磁場掃引に対しても出来るだけ安定した波長可変を実現するために、6-3 式に補正項を加えることにした。具体的には、次のようにテイラー展開の一次の項を加えた。

$$d_p = \frac{d_0}{\lambda_0} \left[ \lambda_p + \frac{\partial \lambda_0}{\partial V} \Big|_{V_{\text{set}}} (V_p - V_{\text{set}}) \right] \quad (6-4)$$

ここで、 $V_p$  は測定中のフォトディテクタの読み取り電圧値（干渉強度）、 $V_{\text{set}}$  はあらかじめ設定しておく基準電圧値である。この式に従った PI 制御を行うことにより、基準電圧からのエラーは小さくなり、0.5 T/min でも滑らかに波長を変えることが可能となった。

0 T でのレーザー光の波長は  $\lambda_0 = 1506.1 \text{ nm}$ 、キャビティ長は  $d_0 = 84.13 \text{ }\mu\text{m}$  であった。さらに、4 T に到達した時のレーザー光の波長は  $\lambda_p = 1513.8 \text{ nm}$  であったことから、4 T に到達した時のキャビティ長は  $d_p = 84.58 \text{ }\mu\text{m}$  であった。従っ

て、0 T から 4 T までの磁場掃引でおよそ  $\Delta d = 0.45 \mu\text{m}$  キャビティ長が変化したことが分かった。この結果を、PI 制御を行わずに磁場掃引を行って得られた図 6-5(c)の結果と比較してみる。3-6 式より、波長を  $\lambda_0$  に固定した状態で磁場掃引し、目標の磁場に到達した時に  $n$  周期分干渉強度が変化したとき、キャビティ長の変化量  $\Delta d$  は、

$$\Delta d = \frac{\lambda_0 n}{2} \quad (6-5)$$

と書ける。図 6-5(c)の測定では、開始波長を  $\lambda_0 = 1506.1 \text{ nm}$  に固定して磁化測定を行った。図より 4 T 到達時におよそ  $n = 0.6$  周期分干渉強度が変化したことから、キャビティ長の変化は  $\Delta d = 0.45 \mu\text{m}$  となり、PI 制御を行った時の結果との良い一致が得られている。

次の節では、上述の干渉強度を一定に保ちながら磁場掃引を行う方法によりダイナミックレンジの拡張を試みる。そして、この改良により可能となったヘミンクロライドの 10 T までの強磁場・テラヘルツ EPR 測定の結果について述べる。

### 6-3 実験結果

図 6-6(a)、6-6(b)に、カンチレバー上に 16 ng のヘミンクロライドを搭載し、4.2 K において電磁波を照射せずに 8 T まで磁場掃引を行った結果を示す。図 6-6(a)はレーザー波長を 1500 nm に固定し、PI 制御を行わずに磁場掃引した結果である。縦軸はフォトディテクタで読み取った電圧であり、干渉強度に対応する。一方、図 6-6(b)は PI 制御を行い、干渉強度を一定に保ちながら磁場掃引した結果であり、縦軸はレーザーモジュールから出力されたレーザー光の波長を示している。

まず図 6-6(a)では、磁場を上げるにつれて徐々にヘミンクロライドの磁化が大きくなり、それに伴ってカンチレバーの変位も大きくなるため、8 T に到達するまで干渉強度が複数回振動していることが見て取れる。このデータの中で、印加磁場の変化量に対して干渉強度の変化量が急激な部分、つまり傾きが大き

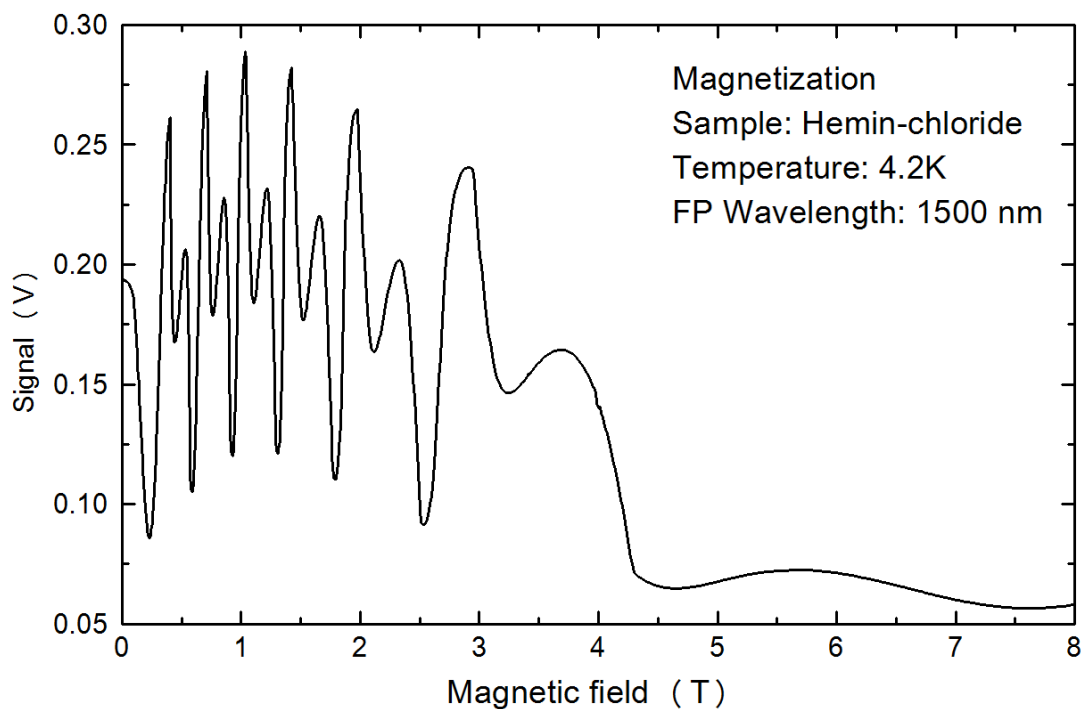


図 6-6(a) PI 制御を行わずにヘミンクロライドの磁化測定を行った結果。

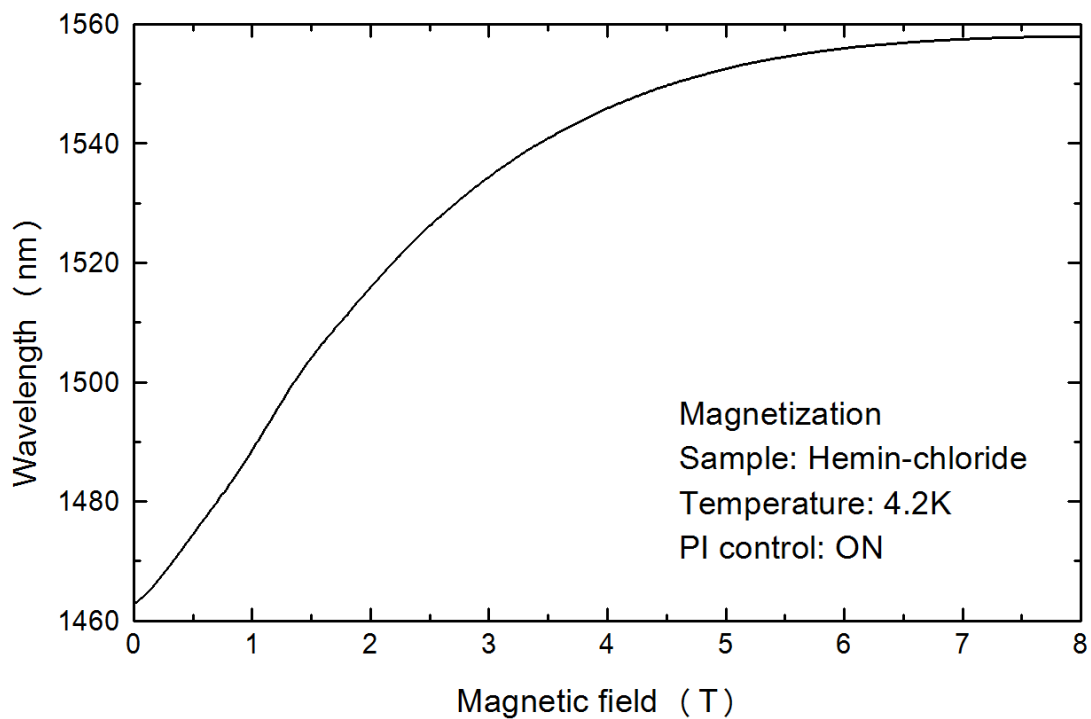


図 6-6(b) PI 制御を行いヘミンクロライドの磁化測定を行った結果。

い部分は、高感度にカンチレバーの変位を計測出来る条件となっている。一方、傾きがゼロに近い部分では、感度は非常に低いことが分かる。このように、レーザー光の波長を固定した場合は、検出感度を一定に保ったまま広い磁場範囲を掃引することは難しい。

一方、図 6-6(b)では、図 6-4 の PACT から波長を 1490 nm に設定し、PI 制御により波長をコントロールしながら磁場掃引した。そのため常に干涉強度の中間値を維持するよう波長が変化しており、滑らかな曲線としてデータが得られている。常磁性体は、低い磁場では大きな磁化変化を示し、高磁場になるにつれて徐々に飽和磁化に向かう。強磁場中では、飽和磁化に近づいているため磁化の変化が緩やかで、最後は飽和磁化に到達し変化がなくなる。図 6-6(b)の曲線は、まさに磁化曲線のようなデータとなっている。1.5 T くらいまでの低磁場では Dy 磁石の磁化も変化しているため、Dy 磁石が試料付近に作る磁場も変化している。その効果がカンチレバーの変位に影響を及ぼすため得られたデータは完全な試料の磁化曲線を反映したものとは言えないが、ほぼブリルアン関数様のデータが得られている。

ここで、レーザー波長の変化量から、カンチレバーがどれくらい変位したかを算出してみる。PACT の変曲点付近において干涉強度は 3-10 式のように表されることから、干涉強度を一定に保とうとするならば、波長とキャビティ長の比は常に一定である。このことから、キャビティ長の変化量  $\Delta d$  は、

$$\Delta d = d_0 \left( \frac{\lambda_1}{\lambda_0} - 1 \right) \quad (6-6)$$

と書ける。図 6-6(b)の結果では、 $d_0 = 100 \mu\text{m}$ 、 $\lambda_0 = 1463 \text{ nm}$ 、 $\lambda_1 = 1558 \text{ nm}$  であったので、0-8 T までの間に、カンチレバーは  $\Delta d = 6.4 \mu\text{m}$  も変位したことが分かった。使用している波長可変レーザーの波長は 1463 nm から 1577 nm まで変えられるので、キャビティ長が  $d_0 = 100 \mu\text{m}$  であれば、最大で 7.8  $\mu\text{m}$  程度のキャビティ長の変化まで対応可能である。一方、波長を固定した条件の測定では、PACT の傾きが大きい領域、つまり高感度に変位を計測出来る領域は干涉強度の周期の 1/4 程度の範囲である。その場合、ダイナミックレンジとしては 0.4  $\mu\text{m}$  程度である。そのため、波長コントロールの方法によりダイナミックレンジを

25 倍程度改善することに成功し、広いカンチレバーの変位に対しシームレスに計測することが可能になった。

ヘミンクロライドをはじめ、ヘム鉄錯体およびヘムタンパク質のテラヘルツ領域における EPR 信号は、一番吸収強度の強い  $g_{\text{perp}}$  吸収だけでも 0.5 T 程度の実効的な線幅を持っており、スペクトル全体を観測するには 1 T 以上の磁場掃引が必要である。そのため、PI 制御無しでは EPR スペクトル全体をシームレスに測定することは不可能であった。一方、PI 制御を用いた方法を開発したことにより、変位計測のダイナミックレンジを約 25 倍広げることに成功したので、この方法をヘミンクロライドの EPR 測定に適用した。

最後に、図 6-7 に、カンチレバーを用いて得られたヘミンクロライドの強磁場・テラヘルツ EPR 測定結果を示す。第四章、第五章で示した透過法による ESR 測定では、ESR 吸収が起これば検出器で読み取る信号の強度が減衰するため、ベースラインに対して下向きに ESR 信号が観測されていたが、カンチレバーを用いた ESR 測定では、磁化の変化量を観測しているため、ESR が起こればその変化量は大きくなり、AM 変調周波数で振動するカンチレバーの振幅が大きくなるので、ロックインアンプで読み取る電圧値も大きくなる。そのため、ベースラインに対して上向きに ESR 信号が観測される。本研究では、105 GHz から 500 GHz までの範囲でヘミンクロライドの EPR 信号を観測することに成功した。観測された吸収ピークは、磁場がポルフィリン面内に印加された場合の EPR 信号（第四章、第五章における  $g_{\text{perp}}$  吸収[4.19]）に対応している。測定に用いたヘミンクロライドの微結晶が単結晶かどうかは外見から判断出来なかったが、カンチレバー上に適当に接着した微結晶から  $g_{\text{perp}}$  吸収の EPR 信号が観測されたため。搭載した試料は多結晶であった可能性が高い。測定周波数を徐々に上げていくと、第四章、第五章における実験結果のように、共鳴磁場は高磁場側へシフトした。図 6-8 に電磁波の周波数と共鳴磁場の関係をプロットしたグラフを示す。まず図中の黒い破線で示すように、低周波数のデータ (105、130、160 GHz) は直線でフィッティングを行った。その結果、次の方程式、

$$h\nu = g\mu_B(B + B_{\text{local}}) \quad (6-7)$$

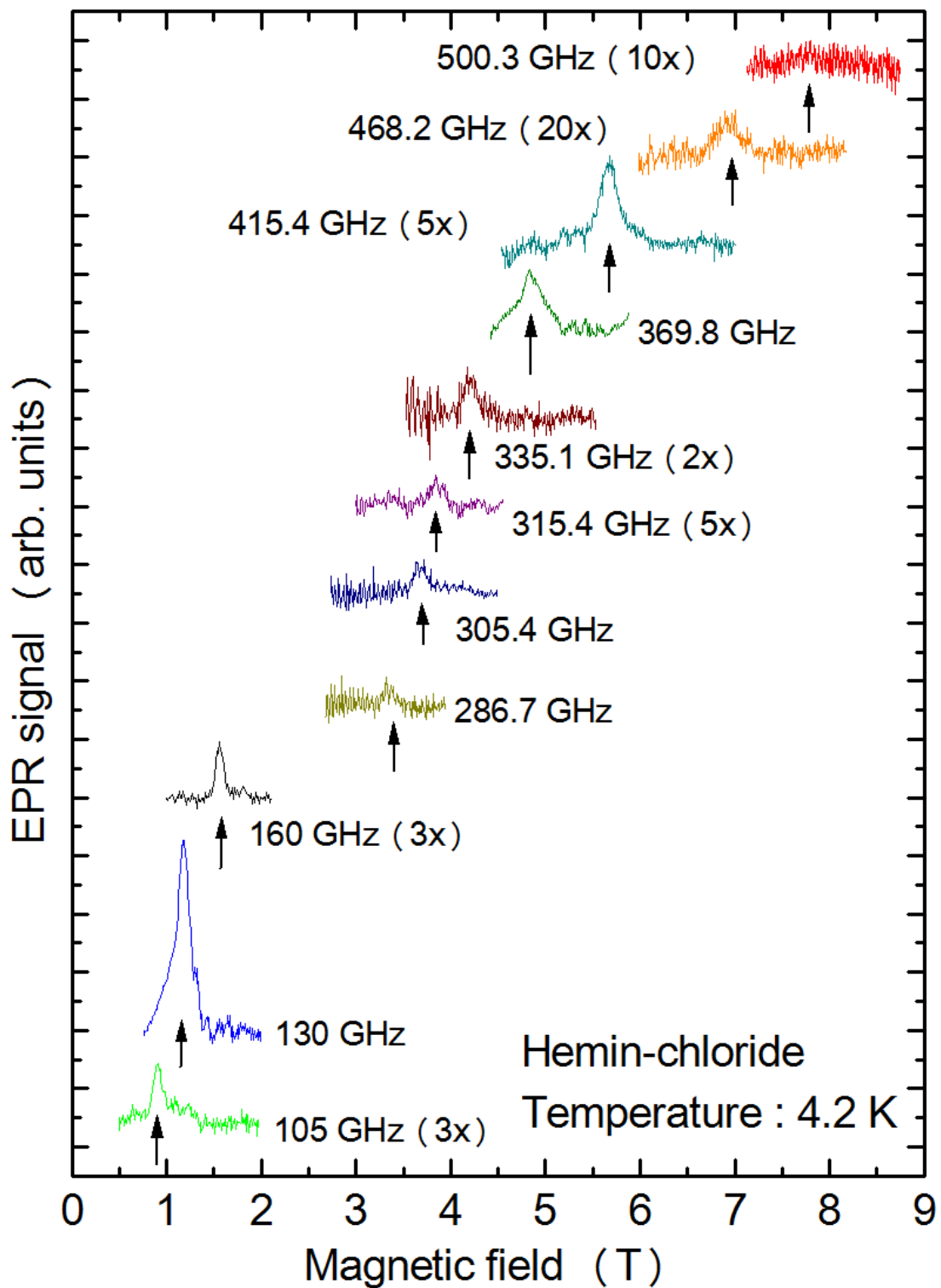


図 6-7 カンチレバーを用いたヘミンクロライド微結晶 (16 ng) の強磁場・テラヘルツ EPR 測定の結果。

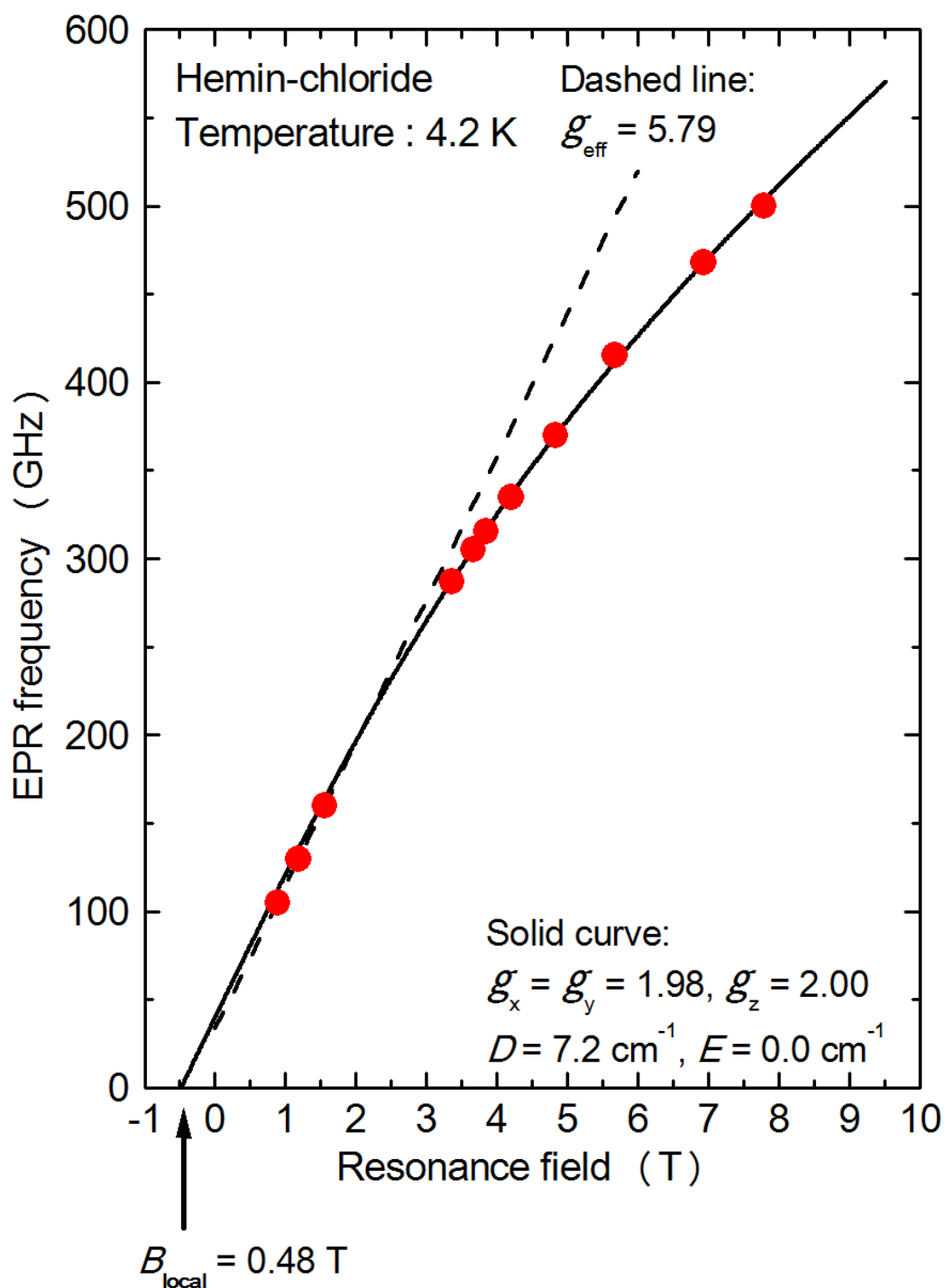


図 6-8 図 6-7 の EPR 吸収ピークから得られた共鳴磁場と周波数の関係。破線は 105、130、160 GHz の結果から得られた線形フィッティング、実線は図中のスピンハミルトニアンパラメータと 1-7 式を用いて得られたシミュレーション結果である。



で導出される曲線の傾きから、見かけ上の値  $g = 5.79$  が得られた。ここで、 $B_{\text{local}}$  は勾配発生用磁石による共鳴磁場のシフトを表している。この算出された値は、X-band 帯で決定された  $g$  値  $g_{\text{perp}} \sim 6$  に近い値を示している[4.19]。105、130、160 GHz までの周波数で直線フィッティングすると  $g$  値が 6 より少し小さくなっている理由として、高磁場極限ではゼーマン項の大きさが相対的にゼロ磁場分裂項よりも大きくなるため、ゼロ磁場分裂の影響が小さくなり、見かけの  $g$  値が本質的な  $g$  値に近づくためである。さらに高周波数領域では徐々に  $g_x = g_y \sim 2$  に近づいていくはずであるが、実際、286 GHz から 500 GHz までの共鳴磁場は、 $g = 5.79$  よりも高磁場側に出ている。例えば 468 GHz と 500 GHz の二点で線形フィッティングを行えば、その直線の傾きから見かけの  $g$  値は  $g = 2.60$  が得られる。

## 6-4 考察

### 6-4.1 スピンハミルトニアンパラメータの見積もり

精密な解析を行うためには、スピンハミルトニアンで記述される行列を解き、ESR 信号が観測される周波数と磁場の関係を良く再現するか検討する必要がある。本研究においても第五章の実験結果の解析に用いた 1-7 式を対角化し、本質的な  $g$  値 ( $g_x$ 、 $g_y$ 、 $g_z$ ) とゼロ磁場分裂定数  $D$  をパラメータとして決定する。 $E$  値については、面内異方性を示す吸収波形を観測出来なかったため、 $E = 0$  として考えている。図 6-8 中の黒い実線で示すように、 $g_x = g_y = 1.98$ 、 $g_z = 2.00$ 、 $D = 7.2 \text{ cm}^{-1}$  というスピンハミルトニアンパラメータを用いて実験結果を再現することが出来た。これらの値は過去の報告値に近い値である[4.16]。

図 6-8 中の実線は、スピンハミルトニアンを対角化した後、 $B // x$ 、 $y$  でのエネルギーダイアグラムの中で最低エネルギーのスピン準位と、二番目に低いエネルギーのスピン準位の差を取ることで得られたシミュレーションの曲線である。ただし、図 6-8 ではプロットと良く一致するよう曲線全体を横軸方向にオフセットさせており、グラフ上の原点を通過していないことを注意しておく。図 6-8 の横軸は、外部磁場として発生させた超伝導磁石が出す磁場の大きさ  $B_{\text{ext}}$

の関数としており、試料付近の局所的な磁場の大きさではない。試料付近の磁場の大きさは Dy 磁石が生む磁場  $B_{\text{local}}$  も考慮する必要がある。つまり試料の感じる磁場  $B$  は、 $B = B_{\text{ext}} + B_{\text{local}}$  と書ける。したがって、図 6-8 中では、シミュレーションの曲線を横軸方向にオフセットした量が勾配磁石により発生している磁場の大きさに対応する。図 6-8 より Dy 磁石が試料付近に作る磁場は  $B_{\text{local}} = 0.48 \text{ T}$  と見積もられた。

## 6-4.2 勾配磁石が作る磁場と磁場勾配の計算

ここで、Dy 磁石が試料付近に作る磁場勾配について求める。図 6-9 のような円柱磁石を考え、中心軸 ( $z$  軸) 上につくる磁場と磁場勾配を計算する。強磁性体の外半径を  $r$ 、高さを  $L$  とする。強磁性体が中心軸上につくる磁場は、円柱の上下面に生じたそれぞれの磁荷がつくる磁場の足し合わせである。

まず、半径  $r$  をもつ一様に磁化したリングを考える。リング中心からの距離が  $z$  となる中心軸上の点 P における磁場を求める。リング上の磁荷の線密度を  $\rho$  とすれば、長さ  $\Delta s$  の微小部分に分布する磁荷  $\rho \Delta s$  が点 P につくる中心軸方向に平行な磁束密度の成分は、

$$B_{\Delta s}(z) = \frac{1}{4\pi} \frac{\rho \Delta s}{z^2 + r^2} \frac{z}{\sqrt{z^2 + r^2}} \quad (6-8)$$

と表される。中心軸方向に垂直な磁場の成分はリングの各部分からの寄与で打ち消し合う。よって、点 P に作られる磁束密度の大きさは、リング全体について足し合わせて、

$$\begin{aligned} B_{\text{ring}}(z) &= \int_0^{2\pi r} \frac{1}{4\pi} \frac{\rho}{z^2 + r^2} \frac{z}{\sqrt{z^2 + r^2}} ds \\ &= \frac{1}{2} \frac{\rho r}{z^2 + r^2} \frac{z}{\sqrt{z^2 + r^2}} \end{aligned} \quad (6-9)$$

と表すことが出来る[6.28]。

次に一様に磁化した、磁荷面密度  $m$  の円盤を考える。円盤中心からの距離が

$z$  となる中心軸上の点  $P$  における磁場を求める。まず、円盤を幅  $\Delta r'$  の細い円形リングに分割すると、各々のリング上に分布する磁荷が点  $P$  につくる磁場は 6-9 式により求めることが出来る。半径  $r'$  のリングの線密度を  $\rho = m\Delta r'$  とおき、これを全てのリングについて足し合わせると、

$$\begin{aligned} B_{\text{disk}}(z) &= \int_0^r \frac{mzr'}{2(z^2 + r'^2)^{3/2}} dr' \\ &= \frac{mz}{2} \left[ -\frac{1}{\sqrt{z^2 + r'^2}} \right]_0^r \\ &= \frac{mz}{2} \left( \frac{1}{z} - \frac{1}{\sqrt{z^2 + r^2}} \right) \end{aligned} \quad (6-10)$$

と表すことが出来、円盤が点  $P$  につくる磁束密度が求められる。

さらにこの円盤を拡張し、半径  $r$ 、高さ  $L$  をもつ円柱を考える。円柱の上端面中心からの距離が  $z$  となる中心軸上の点  $P$  における磁場を求める。これは円柱の上端面と下端面に生じたそれぞれの磁荷が点  $P$  につくる磁場の足し合わせで求められる。6-10 式は上端面が点  $P$  につくる磁場を表しており、 $B_{\text{cylinder\_top}}(z) = B_{\text{disk}}(z)$  とする。下端面がつくる磁場は、6-10 式で  $z \rightarrow z+L$  として、

$$B_{\text{cylinder\_bottom}}(z) = \frac{m(z+L)}{2} \left( \frac{1}{z+L} - \frac{1}{\sqrt{(z+L)^2 + r^2}} \right) \quad (6-11)$$

と表されるので、6-10 式、6-11 式より点  $P$  における磁場は、

$$\begin{aligned} B_{\text{cylinder}}(z) &= B_{\text{cylinder\_top}}(z) - B_{\text{cylinder\_bottom}}(z) \\ &= \frac{m}{2} \left( \frac{z+L}{\sqrt{(z+L)^2 + r^2}} - \frac{z}{\sqrt{z^2 + r^2}} \right) \end{aligned} \quad (6-12)$$

と表される。磁場勾配は 6-12 式を微分することによって得ることが出来、

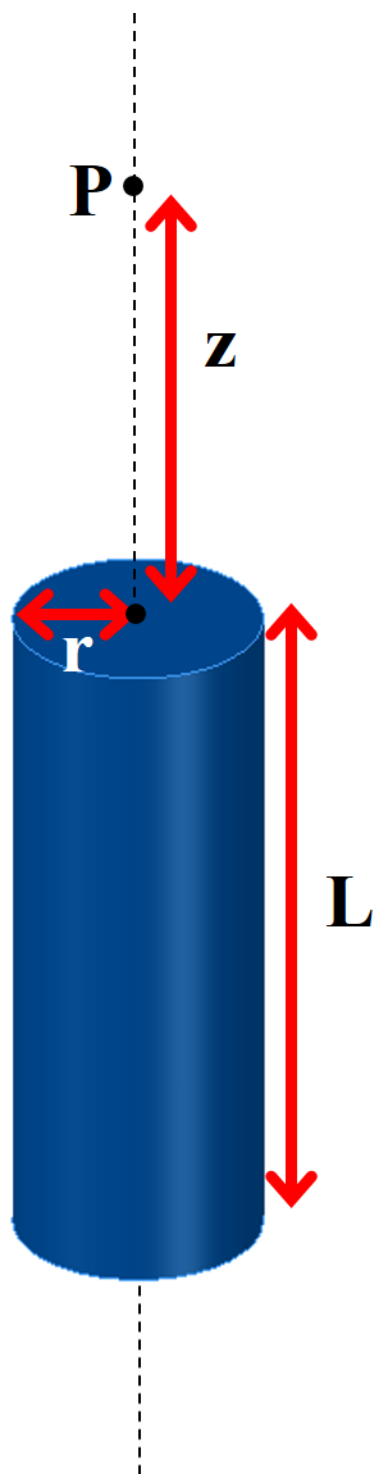


图 6-9 圆柱型 Dy 磁石。

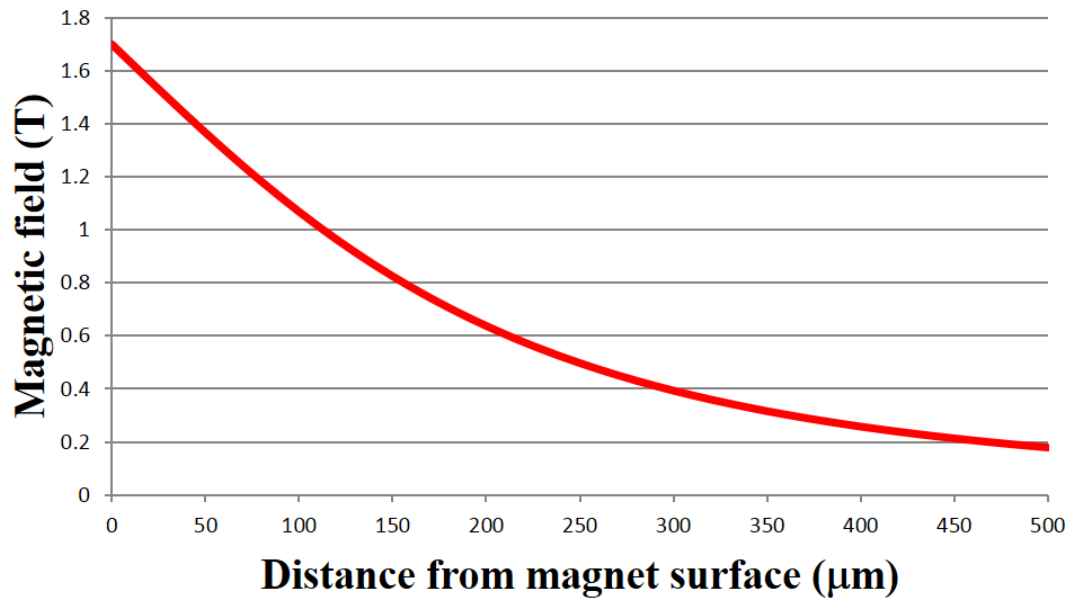


図 6-10(a) 円柱型 Dy 磁石が中心軸上に発生する磁場の計算結果。横軸は Dy 磁石上端からの距離を表す。

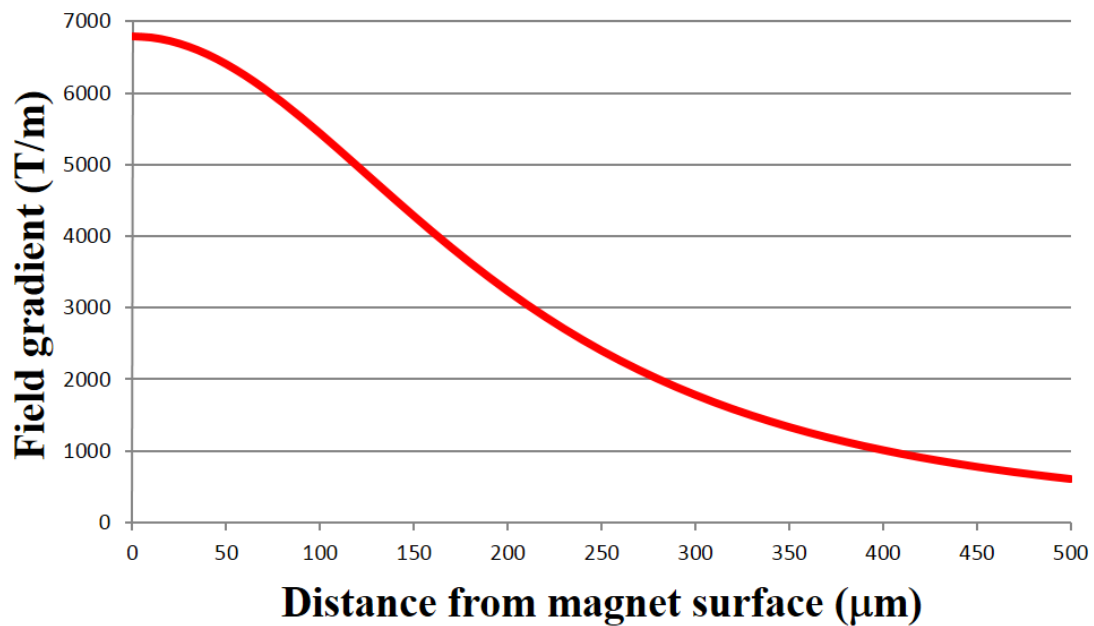


図 6-10(b) 円柱型 Dy 磁石の中心軸上における磁場勾配の計算結果。横軸は Dy 磁石上端からの距離を表す。

$$\frac{dB_{\text{cylinder}}(z)}{dz} = \frac{m}{2} \left( \frac{z^2}{(z^2 + r^2)^{\frac{3}{2}}} - \frac{1}{\sqrt{z^2 + r^2}} - \frac{(z+L)^2}{\{(z+L)^2 + r^2\}^{\frac{3}{2}}} + \frac{1}{\sqrt{(z+L)^2 + r^2}} \right) \quad (6-13)$$

と表される。本研究で用意した Dy 磁石 (Good Fellow 社製) は直径 0.5 mm × 高さ 17 mm の円柱形状をしており、飽和磁化は 3.4 T である。磁場と磁場勾配の距離依存性を図 6-10(a)、6-10(b)にそれぞれ示す。この結果から、本研究で用いた Dy 磁石では最高で 7,000 T/m 程度の磁場勾配を発生出来ることが分かる。 $z < 400 \mu\text{m}$  程度となるように試料を配置すれば、試料付近に  $10^3$  T/m オーダーの磁場勾配を発生させることが出来る。

$B_{\text{local}} = 0.48$  T という値から Dy 磁石表面と試料間の距離を計算すると、図 6-10(a)からおよそ  $250 \mu\text{m}$  という値が見積もられる。さらに、このことから図 6-10(b)を用いて、Dy 磁石が試料付近に生じる  $z$  軸方向の磁場勾配は 2,500 T/m と見積もられる。例えば、図 6-7 の 160 GHz のデータを見ると、観測されたスペクトルの線幅は約 100 mT であり、本来のヘミンクロライドの線幅が数十 mT であることを考慮すると、10 mT のオーダーで線幅が広がっていることを意味している。これは、Dy 磁石の作る磁場勾配により、試料内部に磁場分布が発生したことに起因すると考えられる。磁場分布の大きさは、おおよそ  $z$  軸方向の試料の厚みで決まる。カンチレバーに搭載したヘミンクロライドの  $z$  軸方向 (カンチレバーの長手方向に対して垂直な方向) の厚さが約  $10 \mu\text{m}$  であることを考慮すると、試料の両端では 25 mT 程度の磁場分布が生じていることが見積もられる。従って、観測された 100 mT という EPR 信号の線幅は磁場勾配による試料内部の磁場分布として説明出来る。

### 6-4.3 スピン感度の見積もり

最後にスピン感度について述べる。本章の実験でカンチレバーに搭載した試料のスピン数は、ヘミンクロライドの分子量と試料質量 (16 ng) からおよそ  $\sim 10^{13}$

spins であると見積もられた。130 GHz の場合、最小検出スピンの数は試料のスピンの数を S/N ( $\sim 100$ ) で割ることによって求めることが出来、その値はおおよそ  $\sim 10^{11}$  spins であった。よって、130 GHz におけるスピン感度は、線幅が約 100 mT (1,000 Gauss) であることを考慮すると、 $\sim 10^8$  spins/gauss と見積もられた。第四章で使用した装置の感度は  $10^{15}$  spins/gauss 程度、第五章で使用した装置の感度は  $10^{13}$  spins/gauss 程度なので、カンチレバーを用いた力検出型 ESR 法は  $10^5$  倍 $\sim 10^7$  倍程度も感度が高いと言える。しかし、468 GHz では S/N は 5 程度であり、130 GHz の 1/20 程度であった。

このように感度が低下した主な理由としては二つ考えられる。一つは、500 GHz の電磁波の出力 ( $\sim 1$  mW) が 130 GHz の電磁波の出力 (41 mW) より一桁程度弱かったことが挙げられる。もう一つは、図 6-6(a)の結果からも明らかのように、強磁場中でカンチレバーが大きく変位しているため、ファイバー端面とカンチレバー裏面の平行度が悪化し、Fabry-Perot 干渉計においてカンチレバーからの戻り光が低減している可能性が挙げられる。本研究では 15 T 超伝導磁石を測定に使用したが、共鳴磁場が 10 T 以上に期待される周波数 (500 GHz 超) 領域では EPR 信号を観測することが出来なかった。今後、10 T 以上でも測定感度を落とさずにヘミンクロライドなど磁化の大きい試料の測定を可能にすることが今後の課題として挙げられる。

またカンチレバーを用いた ESR 測定法は、スピン感度は良いものの、S/N が高くない。その結果、第四章、第五章で観測出来ていたヘミンクロライドの  $\alpha$  モードや  $\beta$  モードを観測出来ていない。つまり今後は  $g_{\text{perp}}$  吸収よりも信号強度の弱い  $\alpha$  モードや  $\beta$  モードも観測可能に出来るように S/N を上げていくことが一つの課題として挙げられる。このように本装置は透過法の ESR 測定装置と比べて実用的と言える段階には到達していない。そのためさらに S/N を向上させ、広い磁場範囲で感度を維持するための装置改良を行っていく必要がある。強磁場中でも感度を落とさないようにするためには、ファイバー端面とカンチレバー裏面の平行度を維持するような改善を施す必要がある。改善策の一つとしては、力検出デバイスの構造を変えることが考えられる。現在はカンチレバーを使用しており片持ち梁の形状をしているが、両持ち梁やトランポリンのような構造のデバイスの導入も考えていく必要があるだろう。

## 6-5 まとめ

本研究ではカンチレバーを用いた力検出型の強磁場・テラヘルツ ESR 測定法を開発した。これまでのカンチレバーを用いた ESR 測定装置では、Fabry-Perot 干渉計を利用した変位検出方式を採用しているために、カンチレバーの変位計測のダイナミックレンジが  $0.4 \mu\text{m}$  程度であった。本研究では、レーザーモジュールの波長可変性を活用した PI 制御を行うことで、ダイナミックレンジを 20 倍以上拡張することに成功した。これにより、T オーダーの広い磁場範囲にわたる ESR スペクトルを観測することが可能になった。本研究では、この手法をヘミンクロライド ( $16 \text{ ng}$ ) の微結晶に対して適用し、 $500 \text{ GHz}$  までの周波数範囲で  $g_{\text{perp}}$  吸収を観測することに成功した。また、 $g$  テンソルとゼロ磁場分裂定数  $D$  を見積もることが出来た。

本手法を用いることで、従来の透過型のテラヘルツ ESR 測定法に比べ、必要な試料量を格段に減少させることに成功した。しかし、ヘムタンパク質のような低スピン濃度の試料に対して本手法を応用するためには、さらなる S/N の改善が必要である。特に強磁場中ではカンチレバーの変位が大きくなることが原因となって Fabry-Perot 干渉計の構成が崩れてしまい、感度低下を招いているのでこの問題を解決する必要がある。

また、カンチレバーを用いた手法は、現状では溶液測定への応用が困難である。カンチレバー先端に微量な溶液試料を搭載することは容易ではなく、また、一旦溶液を載せても溶液状態のまま保持する方法が無い。ヘムタンパク質など、実際のタンパク質分子の物性測定では、生化学的な活性が保たれている溶液状態での測定が好まれる。今後、力検出型 ESR 測定法をヘムタンパク質へ応用するためには、溶液試料にも適用可能な測定手法が望まれている。次章ではこのような課題を解決するための取り組みについて記述する。



## [参考文献]

- [6.1] A. J. Sidles, *Appl. Phys. Lett.* **58**, 2854 (1991).
- [6.2] D. Rugar, C. S. Yannoni, J. A. Sidles, *Nature* **360**, 563 (1992).
- [6.3] D. Rugar, O. Züger, S. Hoen, C. S. Yannoni, H.-M. Vieth, R. D. Kendrick, *Science* **264**, 1560 (1994).
- [6.4] D. Rugar, R. Budakian, H. J. Mamin, B. W. Chui, *Nature* **430**, 329 (2004).
- [6.5] H. J. Mamin, M. Poggio, C. L. Degen, D. Rugar, *Nat. Nanotechnol.* **2**, 301 (2007).
- [6.6] C. L. Degen, M. Poggio, H. J. Mamin, C. T. Rettner, D. Rugar, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 1313 (2009).
- [6.7] M. Poggio, C. L. Degen, *Nanotechnology* **21**, 342001 (2010).
- [6.8] H. Ohta, M. Kimata, S. Okubo, E. Ohmichi, T. Osada, *AIP Conference Proceedings* **850**, 1643 (2006).
- [6.9] P. A. S. Cruickshank, G. M. Smith, *Rev. Sci. Instrum.* **78**, 015101 (2007).
- [6.10] M. Toda, S. Mitsudo, Y. Fujii, T. Kanemaki, I. Ogawa, T. Idehara, T. Saito, Y. J. Lee, J. T. Markert, 2008 33rd International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves, (IEEE, 2008). (doi:[10.1109/ICIMW.2008.4665793](https://doi.org/10.1109/ICIMW.2008.4665793))
- [6.11] E. Ohmichi, N. Mizuno, M. Kimata, H. Ohta, *Rev. Sci. Instrum.* **79**, 103903 (2008).
- [6.12] E. Ohmichi, N. Mizuno, M. Kimata, H. Ohta, T. Osada, *Rev. Sci. Instrum.* **80**, 013904 (2009).
- [6.13] E. Ohmichi, N. Mizuno, S. Hirano, H. Ohta, *J. Low. Temp. Phys.* **159**, 276 (2010).
- [6.14] Y. Tokuda, S. Hirano, E. Ohmichi, H. Ohta, *J. Phys. Conf. Ser.* **400**, 032103 (2012).
- [6.15] H. Takahashi, E. Ohmichi, H. Ohta, *Appl. Phys. Lett.* **107**, 182405 (2015).
- [6.16] E. Ohmichi, S. Hirano, H. Ohta, *J. Magn. Reson.* **227**, 9 (2013).
- [6.17] V. I. Krinichnyi, *J. Biochem. Biophys. Methods* **23**, 1 (1991).
- [6.18] E. Ohmichi, Y. Tokuda, R. Tabuse, D. Tsubokura, T. Okamoto, H. Ohta, *Rev. Sci. Instrum.* **87**, 073904 (2016).

- [6.19] Y. Tokuda, D. Tsubokura, E. Ohmichi, H. Ohta, *J. Magnet.* **18**, 173 (2013).
- [6.20] E. Ohmichi, T. Okamoto, M. Mitani, H. Takahashi, H. Ohta, *J. Inorg. Biochem.* **162**, 190 (2016).
- [6.21] E. Ohmichi, Y. Yasufuku, K. Konishi, H. Ohta, *J. Magnet.* **18**, 163 (2013).
- [6.22] T. Okamoto, H. Takahashi, E. Ohmichi, H. Ohta, *J. Infrared Milli. Terahz Waves* **37**, 1173 (2016).
- [6.23] D. Rugar, H. J. Mamin, P. Guethner, *Appl. Phys. Lett.* **55**, 2588 (1989).
- [6.24] N. Suehira, Y. Tomiyoshi, Y. Sugawara, S. Morita, *Rev. Sci. Instrum.* **72**, 2971 (2001).
- [6.25] D. V. Pelekhov, J. B. Becker, G. Nunes, Jr., *Rev. Sci. Instrum.* **70**, 114 (1999).
- [6.26] T.-M. Chuang, A. de Lozanne, *Rev. Sci. Instrum.* **78**, 053710 (2007).
- [6.27] D. T. Smith, J. R. Pratt, L. P. Howard, *Rev. Sci. Instrum.* **80**, 035105 (2009).
- [6.28] 長岡洋介、6-4 電流のつくる磁場、「物理入門コース 3 電磁気学 I 電場と磁場」(長岡洋介 著)、岩波書店、1982 年



## 第 7 章

Force Detection of High-Frequency Electron  
Paramagnetic Resonance Spectroscopy of Microliter  
Solution Sample

## 7-1 イントロダクション

### 7-1.1 カンチレバーを用いた力検出型 ESR 測定法の問題点

第六章ではカンチレバーを用いた力検出型 ESR 測定法の開発を行った。大きな特長として非常に微小な試料の高感度 ESR 測定を行える点が挙げられるが、現在のところ次に挙げる問題点が残っている。

一つ目に、強磁場中で測定感度が低下するという点が挙げられる。Fabry-Perot 干渉計を利用した変位検出方式では、干渉計を構成している光ファイバーとカンチレバー裏面の平行度を維持しなければならない。しかし、カンチレバー上に搭載した試料にはたらく磁場勾配力は磁場とともに増大するため、磁場印加に伴いカンチレバー先端が変位し、徐々に平行度が悪化していく。1 T から 3 T 程度の低磁場では試料の磁化はそれほど大きくないため、ESR 測定に影響を及ぼすほど平行度は悪化しない。しかし、4 T、5 T と強磁場になるにつれて平行度は悪化し、10 T を超えると著しい干渉強度の低下をもたらすため ESR 測定は非常に困難となる。これは、広い磁場範囲を掃引してシームレスな ESR スペクトルを取ることが困難であることを意味している。ヘム鉄の EPR スペクトルは、第四章、第五章で見たように、様々な EPR モードのスペクトルが広い磁場範囲に観測されるため、シームレスな ESR スペクトルを得ることは非常に重要である。

二つ目に、溶液試料に対する応用が困難であることが挙げられる。第六章では、ヘムタンパク質モデル錯体のヘミンクロライドの EPR 測定を行ったが、試料形状としては固体の微結晶であった。また、過去に報告されているカンチレバーを用いた ESR 測定法を見ても、すべて測定対象は固体試料となっている。これはカンチレバーを用いた手法で液体状態の試料の ESR 測定を行おうとすると、セットアップの面で様々な困難が生じるためである。カンチレバーの先端は幅が数十  $\mu\text{m}$  と微小であるため、カンチレバー先端に搭載可能な液滴の量はせいぜい 1  $\mu\text{L}$  未満である。研究当初、筆者はマイクロインジェクション用のガラスキャピラリーを用いてカンチレバー先端に微量溶液を搭載する試みを行った。しかし、カンチレバー表面と溶液の間で濡れ現象が起こり、溶液がカン

チレバーの根元へ広がり、先端に保持することが難しかった。また、偶然にもカンチレバー先端付近に溶液をとどめることに成功したとしても、数秒で急速に溶液が蒸発してしまった。このようにカンチレバー先端に溶液試料を搭載するという方法は事実上困難であり、あらゆる方策を試したが、試料が蒸発しないようカンチレバー上に保持しながらクライオスタット内で試料を冷却・凍結させる段階まで進めることは不可能であった。

しかし最近では、生命科学の研究分野において少量の溶液試料に対する高感度測定的需求が高まっている。例えば、多くのタンパク質および酵素の生理的機能は溶液中でのみ活性状態にある。タンパク質や酵素分子は周囲に存在する水と相互作用することで活性を制御している。この意味において、タンパク質や酵素の研究においては、固体試料ではなく溶液試料を測定する必要がある。また、貴重な生体試料では試料調製、抽出が容易ではなく、微量の溶液試料しか用意出来ないことも多く見受けられる。そのような場合、微量溶液に対する高感度な ESR 測定が必要になる。

カンチレバーを用いた力検出型 ESR 測定法では、試料をカンチレバーに貼り付けて実験を行うサンプル-オン(Sample-on)の配置と、磁場勾配力を発生させるための勾配磁石をカンチレバーに貼り付けて試料をカンチレバーの近くに配置するマグネット-オン(Magnet-on)の配置による二つの方法が報告されている[6.9]。マグネット-オン配置であれば、溶液セルを作成してその中に溶液試料を密封すれば溶液の蒸発を防ぐことが出来る。しかし、マグネット-オン配置の場合、磁場中では勾配磁石自身の磁気トルクによりカンチレバーが大きく変位したり、ねじれたりしてしまうことが予想される。そのため、サンプル-オン配置の場合に比べ、強磁場中での Fabry-Perot 干渉計の動作条件を保つことが困難になり、測定は困難となる[7.1]。

こうした問題点は、力検出型 ESR 測定を汎用性の高い強磁場・テラヘルツ ESR 測定法として確立するために解決しなくてはならない内容である。逆に言えば、これらの問題点が解決されて、適用可能な試料の制限が無くなり、また広い磁場範囲でシームレスに高感度な ESR スペクトルを得ることが出来れば、本論文で目的としているヘム鉄の電子状態研究の進展にも大きく貢献出来るのではないかと考えている。

## 7-1.2 メンブレン型デバイスを用いた磁気測定

本研究では、カンチレバーの代わりに窒化シリコン ( $\text{SiN}_x$ ) ナノメンブレンと呼ばれるトランポリン型のデバイスを力検出のプロブとして採用した。まず、メンブレンの特徴としてそのトランポリン型の形状が挙げられる。すなわち、メンブレンの中央に力がかかるようにすると、中央部はどれだけ変位しても常に垂直方向に変位する。そのためメンブレンの裏面と光ファイバー端面で Fabry-Perot 干渉計を構成すれば、強磁場中でメンブレンにかかる力が大きくなっても平行度が維持出来る。その結果、磁場勾配発生用の勾配磁石をメンブレンに設置するマグネット-オン配置にしても、強磁場中においても Fabry-Perot 干渉計としての動作が安定することが期待出来る。この配置では測定試料をメンブレンから分離して設置出来ることから、様々な試料に対応することが可能である。固体試料はもちろん、試料を溶液セル内に密封することで溶液試料の測定が可能になる。

ナノメンブレンを用いて物質の磁氣的性質を調べる手法の開発は歴史が浅く、比較的新規な手法と言える。簡単にナノメンブレンの歴史について説明する。2016年に、Scozzaro らが  $\text{SiN}_x$  ナノメンブレンに DPPH を貼り付け、ミニコイルを用いて、X-band ESR 測定に成功した[7.2]。この報告がナノメンブレンを用いた最初の ESR 測定例である。また、2017年に Takahashi らは Nanosensors が市販する Si 製のメンブレン型ピエゾ抵抗センサー (MSS) [3.13, 7.3, 7.4]を検出デバイスとして、 $\kappa$ -(BEDT-TTF) $_2$ Cu(NCS) $_2$  の超伝導ヒステリシスや、 $\text{Sr}_2\text{RuO}_4$  の de-Haas-van-Alphen 振動を観測し、微小試料の磁気トルク測定に初めて応用した[7.5]。最近、低温での使用に適したピエゾ抵抗検知型カンチレバーの販売が中止されていたため、MSS を用いた磁気トルク測定法は磁性の分野においてカンチレバーに代わる方法論として注目された。その後、2017年に Blankenhorn らが  $\text{SiN}_x$  ナノメンブレンを用いた磁気トルク測定を報告した[7.6]。さらに、2018年に Takahashi らは MSS に搭載した Co-Tutton 塩の 80、90、105 GHz における ESR 信号を磁気トルクの変化として検出し、またファラデー法を用いて MSS に搭載した DPPH 粉末の ESR 信号の観測に成功した[7.7]。  $\text{SiN}_x$  ナノメン

ブレンを用いた ESR 測定は上述の Scozzaro らの X-band における報告のみで、テラヘルツ領域の ESR 測定はこれまで報告されていなかった。

市販の MSS では piezo 抵抗素子を不純物 (ホウ素) ドープによってメンブレン支持部の片面にのみに作る必要があるため、ある程度の膜厚が必要となる。そのため MSS の厚さは 2-5  $\mu\text{m}$  程度と厚くなっており、バネ定数は数十 N/m 程度とされている。技術的には薄い MSS を作ることも可能であると思われるが、現時点では市販品としては売られていない。一方、 $\text{SiN}_x$  ナノメンブレンは厚さが 100 nm しかないため、より微弱な力の変化を検出するのに適している。また、piezo 抵抗による検出方法は簡便である反面、検出感度的には Fabry-Perot 干渉計を用いた検出方法よりも劣る。そのため、より高い感度の測定を行うためには、 $\text{SiN}_x$  ナノメンブレンを用いてその変位を Fabry-Perot 干渉計で検出するのが最も適していると考えられる。

次節では、 $\text{SiN}_x$  ナノメンブレンを用いた力検出型 ESR 測定装置の概要について説明する。そして 7-3 節では、DPPH 粉末を試料とした強磁場・テラヘルツ ESR 測定の結果から装置の感度評価を行う。また、緩和時間が短い試料に対しても信号検出が可能な手法を新たに開発したので、その原理、および測定結果についても報告する。この手法は ESR 吸収・緩和に伴う試料の温度変化に着目した方法であり、従来の力検出型 ESR 測定の方法とは原理的に異なる。最後にこの手法を溶液試料への応用し、ヘミンクロライドとアコメトミオグロビンの溶液試料の強磁場・テラヘルツ EPR 測定結果について述べる。

## 7-2 実験方法

### 7-2.1 実験のセットアップ

図 7-1 に、 $\text{SiN}_x$  ナノメンブレンを用いた力検出型 ESR 測定装置のセットアップを示す。本研究においてもファラデー法を採用しているが、マグネット-オン配置にしているところが第六章のカンチレバーを用いた手法と異なっている。メンブレン上方におかれた試料が磁場中で磁化すると、メンブレン上の磁石が力を受け、メンブレンの変位に変換されて試料の磁化を検出することが可能で



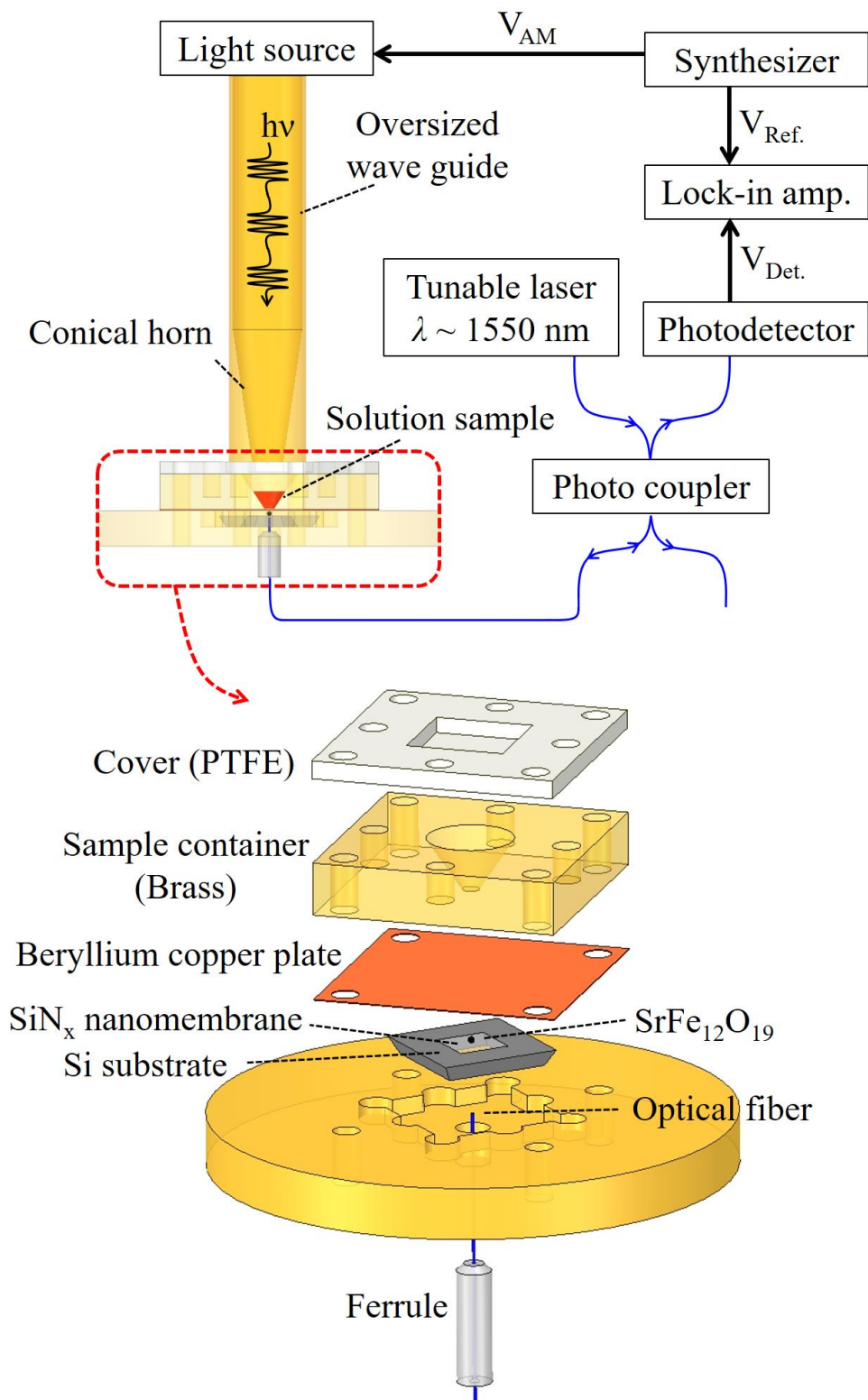


図 7-1  $\text{SiN}_x$  ナノメンブレンを用いた力検出型 ESR 測定法のセットアップ(上)と試料ホルダー付近の拡大図(下)。

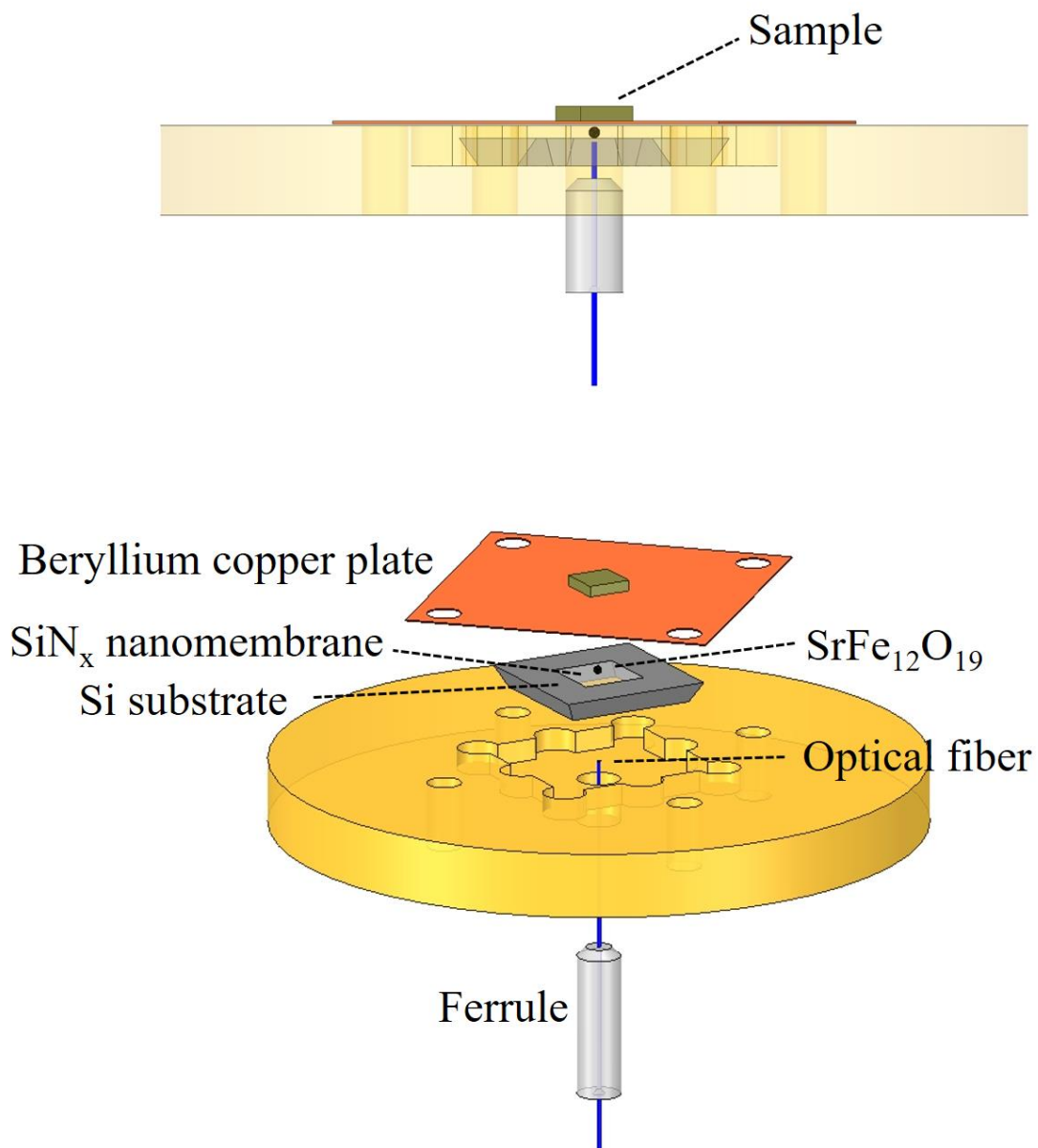


図 7-2 固体試料を測定する場合や単結晶試料の測定におけるメンブレン付近のセットアップ。

ある。ESR 吸収が起こると平衡状態の値から磁化が変化するので、メンブレンの変位の変化として ESR を検出することが出来る。

磁場勾配発生用の磁石として、直径  $40\ \mu\text{m}$  程度のストロンチウムヘキサフェライト ( $\text{SrFe}_{12}\text{O}_{19}$ ) を用意した。マイクロインジェクション用のガラスキャピラリーを使用して  $\text{SiN}_x$  ナノメンブレンの中央に Stycast1266 の小さな液滴を接着剤として置く。そこに直径  $20\ \mu\text{m}$  の金線の先端で拾ったフェライト磁石をメンブレン中央に接着した。メンブレンの直上には真鍮製の円錐型溶液セルを設置する。この溶液セルの底部の直径および高さはそれぞれ  $0.5\ \text{mm}$  および  $3.75\ \text{mm}$  である。セットアップ中に試料溶液の蒸発を防ぐため、溶液セルの上部を厚さ  $0.5\ \text{mm}$  のテフロンで密閉した。密閉の際には、真鍮とテフロン間にアピエゾン N グリースを塗布することで密閉度を高め、さらにネジで固定している。テフロンは、テラヘルツ領域の電磁波に対して高い透過性を有するので、試料に照射される電磁波はほとんど減衰しない。溶液セルの底面は厚さ  $50\ \mu\text{m}$  の CuBe 板で覆われている。このように試料と勾配磁石との間に金属の板を挟むことで、磁場による磁気的な相互作用は伝わるが、電磁波は表皮効果により遮蔽される構造となっている。

電磁波を遮蔽する理由は二つある。一つ目は、メンブレン上のフェライト磁石を磁場中で電磁波から遮蔽することにより強磁性共鳴 (FMR: Ferromagnetic Resonance) を起こさないようにするためである。FMR 吸収が起こると、ベースラインが乱れてしまうほか、FMR 信号と測定試料の ESR 信号が重畳してしまう可能性がある。二つ目は、メンブレンのスプリアス振動を抑制するためである。後述するように、電磁波を AM 変調させながら ESR 測定を行うので、電磁波がメンブレンに直接照射されると Photothermal 効果によるスプリアス振動が起き、バックグラウンドノイズのレベルが大きくなる。

図 7-2 に、固体試料の ESR 測定を行う際の、試料ホルダー付近のセットアップを示す。図 7-1 の溶液試料のセットアップと比べると、溶液セルが無くなり、厚さ  $50\ \mu\text{m}$  の CuBe 板上に試料を貼り付ける形に代わっている。粉末試料に対しても溶液セルを利用することは可能であるが、単結晶試料で、円錐の底よりも大きな試料を測定する場合は、溶液セルが邪魔になるので図 7-2 のようなセットアップで行う。

メンブレンの変位を検出するために、本研究ではメンブレン裏面（フェライト磁石とは反対の面）と光ファイバー端面との間に Fabry-Perot 干渉計を構成した。キャビティ長は約 100  $\mu\text{m}$  に設定した。第六章と同様、1.5  $\mu\text{m}$  帯の波長可変レーザーを用いており、フォトディテクタで干渉強度を読み取っている。事前に PACT を取ることで干渉強度の中間値に出力波長を設定し、メンブレンの変位に対して干渉強度の変化が最大となる条件に調整した。典型的な変位検出感度は、4.2 K における 1 kHz の振動で 0.1  $\text{pm}/\sqrt{\text{Hz}}$  のオーダーである[6.18]。

電磁波はステンレスパイプ（直径 10 mm）を通して導入し、真鍮のホーン（出口径 4 mm）から出てきて試料に照射される。電磁波光源としては、260 GHz 以下の周波数範囲では Gunn 発振器、260 GHz 以上の周波数では BWO（後進行波管）を使用した。Gunn 発振器ではバイアス電圧の内部変調機能を、また BWO ではチョッパーを用いて試料に照射される電磁波に AM 変調を行った。AM 変調の周波数やタイミングはシンセサイザーで制御している。シンセサイザーからの参照信号をロックインアンプに入力し、フォトディテクタによって検出される変調周波数に同期したメンブレンの変位を検出することで高感度に ESR 信号を検出することが出来る。

## 7-2.2 メンブレン上の磁石が作る磁場勾配の見積もり

本研究のセットアップでは、外部磁場をメンブレンに対して垂直方向（z 軸方向）に印加する。Fabry-Perot 干渉計を構成し、メンブレンの垂直方向の変位を検出するので、外部磁場と平行な磁化成分  $M_z$  を検出することが出来る。よって、メンブレン上のフェライト磁石が作る磁場勾配の z 成分と試料の磁化の z 成分のカップリングにより発生する z 軸方向の磁場勾配力がメンブレンの変位に寄与する。ここで、メンブレン中央に設置したフェライト磁石が、直径 40  $\mu\text{m}$  の球体の磁気双極子であると仮定し、その周囲に発生する磁場勾配の z 成分がどのような広がりを持っているか計算して調べてみる。飽和磁化  $\mathbf{m}$  の磁気双極子が十分離れた距離  $\mathbf{r}$  の位置に作る磁場  $\mathbf{B}_{\text{local}} = (B_x, B_y, B_z)$  は、

$$\mathbf{B}_{\text{local}} = \frac{\mu_0}{4\pi r^3} \left\{ \frac{3(\mathbf{m} \cdot \mathbf{r})\mathbf{r}}{r^2} - \mathbf{m} \right\}$$

$$\begin{pmatrix} B_x \\ B_y \\ B_z \end{pmatrix} = \frac{\mu_0}{4\pi} \left\{ \frac{3}{r^5} \begin{pmatrix} m_x x^2 + m_y xy + m_z xz \\ m_x yx + m_y y^2 + m_z yz \\ m_x zx + m_y zy + m_z z^2 \end{pmatrix} - \frac{1}{r^3} \begin{pmatrix} m_x \\ m_y \\ m_z \end{pmatrix} \right\} \quad (7-1)$$

と書ける。いま、外部磁場が  $z$  軸方向に印加されているので、 $\mathbf{m} = (0, 0, m_z)$  とすれば、

$$\begin{pmatrix} B_x \\ B_y \\ B_z \end{pmatrix} = \frac{\mu_0}{4\pi} \left\{ \frac{3}{r^5} \begin{pmatrix} m_z xz \\ m_z yz \\ m_z z^2 \end{pmatrix} - \frac{1}{r^3} \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ m_z \end{pmatrix} \right\} \quad (7-2)$$

となる。よって、磁気双極子がつくる磁場の大きさ  $B_{\text{local}} = |\mathbf{B}_{\text{local}}|$  は、

$$B_{\text{local}} = |\mathbf{B}_{\text{local}}| = \sqrt{B_x^2 + B_y^2 + B_z^2} = \frac{\mu_0 m_z}{4\pi r^3} \sqrt{1 + \frac{3z^2}{r^2}} \quad (7-3)$$

となる。よって、磁場勾配の  $z$  成分は、

$$(\nabla B_{\text{local}})_z = \frac{\partial B_{\text{local}}}{\partial z} = \frac{\mu_0 m_z}{4\pi r^3} \left\{ -\frac{3x}{r^5} \sqrt{1 + \frac{3z^2}{r^2}} + \frac{3z}{r^5} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{3z^2}{r^2}}} \left(1 - \frac{z^2}{r^2}\right) \right\} \quad (7-4)$$

と書ける。

図 7-3 は、上記の式を用いて計算された磁場勾配の  $z$  成分の空間分布を示している。磁場勾配の強さが同じ領域を等高線で結んでいる。この図を見ると、 $z$  軸方向から 35.3 度傾いた方向で、磁場勾配が 0 となるマジックアングルが存在することが分かる。つまり、磁場勾配の符号をまたぐ領域に溶液試料が搭載されるような容器を作ると、試料の中に磁場勾配力が正にはたらく部分と負にはたらく部分が出来てしまい、磁場勾配力を打ち消してしまう。したがってマジックアングルに対応する両角 70.6 度の円錐型セルを作ることが出来れば、すべての試料にかかる磁場勾配力の正負を一致させることが可能であり、効率的に試料の磁化をメンブレンの変位に変換することが出来る。しかし、両角 70.6 度に近いドリルもしくはエンドミルが研究室には存在しなかったため、本研究で

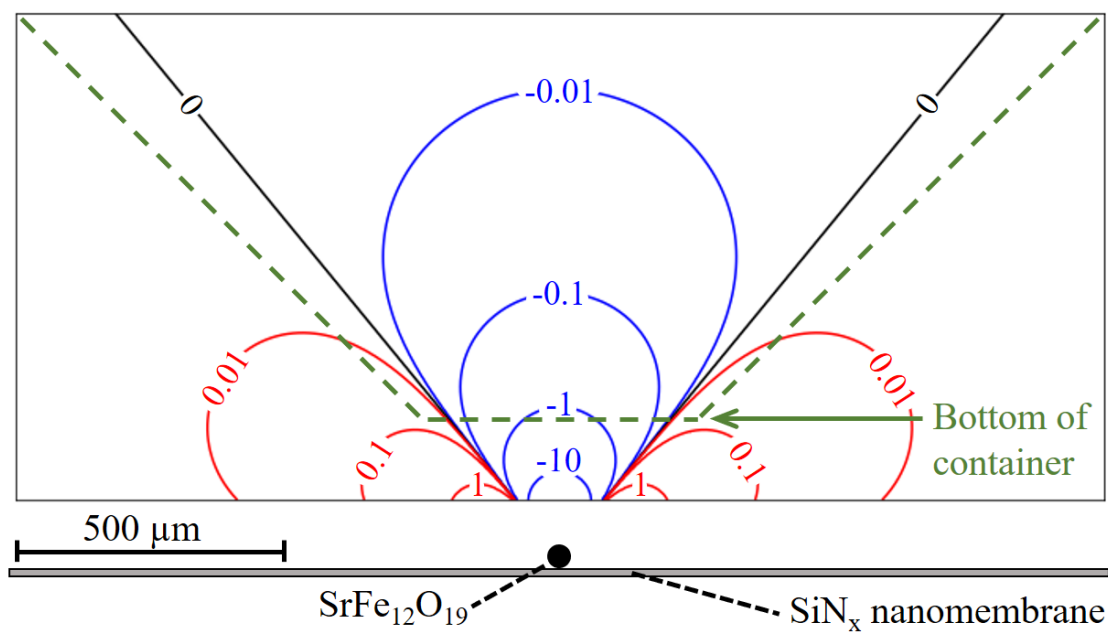


図 7-3 直径 40  $\mu\text{m}$  のフェライト磁石の中心から 250  $\mu\text{m}$  上方に溶液セルの底がくると仮定した場合の、フェライト磁石が作る磁場勾配の等高線プロット。

は両角 90 度のエンドミルで真鍮材を切削し溶液セルを作成した。図 7-3 中の点線は、メンブレン表面から 250  $\mu\text{m}$  上方に容器セルの底が来るとして描いた溶液セルの形状を表している。容器の壁に近い部分だけ磁場勾配の符号が正になってしまったが、溶液セル内のほとんどの領域において磁場勾配の符号を負に一致させることが出来た。したがって、溶液セル内の試料の大部分は、一定の向きに力を受けることが分かる。磁場勾配の大きさは、勾配磁石との距離の 4 乗で減衰するため、容器底部の近くに配置された試料ほど強く信号に寄与することが予想される。

図 7-3 に示すようにメンブレンと溶液セルの位置関係を仮定したとき、容器底部の位置における磁場勾配はおおよそ 3.4 T/m である。その結果、容器底部から上方 1 mm 以内の範囲における磁場分布（磁場の大きさの変化量）は 0.24 mT 未満であり、磁場の均一性が空間的に十分に保たれていると言える。この磁場勾配の大きさは、一般的な MRFM の装置で発生させる磁場勾配 ( $10^5$  T/m 程度) よりもはるかに小さい値である[6.2, 6.4]。磁場勾配が大きいと、試料内部に共鳴スライスを生むことが出来、いわゆるイメージングが可能となるが、ESR スペクトルの実効的な線幅が広がってしまう。そのため、ESR 信号の線幅が試料の持つ本来の線幅から広がってしまい、スペクトルの分解能が低下する。一方、本研究では磁場勾配の影響は無視出来るほど小さく、線幅が広がってもせいぜい 0.1 mT 程度なのでスペクトルの形状を議論する上で問題にはならない。第六章のカンチレバーを用いた手法では、磁場勾配を  $10^3$  T/m 程度発生させていたので、ESR スペクトルが 10 mT のオーダーで広がってしまっており、強磁場・テラヘルツ ESR 測定の利点である高分解能性を有効活用出来ていなかったことになる。本研究では意図的に磁場勾配が小さくなるようフェライト磁石  $\text{SrFe}_{12}\text{O}_{19}$  を勾配発生用磁石として選定したことにより、高いスペクトル分解能を維持している点が大きな特徴である。

### 7-2.3 測定試料の作製

本研究では、ヘミンクロライドとアコメトミオグロビンの溶液を EPR 測定試料として使用した。ヘミンクロライドについては、Sigma Aldrich から購入した

粉末試料を、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、50 mM の濃度に調製した。アコメトミオグロビンについては、マッコウクジラミオグロビンを大腸菌 (*Escherichia coli*) により発現することで大量培養し、過去の文献の方法に従って精製した[7.8]。アコメトミオグロビンの培養方法の詳細は Appendix-2 に書いた。作製したアコメトミオグロビンは 50 mM リン酸緩衝液 (pH = 6.9) 中に溶かし、最終的に 8.8 mM のアコメトミオグロビン溶液試料を調製した。ヘミンクロライド、アコメトミオグロビンいずれにおいても磁性イオンは  $\text{Fe}^{3+}$  で高スピン状態 ( $S = 5/2$ ) である。

## 7-2.4 ESR の緩和時間に依存しない ESR 検出原理の提案

強磁場・テラヘルツ ESR 測定は、線幅が数 T に及ぶような ESR スペクトルを持つスピン系に対して非常に有効である。低磁場・低周波数における ESR 測定では線幅が広過ぎるために明瞭な吸収波形が観測出来ない場合でも、強磁場・高周波数領域で ESR 信号を観測すれば、スペクトルの全貌を観測することが出来る。このような線幅の非常に広いスピン系は、遷移金属イオン同士の交換相互作用が強い反強磁性体やフラストレーション磁性体などでしばしば観測される。

広い吸収スペクトルは、ESR の緩和時間が非常に短いことを意味しており、磁性体などではおよそ 1 ns 以下のオーダーである。力検出型 ESR 測定法では、外部磁場方向 (z 方向) の磁化変化  $\Delta M_z$  を読み取ることで ESR 信号を観測している。2-34 式より Bloch 方程式から導かれる ESR 吸収に伴う磁化変化  $\Delta M_z^{\text{Bloch}}$  は、

$$\Delta M_z^{\text{Bloch}} = -M_z^0 \frac{\gamma^2 B_1^2 \tau_1 \tau_2}{1 + \gamma^2 B_1^2 \tau_1 \tau_2} \quad (7-5)$$

と書ける。これを変形し、 $|\Delta M_z^{\text{Bloch}}/M_z^0|$  の形にすると、

$$\left| \frac{\Delta M_z^{\text{Bloch}}}{M_z^0} \right| = \frac{1}{1 + \frac{1}{\gamma^2 B_1^2 \tau_1 \tau_2}} \quad (7-6)$$



となる。右辺を見ると、磁化変化は緩和時間に依存し、 $\tau_1$  や  $\tau_2$  が大きいほど、すなわち緩和時間が長いほど、大きくなることが分かる。例えば DPPH 中のラジカルなど孤立したスピン系では、緩和時間は ns から  $\mu\text{s}$  のオーダーである。DPPH の場合、 $\tau_1 = 70 \text{ ns}$ 、 $\tau_2 = 200 \text{ ns}$  程度であり、電磁波の振動磁場  $B_1 = 10^{-6} \text{ T}$  を仮定すると[7.9]、 $|M_z^{\text{Bloch}}/M_z^0|$  は  $4 \times 10^{-4}$  程度となる ( $g \sim 2$  として磁気回転比  $\gamma = 2\pi g\mu_B/h \sim 1.76 \times 10^{11} [\text{rad} \cdot \text{Hz/T}]$  を用いた)。しかし、反強磁性体などのように緩和時間が 1 ns 以下となる場合、 $\tau_1 = \tau_2 = 1 \text{ ns}$  とすると  $|M_z^{\text{Bloch}}/M_z^0|$  は  $3 \times 10^{-8}$  程度となり、DPPH と比べると磁化の変化が極めて小さくなることが分かる。このように、ESR による磁化の飽和現象を観測するという方法では、力検出型 ESR 測定法を緩和時間の短い系に対して応用することが原理的に難しい。

本研究ではこの問題を解決するための新しい ESR 検出原理のコンセプトについて説明する。これまでの方法では、ファラデー法を利用して、Bloch 方程式に従う磁化の飽和現象を観測することで ESR 信号を検出していた。一方、新しい方法では、スピン系のエネルギー緩和に伴う試料の温度変化によって生じる磁化の変化に着目した。このわずかな温度変化を試料の磁化変化として効率的に変換することで、それぞれの試料が固有に持つ緩和時間に依存しない ESR 測定を可能にする。

図 7-4 にその概念図を示す。試料は熱浴に接触した状態でセットされており、スピン系が磁場中で ESR 吸収をしている状況を考える。ここで、ESR 吸収に伴う格子系への緩和が十分に速く起こる場合を考えると、スピン系の温度  $T_{\text{spin}}$  は格子系の温度  $T_{\text{sample}}$  と常に一致していると見なせる ( $T_{\text{sample}} = T_{\text{spin}}$ )。電磁波を AM 変調しながら試料に照射すると、ESR 時にスピン系が吸収する電磁波強度  $P(t)$  は、

$$P(t) = \frac{P_a}{2} (1 - \sin \omega_{\text{AM}} t) \quad (7-7)$$

と表される。ここで、 $P_a$  は吸収した電磁波の振幅を表し、 $\omega_{\text{AM}}$  は AM 変調の周波数  $\omega_{\text{AM}} = 2\pi f_{\text{AM}}$  である。ESR 吸収後、緩和プロセスによって電磁波のエネルギーはスピン系から格子系へ直ちにエネルギー緩和する。このとき、格子系に

流入した熱エネルギーは周囲の熱浴との接触により、ある時定数  $\tau_{th}$  をもって熱浴へ放出される。この時定数は熱浴との接触の程度に依存するパラメータである。

このようなエネルギーの緩和プロセスを想定すると、試料温度の変化量  $\Delta T$  は、次の微分方程式

$$\frac{d}{dt}\Delta T = -\frac{1}{\tau_{th}}\Delta T + \frac{P_a}{2C}(1 - \sin \omega_{AM}t) \quad (7-8)$$

で表すことが出来る。ここで、 $C$  は試料の比熱である。この微分方程式を解析的に解くと、

$$\Delta T = \tau_{th}p \left\{ 1 - \frac{\sin(\omega_{AM}t - \varphi)}{\sqrt{\omega_{AM}^2\tau_{th}^2 + 1}} - \left( 1 + \frac{\omega_{AM}\tau_{th}}{\omega_{AM}^2\tau_{th}^2 + 1} \right) e^{-\frac{t}{\tau_{th}}} \right\} \quad (7-9)$$

と書ける。ここで、 $p = P_a/2C$ 、 $\varphi = \arctan(\omega_{AM}\tau_{th})$  である。図 7-5 に、様々な変調周波数における  $\Delta T/\tau_{th}p$  の時間変化を示した。この図や 7-9 式から分かるように、 $t \rightarrow \infty$  の極限では、 $\Delta T$  は  $\tau_{th}p$  を平均値として時間的に振動することが分かる。

多くの場合、磁性体試料の磁化が温度に依存することを考慮すると、試料の磁化は、次式で書ける値を振幅として時間的に変調されると考えることが出来る。

$$\Delta M_z^{th} = \left| \frac{dM}{dT} \right| \frac{\tau_{th}p}{\sqrt{\omega_{AM}^2\tau_{th}^2 + 1}} \quad (7-10)$$

ここで、熱的な起源による磁化変化であることを表すために、 $\Delta M_z$  の添え字に th (= thermal) を入れて、7-3 式の Bloch 方程式から導かれる ESR 吸収に伴う磁化変化  $\Delta M_z^{Bloch}$  と区別した。したがって、7-10 式より  $\omega_{AM}\tau_{th}$  が小さくなれば、 $\Delta M_z^{th}$  の振幅が大きくなり、検出される ESR 信号も増大する。 $\omega_{AM}\tau_{th}$  を小さくするには  $\tau_{th}$  を小さくするために熱浴 (CuBe 板や試料接着用のグリース等) と試料の間に強い熱的接触を取り、 $\omega_{AM}$  を小さくするために変調周波数を低く設

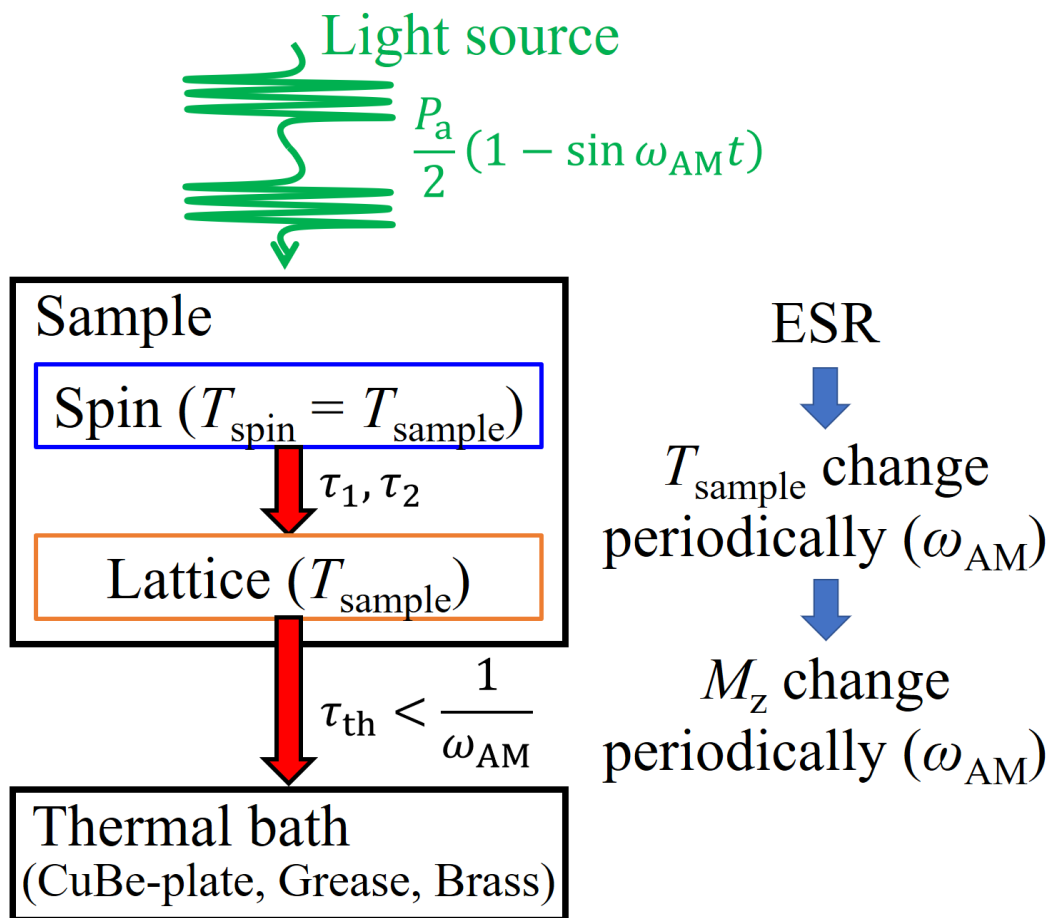


図 7-4 試料の温度変化を介した磁化の変化として ESR を検出する方法の概念図。AM 変調をかけているため、ESR 吸収時には周期的な試料の温度変化が起こり、それが周期的な磁化の変化に変換されるため、ESR を検出することが出来る。

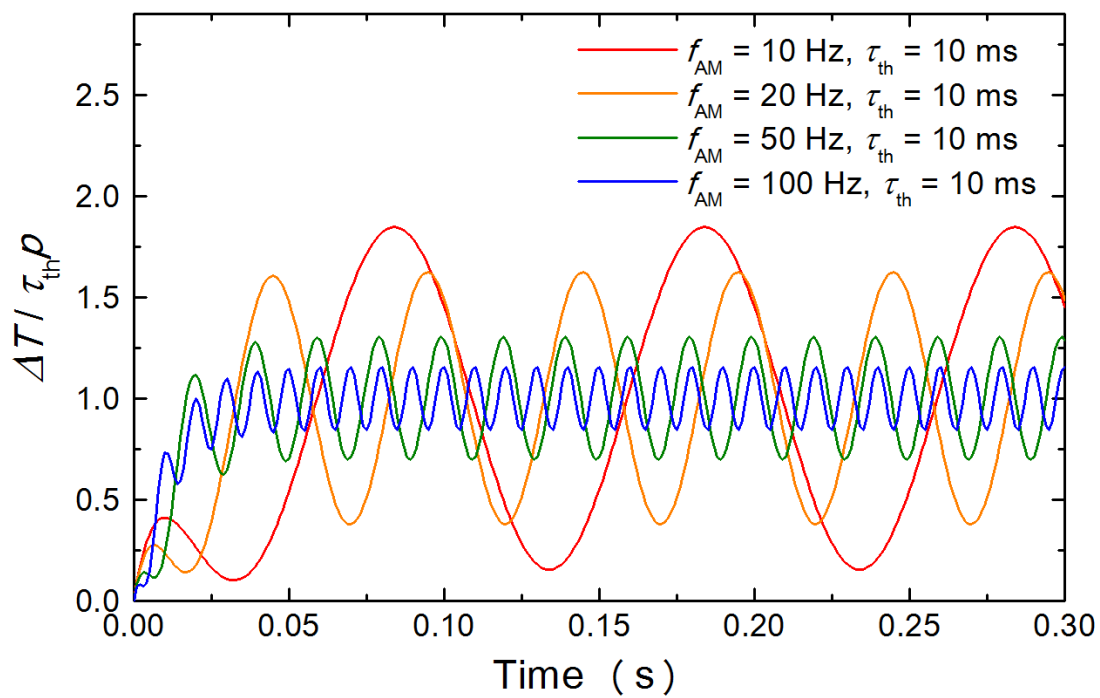


図 7-5 7-9 式に従うモデルを考えた場合の試料温度の時間変化。縦軸は規格化してある。

定すると良いことが分かる。

このように ESR 緩和プロセスに伴う試料の温度変化を磁化の変化として捉えることで、ESR 信号をメンブレンにかかる力として検出することが出来る。この式に従う場合、測定温度付近で対象試料の磁化率の温度変化に対する傾きがゼロでなければどのような試料でも ESR 観測が可能であり、緩和時間  $\tau_1$  や  $\tau_2$  が非常に短い系であっても ESR 信号強度を稼ぐことが出来る。次節において、このコンセプトによる力検出型 ESR 測定が有効であるかどうかを、DPPH 粉末に対する ESR 測定によって実証する。その後ヘミンクロライドとアコメトミオグロビンの凍結溶液試料への応用結果について議論する。

## 7-3 実験結果と考察

### 7-3.1 DPPH の ESR 測定結果と開発した装置の評価

初めに、本研究で開発した ESR 測定装置の評価を行った。試料としては ESR 標準試料の DPPH 粉末を用いた。そのため、溶液セルを使用しない図 7-2 のようなセットアップを使用し、CuBe 板に DPPH の粉末を貼り付ける形で試料をセットした (図 7-6)。粉末試料は、真空引きの際などに CuBe 板から飛んでいかないよう、シリコン製の真空グリースを少し混合させて測定に用いた。

次に、図 7-7 に 120 GHz、240 GHz、370 GHz における DPPH 粉末の ESR 測定の結果を示す。AM 変調周波数は 13 Hz である。これら三種類の周波数全てで ESR スペクトルを観測することに成功した。注目すべき点は、370 GHz で ESR 信号を十分な S/N で観測出来た点である。カンチレバーを用いた ESR 測定においては、10 T を超えるような強磁場領域ではカンチレバーの変位が大き過ぎるために Fabry-Perot 干渉計の干渉強度が十分に得られず ESR 測定が困難であった。しかし、メンブレンの場合は中央の変位が常にメンブレンに対して垂直方向であるため、Fabry-Perot 干渉計の平行度が悪化せず、13 T という強磁場でも非常に安定した ESR スペクトルを得ることが出来た。図 7-8 に、得られた結果から求めた ESR 吸収ピークの共鳴磁場と周波数の関係を示す。DPPH の  $g$  値は 2.0036 と知られているが [7.10]、最小二乗法によるフィッティングの結果、

観測した吸収ピークの  $g$  値は  $2.0012 \pm 0.0078$  と見積もられ、誤差の範囲内に収まっているため、確からしい結果が得られたと考えている。

ここで、図 7-7 の ESR スペクトルの線幅について議論する。本研究では磁場勾配を試料空間に発生させているため、得られる ESR スペクトルの線幅が試料の本質的な線幅よりも広がる可能性がある。図 7-7 の ESR スペクトルの線幅は、120 GHz で 2.3 mT、240 GHz で 6.0 mT、370 GHz で 13 mT であった。DPPH の線幅は、製造過程でどのような溶媒に溶かしたかによって線幅が変わることが知られている。実際、他の研究グループの ESR 測定において、93 GHz での線幅が 2.5-3.0 mT と見積もられた報告や[7.10]、250 GHz で 4.8 mT と見積もられた報告がある[7.11]。その一方で、500 GHz において 1 mT 未満と見積もられた結果も報告されており[7.12]、DPPH 粉末の線幅は文献によって異なっている。

この測定ではメンブレン上の勾配用磁石と DPPH 粉末の距離がおよそ 250  $\mu\text{m}$  であり、図 7-3 より DPPH 試料における磁場勾配の値はおよそ 3 T/m と見積もられた。DPPH 粉末は、CuBe 板に薄く貼り付けており  $z$  軸方向の厚みは 1 mm 未満であった。そこで仮に試料の厚みを 1 mm とすると、試料内部に生じる磁場分布はおよそ  $\sim 3 \text{ T/m} \times 1 \text{ mm} = 3 \text{ mT}$  程度となる。

カンチレバーを用いた測定では、Dy 磁石を用いて 2-3 桁も大きな磁場勾配 (100-1,000 T/m) を発生させていたため、線幅の広がりが大きく ESR スペクトルが歪んでしまった。その結果、カンチレバーを用いた測定では高分解能 ESR のメリットが打ち消されていたと言える。一方、本研究においては意図的に磁場勾配の値を小さくしたことでそのような ESR スペクトルの歪みが DPPH のような線幅の狭い試料でも無視出来るほど小さい。したがって、反強磁性体などスピン間の交換相互作用が強い系やヘム鉄錯体、ヘムタンパク質等、遷移金属イオンを含む試料の ESR スペクトルなど、数 T オーダーの範囲に ESR スペクトルが期待される実験では、フェライト磁石の作る磁場勾配が ESR スペクトルの形に与える影響はほとんどないと言って良い。

表 7-1 に、図 7-7 の結果から得られた各周波数におけるスペクトルの S/N、線幅、測定感度を示す。どの周波数においても測定感度は  $10^{12}$  spins/gauss 程度と見積もられた。このようにメンブレンを用いることで、どの周波数・磁場領域においても高い測定感度を維持しつつ ESR 測定を行うことが可能になった。

120 GHz の光源の出力が 36 mW であるのに対して、240 GHz や 370 GHz の出力はそれぞれ 2 mW、10 mW と低いにも関わらず、測定感度は 120 GHz よりも 240 GHz や 370 GHz の方が良いことが分かる。その理由の一つとして、同じ電磁波強度に対する ESR 吸収強度は強磁場・高周波数であればあるほど増大するため、電磁波強度の低下と吸収強度の増大の効果が打ち消しあった可能性が挙げられる。また、ライトパイプ先端に取り付けられている円錐型のホーンの出口で周波数に依存した減衰が起きている影響が挙げられる。低周波数領域であればあるほど回折の効果が大きく入射した電磁波が楔形のホーン入り口で反射している可能性がある。これらの複数の原因が重なり、測定感度が単純に光源の出力に比例しない結果になったと考えている。

次に、測定のノイズレベルについて議論する。ESR 測定中は電磁波に AM 変調をかけているため、ESR が起こっていない時もメンブレンの振動を引き起こすと考えられる。そのため、磁場掃引を行うと、その振動の振幅は電圧のオフセットとしてロックインアンプで検出され、ESR スペクトルのベースラインを与える。その結果、ESR 吸収時にはオフセットレベルからの変化として ESR を検出することが出来る。

図 7-7 の縦軸は読み取った電圧値をメンブレンの振動の振幅に書き換えて表している。ESR が起きていない時、ロックインアンプで読み取る電圧はおおよそ一定であるが、時間的に揺らいでいることが分かる。ロックインアンプの時定数は 1.0 s に設定して測定しており、この場合におけるベースラインのノイズの振幅は 3 pm と見積もられた。そのため 3 pm 以下の変化はノイズに埋もれてしまう。

ベースラインのノイズの原因として、有限温度において発生する熱振動によるノイズが考えられる。調和振動子のポテンシャルエネルギーは  $kx^2/2$  で表されることから、温度  $T$  で、調和振動子の基準振動周波数における熱振動  $x_{th}$  は、

$$x_{th} = \sqrt{\frac{k_B T}{k_m}} \quad (7-11)$$

と表される。メンブレンのバネ定数を  $k_m = 10 \text{ N/m}$ 、温度を  $T = 4 \text{ K}$  とすると、熱振動は  $x_{th} = 1 \text{ pm}$  程度となる。従って、3 pm というメンブレンのノイズレベ

ルは、この測定において熱振動によるノイズが支配的であることを意味している。電磁波がメンブレンに直接照射されないよう CuBe 板で遮蔽したことにより、Photothermal 効果によるスプリアスノイズを低減したことなどが効いていると考えられる。

フェライト磁石搭載時のメンブレンの固有振動数は  $f_{load} = 1\text{-}3\text{ kHz}$  程度であり、また Q 値は 1 程度である。図 7-7 の測定での変調周波数は 13 Hz に設定しており、固有振動数から十分離しているため、13 Hz における熱振動は 1 pm 未満のオーダーであると予想される。そのため、熱振動よりも数 pm 大きなノイズ幅となっている結果は、おそらく外的な要因に起因する pm オーダーの振動によるものであると考えられる。その原因としては、実験中の音による音響振動、足音や建物の振動に起因する機械的振動や、光ファイバー自体の振動による光強度の変動など、取り除きにくい要因が考えられる。また、試料空間には試料温度を安定化するため熱交換ガス（ヘリウムガス）が封入されていることに加え、メンブレンと CuBe 板の間に 1 mm 以下の小さい隙間がある。そのため、電磁波の AM 変調により周期的に温度変化する CuBe 板が、隙間のヘリウムガスを介してメンブレンに熱的な振動を励起している可能性がある。また、こうしたノイズの大きさは、フェライト磁石の形状、接着剤の搭載量、接着剤とフェライト磁石の接着の仕方、Fabry-Perot 干渉計の構成条件など、様々なセットアップの条件に関係していることが分かった。

本研究では、メンブレンを用いることでベースラインの磁場掃引に対する高い安定性を実現した。その結果、高い感度、高い S/N、高いベースライン安定性を同時に満たす強磁場・テラヘルツ ESR 測定が可能になった。その結果、従来の透過法では不可能であった 100  $\mu\text{m}$  オーダーサイズの微小な単結晶試料一個の ESR 測定が可能になった。特に、その高いベースライン安定性から広い磁場範囲の測定やブロードな信号に対する検出感度が向上した。その応用例としてカゴメ格子反強磁性体の反強磁性共鳴モードの観測にも成功し、反強磁性ギャップを見積もることに成功している。さらに粉末のヘミンクロライドの ESR 測定も行っており、ゼロ磁場分裂間の ESR 遷移 ( $\alpha$  モード、 $\beta$  モード) の観測に成功している。詳細は Appendix-5 に示す。



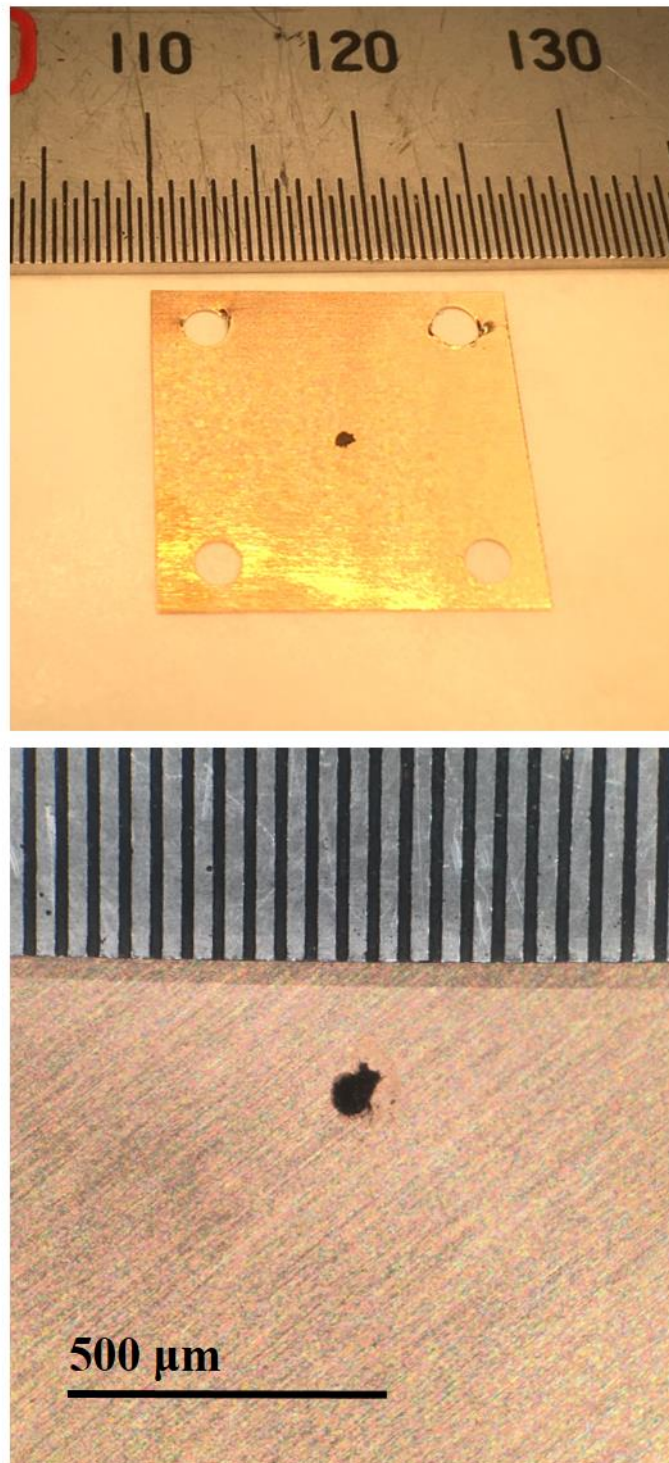


図 7-6 20  $\mu\text{g}$  の DPPH を CuBe 板の中心に搭載した様子。下の図は上の図を拡大したものである。

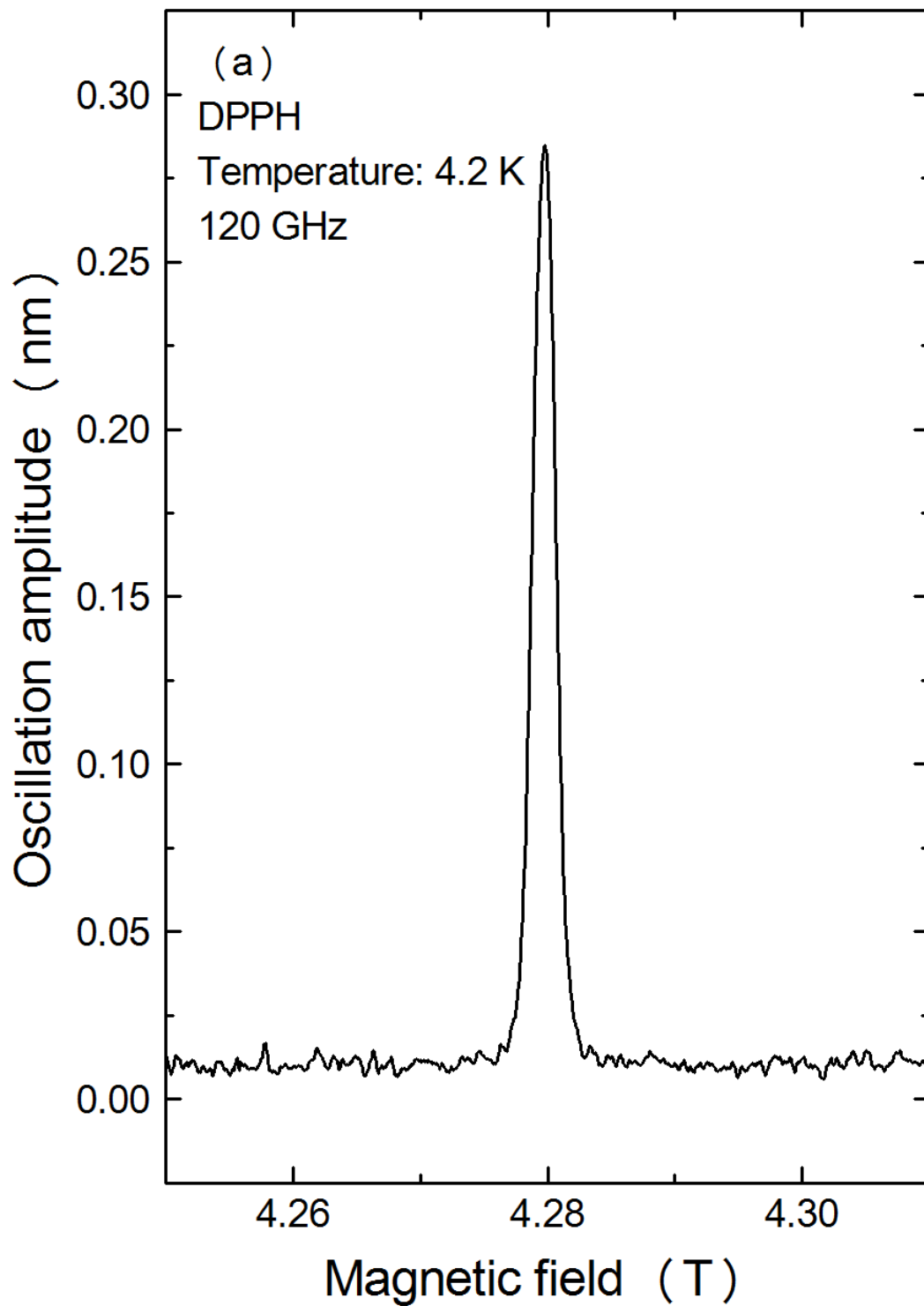


図 7-7(a) 120 GHz、4.2 K における DPPH の ESR 測定結果。AM 変調周波数は 13 Hz である。磁場掃引速度は 0.01 T/min、ロックインアンプの時定数は 1.0 s である。

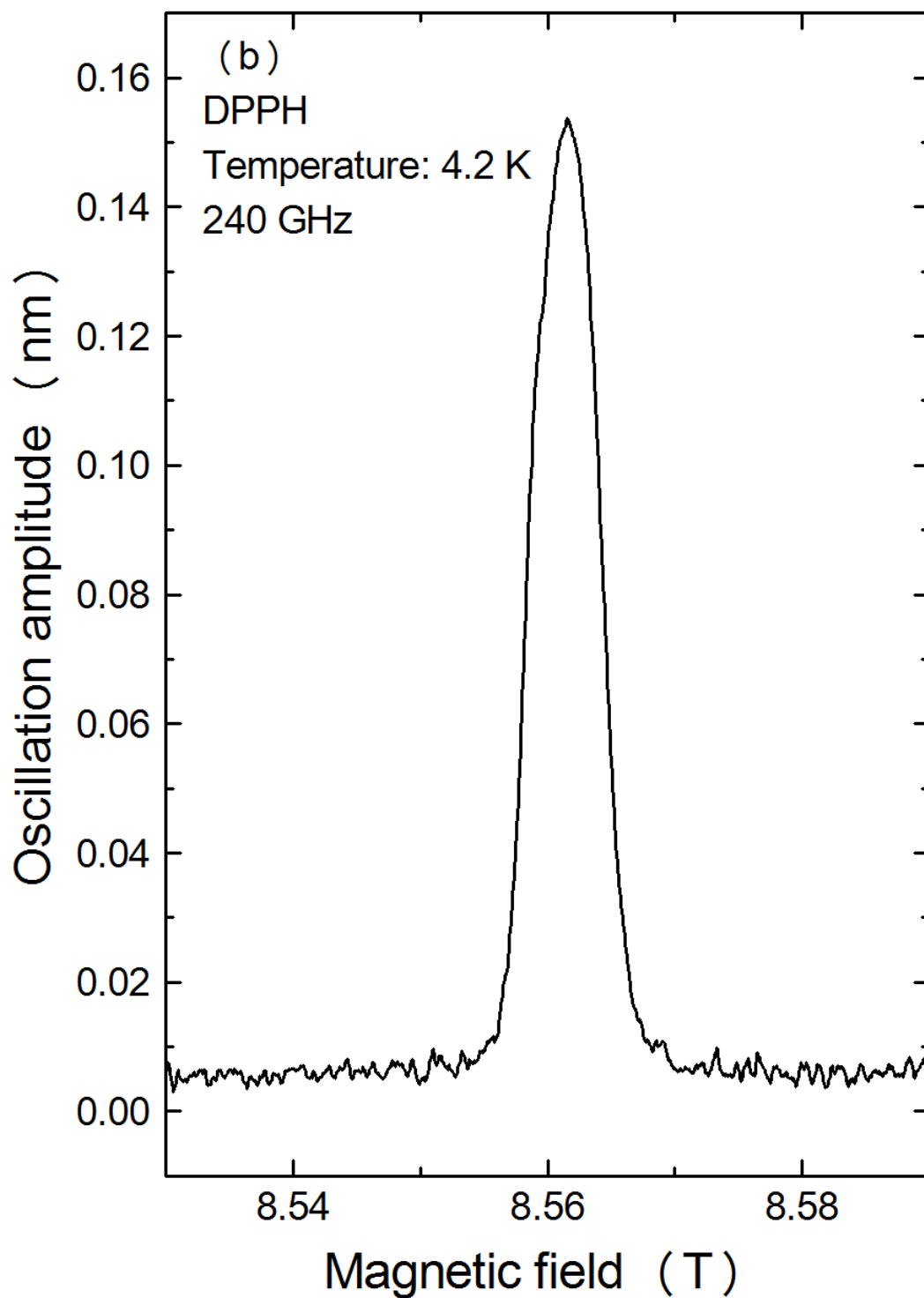


図 7-7(b) 240 GHz、4.2 K における DPPH の ESR 測定結果。AM 変調周波数は 13 Hz である。磁場掃引速度は 0.01 T/min、ロックインアンプの時定数は 1.0 s である。

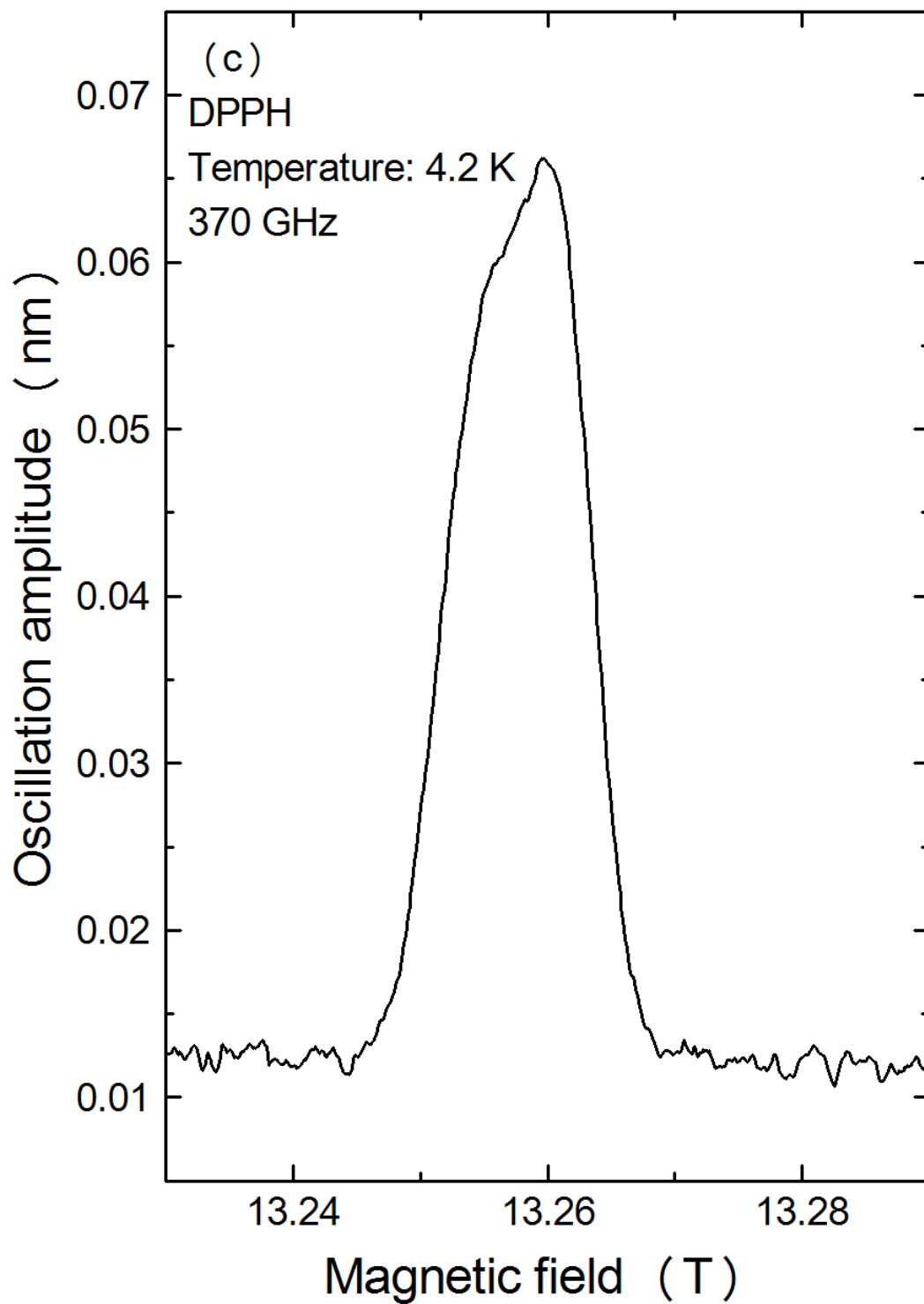


図 7-7(c) 370 GHz、4.2 K における DPPH の ESR 測定結果。AM 変調周波数は 13 Hz である。磁場掃引速度は 0.01 T/min、ロックインアンプの時定数は 1.0 s である。

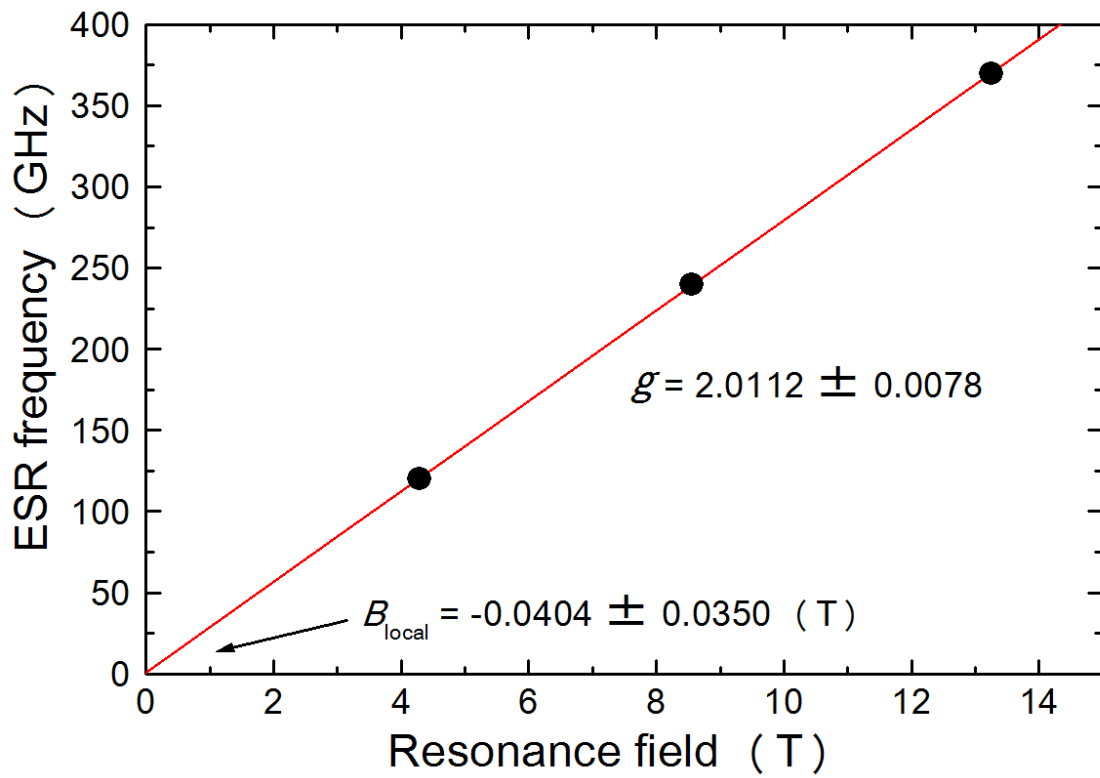


図 7-8 図 7-7(a)-(c)までの結果から求めた ESR 吸収ピークの共鳴磁場と周波数の関係。

表 7-1 図 7-7 の結果から得られた各周波数における ESR 信号の信号雑音比 (S/N)、線幅および得られたスピン感度。

<b>Frequency (GHz)</b>	<b>S/N</b>	<b>Linewidth (mT)</b>	<b>Sensitivity (spins/gauss)</b>
120	210	2.3	$6.4 \times 10^{12}$
240	140	6.0	$3.5 \times 10^{12}$
370	91	13	$2.4 \times 10^{12}$

### 7-3.2 新しい検出法の評価

次に、図 7-7 で示した DPPH の ESR 測定において、得られた信号が ESR の緩和プロセスに伴う試料の温度変化に起因した磁化変化  $\Delta M_z^{\text{th}}$  を検出していたのかどうかについて考察する。図 7-7 のデータは、AM 変調周波数を 13 Hz に設定して得られたものである。図 7-9 に測定周波数は 120 GHz に固定し、様々な AM 変調周波数に対して行った DPPH の ESR 測定の結果を示す。縦軸は図 7-7 と同様、ロックインアンプで読み取った電圧値から算出したメンブレンの振幅を表している。この図より、変調周波数を高くするにつれてベースラインのオフセットが上昇しており ESR が起こっていない時の振幅は大きくなっているが、ESR が起こった際の振幅の増大率は小さくなっていることが分かる。ロックインアンプに入力される信号には、スプリアスノイズの振幅と ESR 吸収由来による振幅が混ざっている。そのため、両者の寄与の大きさを評価するために、ESR が起こった時の振幅を ESR が起こっていない時の振幅で割った値(比)で評価した。

図 7-10 の縦軸には両者の比を、横軸には変調周波数をとって示す。AM 変調周波数が高くなるにつれて両者の比は下がっていくことが分かる。図に示すように、この関係は次の関数でフィッティングすることが出来た。

$$\frac{\Delta V_{\text{ESR}}}{V_{\text{offset}}} \propto \frac{1}{\sqrt{\omega_{\text{AM}}^2 \tau_{\text{th}}^2 + 1}} \quad (7-12)$$

従って、信号強度は磁化変化  $\Delta M_z^{\text{th}}$  と変調周波数  $\omega_{\text{AM}}$  の関係を表す 7-10 式により記述することが可能であり、ESR 信号の起源として  $\Delta M_z^{\text{Bloch}}$  よりも  $\Delta M_z^{\text{th}}$  が支配的であることを示している。

本文中では 4.2 K 以下の測定結果のみ載せているが、他の試料の ESR 測定においては 1.5 K から 30 K までの温度範囲で ESR 測定に成功している。一般的に、物質の比熱  $C$  は物質の温度が高くなればなるほど大きくなる。7-10 式から分かるように、ESR に伴う試料の温度変化  $\Delta T$  は比熱  $C$  に反比例するので、測定温度が高くなれば  $\Delta T$  の振幅は小さくなってしまうと考えられる。また常磁

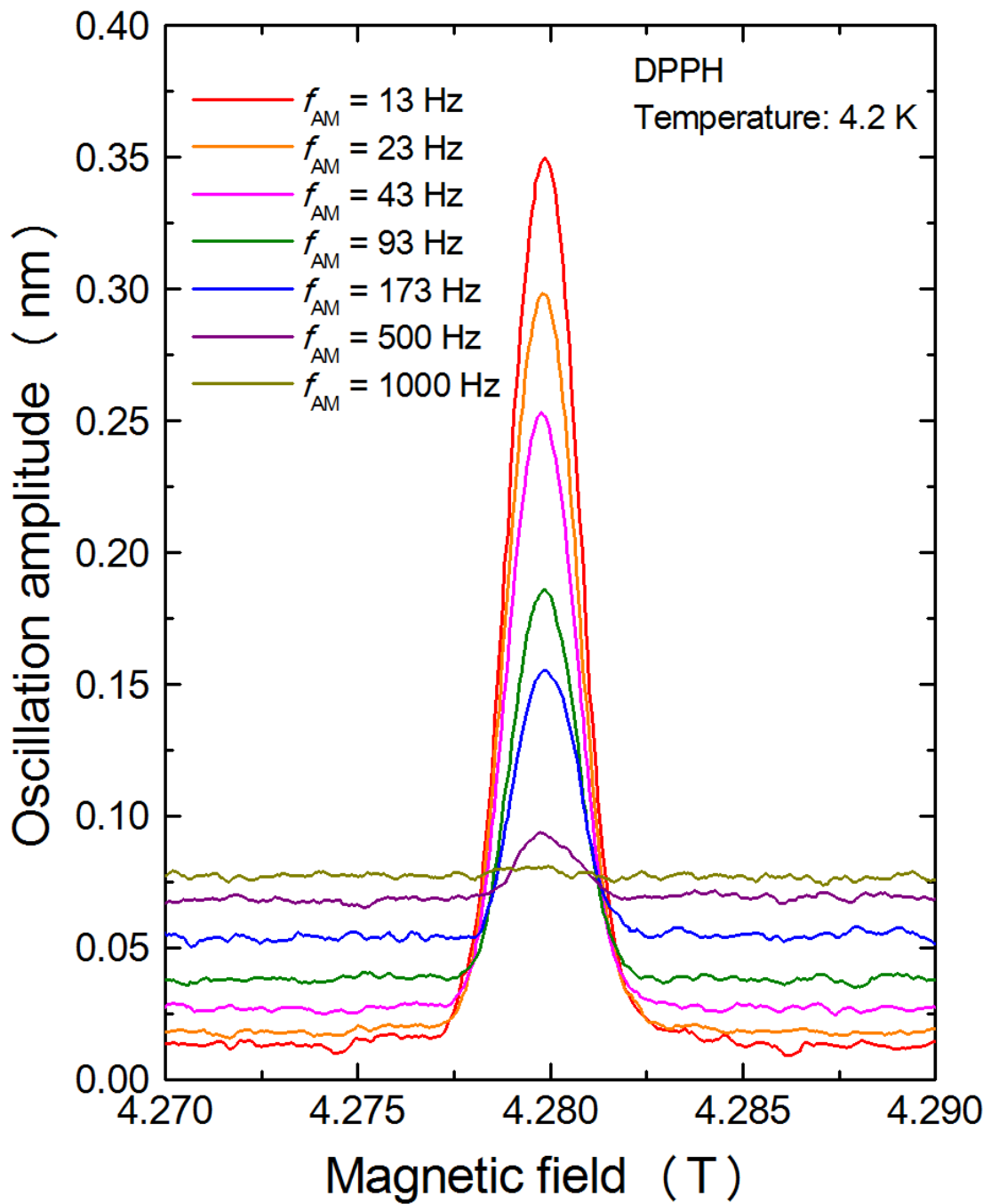


図 7-9 様々な AM 変調周波数において DPPH の ESR 測定を行った結果。測定周波数と測定温度はそれぞれ 120 GHz、4.2 K である。AM 変調周波数は 13 Hz である。磁場掃引速度は 0.01 T/min、ロックインアンプの時定数は 1.0 s である。



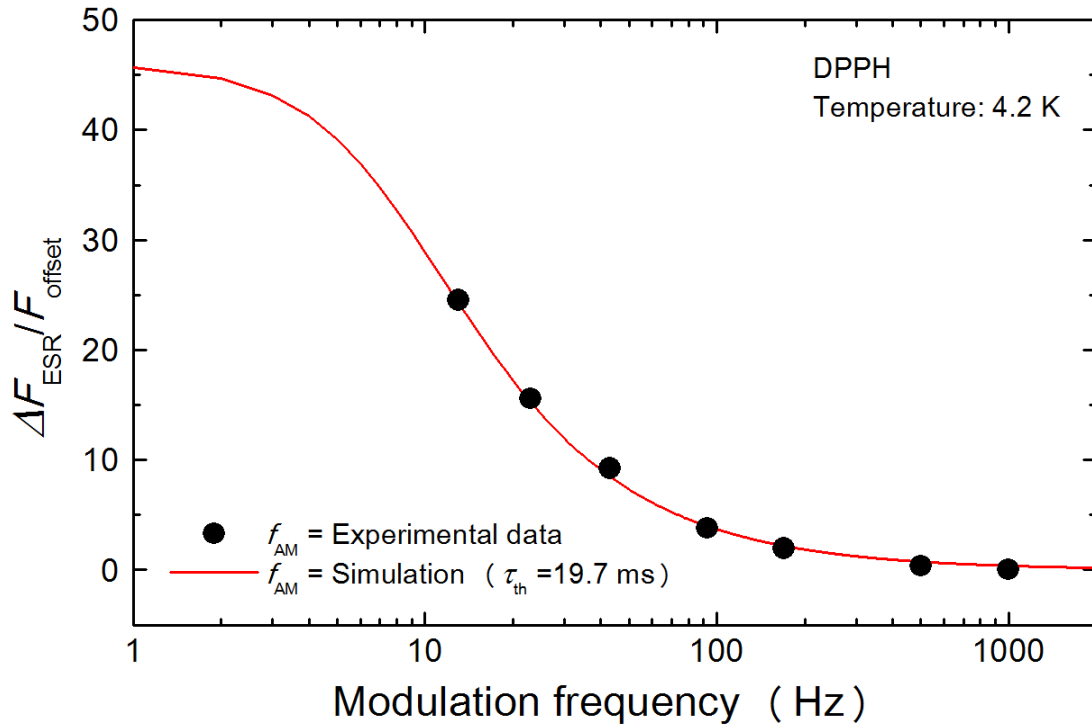


図 7-10 図 7-9 において、ESR が起きていない時のオフセット電圧と ESR が起きたときの電圧の変化量の比をとり、変調周波数依存性をプロットしたもの。実線は 7-12 式を仮定してシミュレーションした結果。

性体の場合、磁化の温度に対する変化率 $|dM/dT|$ は磁化率の温度依存性の傾きに対応しており、 $T^2$ に比例することから、高温域ほど $\Delta M_z^0$ は小さくなると考えられる。そのため熱的な検出方法では、常磁性体の場合測定温度が低温であればあるほど大きな ESR 信号を得ることが出来る。

### 7-3.3 溶液試料への応用結果

最後に、メンブレンを用いた力検出型 ESR 測定法を溶液試料に適用した結果について説明する。図 7-11(a)にヘミンクロライド溶液試料を溶液セル中に搭載した写真、また図 7-11(b)にアコメトミオグロビン溶液試料を溶液セル中に搭載した写真を示す。試料体積はヘミンクロライドについては  $5 \mu\text{L}$  ( $2.5 \times 10^{-7} \text{ mol}$ )、アコメトミオグロビンについては  $10 \mu\text{L}$  ( $8.9 \times 10^{-8} \text{ mol}$ ) であった。図 7-12(a)に、120 GHz におけるヘミンクロライドおよびアコメトミオグロビンの凍結溶液試料の EPR スペクトルを示す。また、図 7-12(b)に、337 GHz までの多周波数におけるヘミンクロライドの EPR 測定結果をまとめて示す。両方の図ともに、黒の実線で示したものは実験の生データ、赤の実線で示したものは EPR スペクトルのシミュレーションである。

まず、ヘミンクロライド溶液の EPR スペクトルについて説明する。図 7-12(b)に示すように、120 GHz から 337 GHz までの多周波数においてヘミンクロライドのパウダーパターンの EPR スペクトルを観測することに成功した。低磁場側のピークは、 $g_{\text{perp}}$  吸収に由来しており、外部磁場がヘム面内に印加された場合に観測される。一方、高磁場側に期待される  $g_{\text{para}}$  吸収は、外部磁場がポルフィリン面に垂直な方向に印加された場合に観測されるが、S/N 比が悪いためこの測定は  $g_{\text{para}}$  の肩が明瞭には観測されなかった。EPR スペクトルのシミュレーションは、1-7 式で表されるスピンハミルトニアンをもとに行った。第四章で得られたヘミンクロライドのスピンハミルトニアンパラメータ： $g_x = g_y = 1.93$ 、 $g_z = 2.05$ 、 $D = 6.90 \text{ cm}^{-1}$ 、 $|E| = 0.055 \text{ cm}^{-1}$  を用いて今回の実験結果を良く再現することが出来ている。

次に、アコメトミオグロビン溶液の EPR スペクトルについて説明する。本研究で EPR 測定を行ったのは 120 GHz だけであるが、酸化型ヘムタンパク質に特

有の EPR スペクトルを観測することに成功した。図 7-12(a)を見ると分かるように、アコメトミオグロビンの EPR スペクトルはヘミンクロライドのスペクトルとよく似ており、 $g_{\text{perp}} \sim 6$  で吸収のピークを持ち、 $g_{\text{para}} \sim 2$  にかけてゆるやかに吸収強度が減少していくパウダーパターンとなっている。

アコメトミオグロビンの EPR 活性部位であるヘム鉄イオンでは、ポルフィリン面内方向には四つの窒素原子が配位し、また軸配位子方向には水分子およびヒスチジン残基の N 末端が配位している。つまり軸配位子を除けばヘミンクロライドと同様の構造を有しており、ヘミンクロライドと同様の EPR スペクトルが観測される[1.14, 1.29]。ヘム鉄においては、 $\text{Fe}^{3+}$ イオン周囲の電子密度は主としてポルフィリン面内に広がる傾向にある。軸配位子方向の電子密度は軸配位子の種類や、タンパク質分子のアミノ酸残基の配位に影響を及ぼしうる周囲の構造に依存している。したがって、軸配位子の種類や置かれている局所環境が異なるために生じる電子密度分布のわずかな違いが物質ごとのゼロ磁場分裂定数  $D$  の大きさに反映される。

アコメトミオグロビンの  $D$  値については過去の多周波数での強磁場・テラヘルツ EPR 測定から  $9.47 \text{ cm}^{-1}$  と見積もられている[1.29]。図中の EPR スペクトルのシミュレーションは、過去の報告で得られているスピンハミルトニアンパラメータ： $g_x = g_y = 1.98$ 、 $g_z = 2.00$ 、 $D = 9.47 \text{ cm}^{-1}$ 、 $|E| = 0.026 \text{ cm}^{-1}$  を用いており、両者の間で良い再現性が得られたと考えている。

$g_{\text{perp}}$  吸収の先鋭さを比べると分かるように、アコメトミオグロビンの EPR 信号の線幅はヘミンクロライドの線幅よりも狭いことが分かる。アコメトミオグロビンについては、ヘムがアミノ酸側鎖に囲まれている上、ミオグロビン分子を構成する  $\alpha$  ヘリックス構造により隔離されている。そのため溶液中ではヘム同士の距離が十分離れている。その結果、ヘム鉄間の交換相互作用など磁氣的相互作用は無視出来るほど小さい。一方、ヘミンクロライドの場合、アミノ酸側鎖などヘム同士を隔壁する役割を担う構造を持たないため、ヘム鉄同士が比較的近い位置にくる。そのため、ヘム鉄同士にはたらく交換相互作用がある程度働くと考えられる。この交換相互作用については、exchange narrowing の効果よりも、緩和時間が短いことによる効果が効いていると考えられ、EPR スペクトルの線幅が広がる原因の一つであると考えている[5.38]。

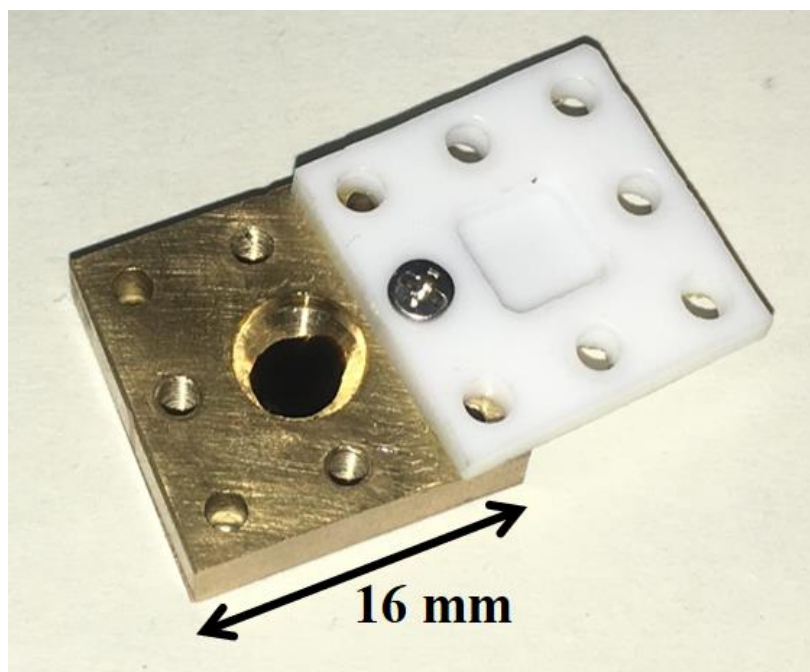


図 7-11(a) ヘミンクロライド溶液試料を溶液セル内に搭載した様子。テフロン（白）で蓋をすることにより、セットアップ中の溶媒の蒸発を防ぐ。

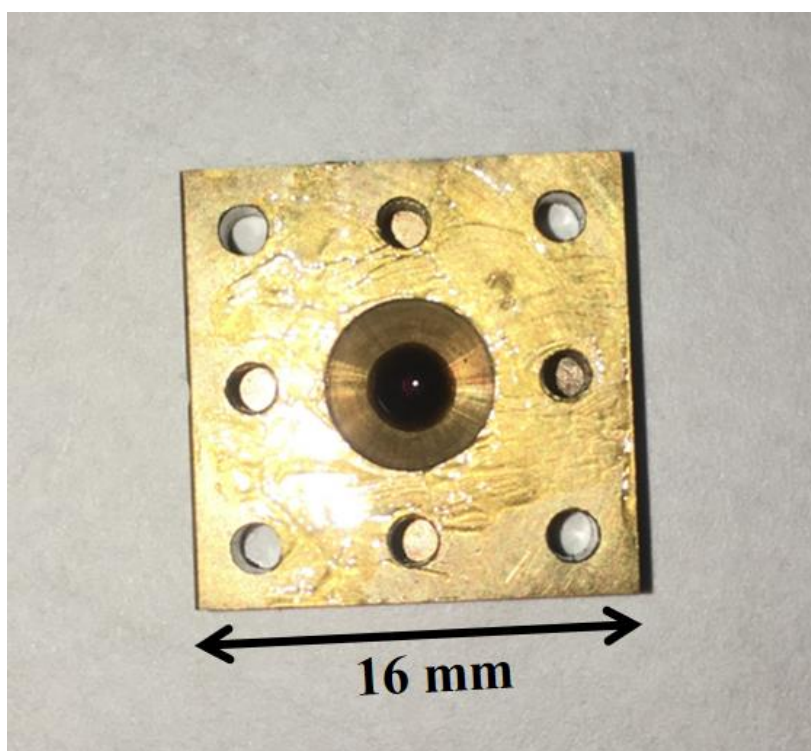


図 7-11(b) アコメトミオグロビン溶液試料を溶液セル内に搭載した様子。

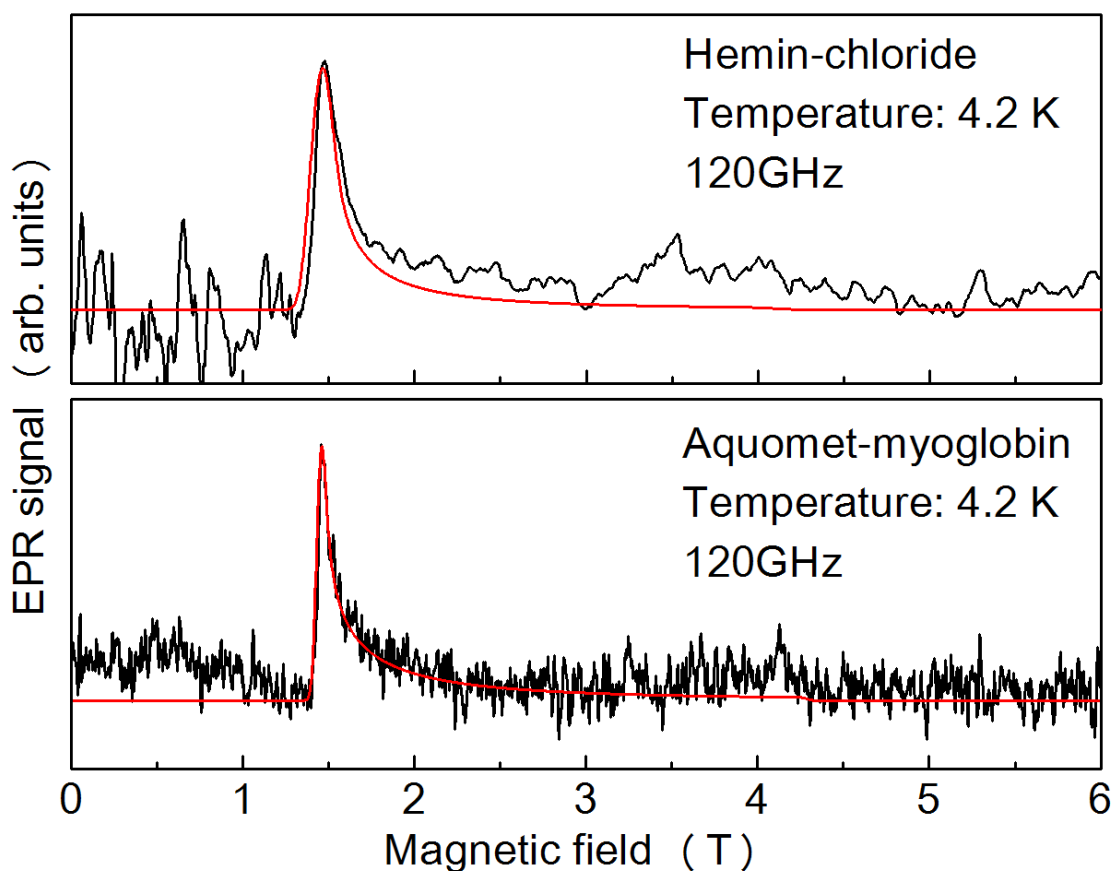


図 7-12(a) 120 GHz におけるヘミンクロライド溶液の EPR 測定結果 (上) とアコメトミオグロビン溶液の EPR 測定結果。磁場掃引速度はヘミンクロライドの場合 0.5 T/min、アコメトミオグロビンの場合 0.2 T/min で行った。PC 上でのデータ取得のインターバルは 0.3 s で統一しているため、アコメトミオグロビンのデータは磁場掃引速度が遅い分データポイント数が多い (つまりヘミンクロライドの結果は比較的粗い実験データに見えるが、スムージングなど補正を加えたわけではなく生データである)。黒の実線は実験データ、赤の実線は ESR スペクトルのシミュレーションである。スペクトルの線幅に着目すると、アコメトミオグロビンの方がヘミンクロライドより細いことが分かる。

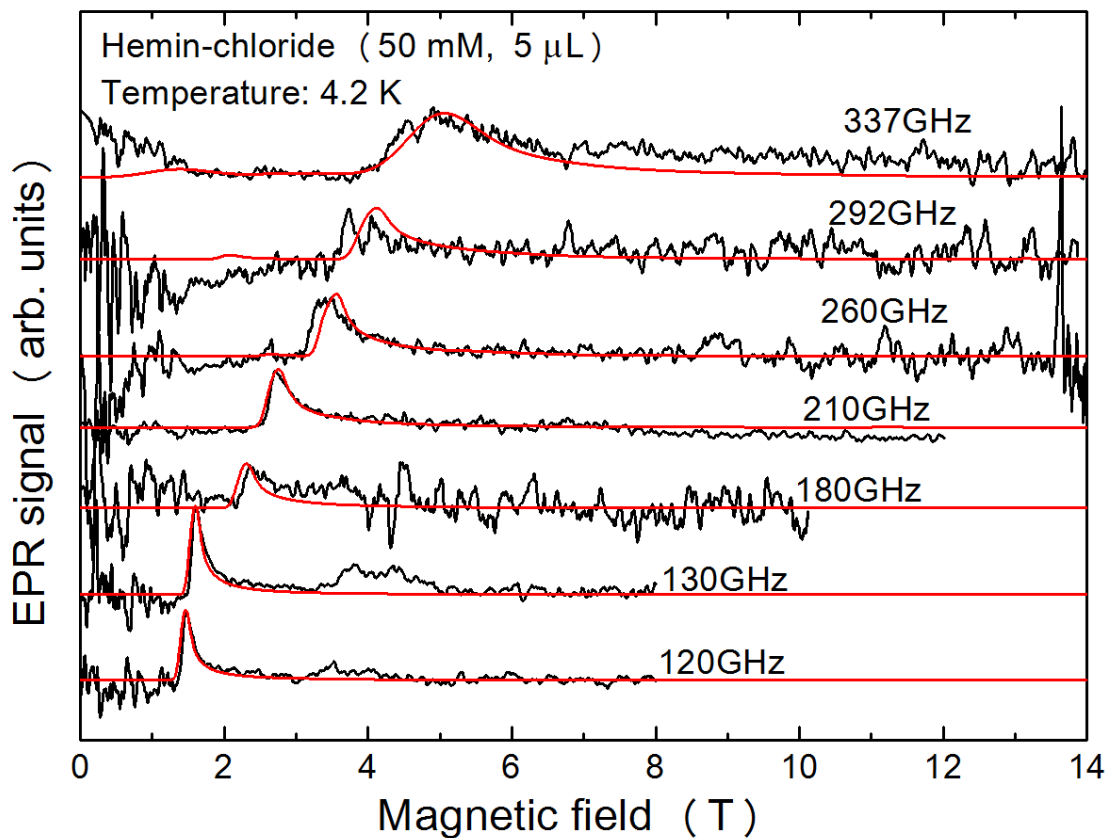


図 7-12(b) ヘミンクロライド溶液の 120 GHz から 337 GHz までの EPR 測定結果。AM 変調周波数は 7 Hz、磁場掃引速度は 0.5 T/min、ロックインアンプの時間定数は 1.0 s である。黒の実線は実験データ、赤の実線は EPR スペクトルのシミュレーションである。

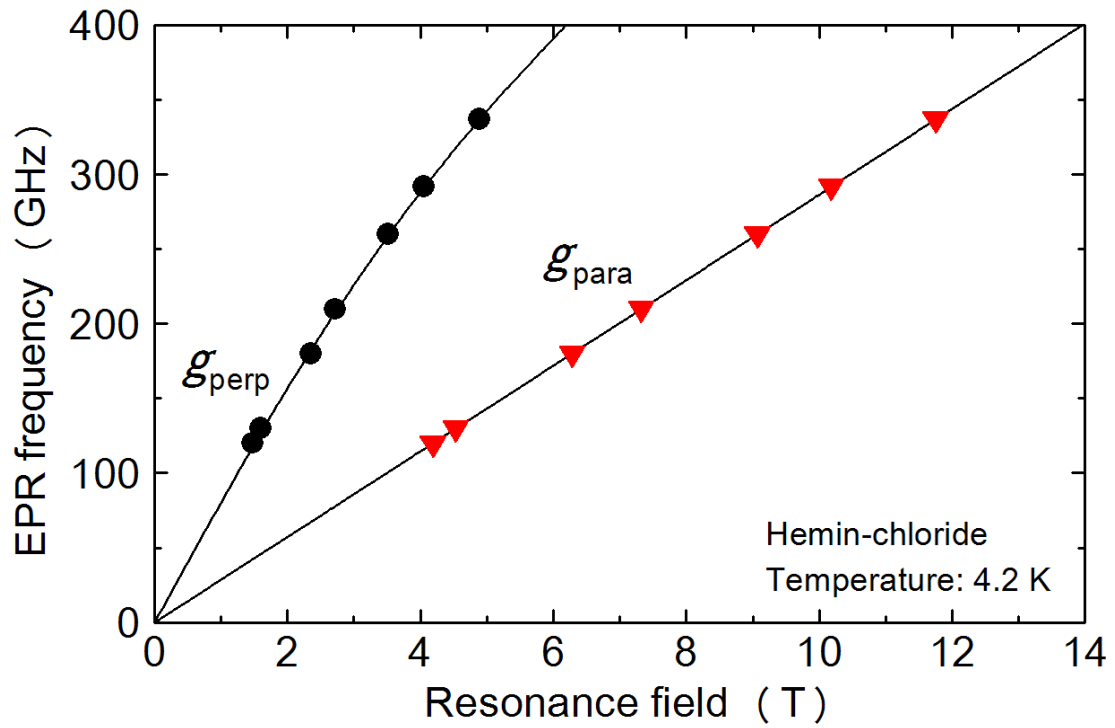


図 7-13 ヘミンクロライド溶液について、全ての周波数において得られた  $g_{\text{perp}}$  吸収のピークの共鳴磁場と周波数の関係をプロットしたもの。赤色の三角はシミュレーションから予想される  $g_{\text{para}}$  吸収の観測位置。

図 7-13 に本研究で得られたヘミンクロライドの  $g_{\text{perp}}$  吸収について、共鳴磁場と周波数の関係をプロットしたものを示す。 $g_{\text{para}}$  吸収については明瞭な肩を観測出来なかったため、予想される所に赤い三角形でプロットした。この図から分かるように、 $g_{\text{para}}$  吸収の共鳴磁場は周波数に比例する。一方、 $g_{\text{perp}}$  吸収の共鳴磁場と周波数の関係は第四章および第五章の結果と同様、ゼロ磁場分裂定数  $D$  の存在を反映して、上凸の形の曲線で表せる。図 7-13 では、EPR スペクトルのシミュレーションで使用したスピンハミルトニアンパラメータを用いて理論的に予想される共鳴磁場と周波数の関係を表す曲線を描いており、この実験で得られた  $g_{\text{perp}}$  吸収の共鳴磁場と周波数の関係を良く説明出来ている。

アコメトミオグロビンの EPR 測定では 0 T から 6 T まで、ヘミンクロライドの EPR 測定では 0 T から 14 T までの磁場範囲を連続的に掃引した。図 7-12(a) と図 7-12(b) に示した実験データは全て生データであり、基線によるベースラインの補正は一切行っていない。カンチレバーを用いた測定では、このような 10 T 以上の広い磁場範囲にわたってシームレスに、かつ非常に安定したベースラインを維持することは困難であった。アコメトミオグロビンやヘミンクロライドの EPR スペクトルを強磁場・テラヘルツ領域で観測出来たのは、安定したベースラインを実現出来たことがその大きな要因であり、メンブレンを用いた測定がヘム鉄の強磁場・テラヘルツ EPR 測定に適していると言える。

### 7-3.4 濃度感度の評価と開発した装置の位置づけ

本装置の濃度感度について議論しておく。スピン感度は、 $S/N = 1$  の ESR 信号を観測するために必要なスピン数を意味している。一方、濃度感度とは測定に最低限必要な試料濃度のことである。多くの試料を ESR 測定装置内にセット出来る場合には、薄い濃度でもトータルのスピン数を十分量稼ぐことが出来る。一方、試料体積が大きくとれない場合には、試料濃度が高くないと必要なスピン数を稼ぐことが出来ない。このように濃度感度はスピン感度と測定に用いることが出来る試料体積限界によって決まっている。生体試料のように一般に高濃度の溶液を準備出来ないような試料では、実現可能な溶液濃度に限界があるため、濃度感度は測定上の重要なファクターである[7.13-7.17]。



一般的に、高周波数領域の ESR 測定装置の濃度感度は、X-band や Q-band といった低周波数帯の ESR 測定装置と比べて悪い傾向にある。例えば空洞共振器を用いた X-band ESR 測定装置では搭載試料体積の限界は 10  $\mu\text{L}$  程度であるが、W-band の ESR 測定装置では 0.1-1  $\mu\text{L}$  程度と非常に微量である。X-band と W-band では同じ g 値の信号に対して共鳴磁場の大きさが 10 倍違うので信号強度は W-band の方が 100 倍大きくなるが、搭載可能試料量が 1/10-1/100 程度なので、スピン感度の点では両者とも同程度の値となる。しかし、濃度感度の点からみると、同じスピン数を用意するために W-band では X-band と比べて 10-100 倍程度も高濃度の試料を準備する必要がある。このように空洞共振器を用いた ESR 測定装置は、感度は非常に高いが高周波数になるほど試料空間が小さくなるために濃度感度を稼げないという問題がある。したがって、試料濃度を下げるためには空洞共振器を用いずに試料空間を広げる方向も有効な改善策の一つになる。

2016 年に Song や Hill らは特殊な試料ホルダーを用いることで高い濃度感度を持つ W-band ESR 測定装置を報告している。搭載可能な試料体積を 10  $\mu\text{L}$  まで増やすことが可能で、かつ濃度感度として 2-20  $\mu\text{M}$  という値を達成している。開発した装置の評価実験では TEMPO ラジカル溶液（線幅 1 mT 程度）の ESR 測定から市販の W-band ESR 測定装置よりも濃度感度が 10 倍程度向上したと報告している[7.18]。

一方、本研究で開発したメンブレンを用いた力検出型 ESR 測定装置では、アコメトミオグロビンの EPR 測定結果から濃度感度は 1.4 mM と見積もられた。この値は Song や Hill らの報告例よりも 2-3 桁程度悪い。しかし、アコメトミオグロビンの ESR スペクトルは 2500 mT 以上の線幅をもつ非常にブロードな吸収波形であることに注意する必要がある。例えば、1 mT 程度の線幅を持つラジカルの ESR 測定であれば線幅が狭くなった分信号強度は増大するため、1  $\mu\text{M}$  以下の濃度感度を達成出来る可能性がある。そのため、濃度感度の点では彼らの開発した装置と比べても同程度ではないかと考えている。

微量溶液試料に対する ESR 測定が可能という点に加えて、多周波数 ESR 測定が可能であることもヘムタンパク質の研究にとっては重要な要素である。2011 年に、Mathies らは高スピン状態の  $\text{Fe}^{3+}$  を含んだ溶液に対して、275 GHz

における強磁場・テラヘルツ EPR 測定に成功している。この報告では、試料の濃度は 1-10 mM 程度であるが、試料体積は 25 nL と非常に微量であり、本研究で開発した装置と比べて 400 分の 1 程度の試料量で強磁場・テラヘルツ EPR 測定を実現している[7.19]。しかし、彼らの開発した装置は 275 GHz 帯専用に製作された空洞共振器を用いており、275 GHz 以外の周波数では使用出来ない。空洞共振器を用いたテラヘルツ領域の高感度な ESR 測定装置は他のグループでも開発されているが[7.16-7.18, 7.20]、測定感度の高い周波数が離散的にかつ数か所存在しているだけであるため、準可變的に周波数を変えて ESR 測定を行うことは出来ない。金属タンパク質・金属酵素、特に大きなゼロ磁場分裂を持つヘム鉄錯体やヘムタンパク質の EPR 研究を行う上で、準可變的に周波数を変えて多周波数 EPR 測定を行うことは、ゼロ磁場分裂定数  $D$ 、 $E$  や  $g$  テンソルの主値といったスピンハミルトニアンパラメータを決定する上で必要不可欠である。この意味において、 $\mu\text{L}$  オーダーの微量なタンパク質溶液試料に対し、強磁場・テラヘルツ領域の多周波数 EPR 測定を可能にした「 $\text{SiN}_x$  ナノメンブレンを用いた力検出型強磁場・テラヘルツ ESR 測定法」は実用的で優れた実験手法である。将来的には、金属タンパク質・金属酵素の電子状態解析への応用が期待される。

## 7-4 まとめ

本研究では  $\text{SiN}_x$  ナノメンブレンを用いた力検出型強磁場・テラヘルツ ESR 測定法を開発した。本研究により、カンチレバーを用いた力検出型 ESR 法の問題点を解決することに成功した。

- ① 力検出デバイスを片持ち梁構造のカンチレバーからトランポリン構造のメンブレンに変えたことで、低磁場から強磁場中に至る広い磁場領域で、測定感度を落とすことなくシームレスに ESR 測定を行うことが可能になった。
- ② マグネット-オン配置が可能になったことで、溶液セルを用いて溶液試料を密封することが可能になった。その結果、 $\mu\text{L}$  オーダーの微量な溶液試

料に対する力検出型 ESR 測定が可能になった。350 GHz までのテラヘルツ領域において、ヘミンクロライド (50 mM、5  $\mu$ L) およびアコメトミオグロビン (8.8 mM、10  $\mu$ L) の EPR スペクトルを観測することに成功した。この成果は、力検出型 ESR 測定法で凍結溶液試料の ESR 信号観測に成功した初めての例である。また固体・溶液問わず、金属タンパク質試料の EPR 信号観測に成功した初めての例である。

カンチレバーを用いた手法は、1  $\mu$ g 以下の微小試料の強磁場・テラヘルツ ESR 測定が可能であるという点で魅力的だが、上述の問題点などから、実用性や汎用性に欠ける点があった。メンブレンを用いた手法により上記の問題点を解決することが可能となり、 $\mu$ L オーダーおよび  $\mu$ g オーダーの微量・微小な試料を測定出来る新しい力検出型 ESR 測定法の開発に成功した。特に本研究では、従来の磁化変化による検出方法から熱的に磁化を変調する新しい方法を開発した。この方法により従来の測定法では難しいと考えられる緩和時間の短い試料の ESR 測定が可能になった。

本章で開発した手法は従来からのメリットを残しつつ、生物・物理・化学など多様な分野で扱われる試料に対して状態、形状、緩和時間を問わず適用可能となった。このことは開発した装置が、実用的で非常に汎用性の高いものであることを意味している。特に、本論文で取り上げているヘム鉄錯体、ヘムタンパク質・ヘム酵素や、他の金属タンパク質・金属酵素溶液試料を多周波数 EPR 測定によって分光的な観点から解析可能である点が本装置の最大の長所である。将来的には、本装置をこれまで未解明となっていた金属タンパク質・金属酵素の電子状態の解明に大いに役立てたいと考えている。

## [参考文献]

- [7.1] 宮崎晃和、修士学位論文、神戸大学、2017年
- [7.2] N. Scozzaro, W. Ruchotzke, A. Belding, J. Cardellino, E. C. Blomberg, B. A. McCullian, V. P. Bhallamudi, D. V. Pelekhov, P. C. Hammel, *J. Magn. Reson.* **271**, 15 (2016).
- [7.3] G. Yoshikawa, T. Akiyama, S. Gautsch, P. Vettiger, H. Rohrer, *Nano Lett.* **11**, 1044 (2011).
- [7.4] G. Yoshikawa, T. Akiyama, F. Loizeau, K. Shiba, S. Gautsch, T. Nakayama, P. Vettiger, N. F. de Rooji, M. Aono, *Sensors* **12**, 15873 (2012).
- [7.5] H. Takahashi, K. Ishimura, T. Okamoto, E. Ohmichi, H. Ohta, *J. Phys. Soc. Jpn.* **86**, 063002 (2017).
- [7.6] M. Blankenhorn, E. Heintze, M. Slota, J. van Slageren, B. A. Moores, C. L. Degen, L. Bogani, M. Dressel, *Rev. Sci. Instrum.* **88**, 094707 (2017).
- [7.7] H. Takahashi, K. Ishimura, T. Okamoto, E. Ohmichi, H. Ohta, *Rev. Sci. Instrum.* **89**, 036108 (2018).
- [7.8] M. Kondoh, M. Mizuno, Y. Mizutani, *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 1950 (2016).
- [7.9] C. Höcherl, C. Wolf, *Z. Phys.* **183**, 341 (1965).
- [7.10] T. Tatsukawa, T. Maeda, H. Sasai, T. Idehara, M. Mekata, T. Saito, T. Kanemaki, *Int. J. Infrared Millimeter Waves.* **16**, 293 (1995).
- [7.11] W. Bryan Lynch, K. A. Earle, J. H. Freed, *Rev. Sci. Instrum.* **59**, 1345 (1988).
- [7.12] J. Krzystek, A. Sienkiewicz, L. Pardi, L. C. Brunel, *J. Magn. Reson.* **125**, 207 (1997).
- [7.13] A. Blank, Y. Twig, Y. Ishay, *J. Magn Reson.* **280**, 20 (2017).
- [7.14] Y. Artzi, Y. Twig, A. Blank, *Appl. Phys. Lett.* **106**, 084104 (2015).
- [7.15] G. Gualco, J. Anders, A. Sienkiewicz, S. Alberti, L. Forró, G. Boero, *J. Magn. Reson.* **247**, 96 (2014).
- [7.16] H. Blok, J. A. J. M. Disselhorst, S. B. Orlinskii, J. Schmidt, *J. Magn. Reson.* **166**, 92 (2004).
- [7.17] J. van Tol, L.-C. Brunel, R. J. Wylde, *Rev. Sci. Instrum.* **76**, 074101 (2005).

- [7.18] L. Song, Z. Liu, P. Kaur, J. M. Esquiaqui, R. I. Hunter, S. Hill, G. M. Smith, G. E. Fanucci, *J. Magn. Reson.* **265**, 188 (2016).
- [7.19] G. Mathies, H. Blok, J. A. J. M. Disselhorst, P. Gast, H. van der Meer, D. M. Miedema, R. M. Almeida, J. J. G. Moura, W. R. Hagen, E. J. J. Groenen, *J. Magn. Reson.* **210**, 126 (2011).
- [7.20] G. W. Morley, L.-C. Brunel, J. van Tol, *Rev. Sci. Instrum.* **79**, 064703 (2008).

# 第 8 章

Conclusion

本研究では、ヘム鉄のゼロ磁場分裂の起源に迫ることを目的として、極低温、強磁場、さらには高圧といった多重極限環境下におけるヘミンクロライドの強磁場・テラヘルツ EPR 測定を行った。また、従来の測定法よりも高感度で、かつヘム鉄の電子状態研究に適した新しい強磁場・テラヘルツ EPR 測定装置の開発を行った。ここで改めて、本研究において得られた成果をまとめておく。

- ① 第四章では、ヘミンクロライド ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $S=5/2$ ) 粉末試料に対して強磁場・テラヘルツ EPR 測定を行った。80 GHz から 703 GHz までの多周波数および 15 T までの強磁場においてヘミンクロライドの EPR スペクトルを観測し、300 GHz 以上の周波数領域で  $g_{\text{perp}}$  吸収のスプリットを初めて観測した。また以前より報告のあった  $\beta$  モードに加え、報告例のない  $\alpha$  モードの EPR 信号を初めて観測した。本研究の結果からヘミンクロライドのスピンハミルトニアンパラメータを見積もり、ヘム面内の磁気異方性を示すゼロ磁場分裂定数  $E$  を初めて決定した ( $g_x = g_y = 1.93$ ,  $g_z = 2.05$ ,  $D = 6.90 \text{ cm}^{-1}$ ,  $|E| = 0.055 \text{ cm}^{-1}$ )。また、得られた  $E$  値の妥当性を検証するため、量子化学計算を用いて、軸配位子方向の磁気異方性を示すゼロ磁場分裂定数  $D$  との比  $|E/D|$  を理論的に算出したところ、実験結果と同じオーダーの比を得ることが出来た (実験値の比 : 0.008、理論計算による比 : 0.002)。
- ② 第五章では、ハイブリッド型圧力セルを用いてヘミンクロライド粉末試料に対して圧力下の強磁場・テラヘルツ EPR 測定を行った。常圧下において  $D = 6.90 \text{ cm}^{-1}$  であったゼロ磁場分裂定数は、圧力印加とともに増大し、1.96 GPa において  $D = 7.90 \text{ cm}^{-1}$  と見積もられた。さらにこの結果から、ヘム鉄周囲の電子状態の圧力効果について、正方対称な配位子場を仮定し定性的な議論を行った。その結果、 $D$  値の増大は、圧力印加に伴いヘミンクロライドの分子構造が軸配位子方向に大きく変化し、 $d_{xy}$  軌道に対する  $d_{xz}$  軌道と  $d_{yz}$  軌道のエネルギーが上昇したと考えることで説明出来ることが分かった。

③ 第六章では、カンチレバーを用いた力検出型 ESR 測定法の開発・改良を行った。この手法は 1  $\mu\text{g}$  以下の微小試料の ESR 信号をカンチレバーの変位として高感度に検出出来るという特長を持っている。しかし、変位検出のために Fabry-Perot 干渉計を構成しているため、干渉強度の周期を超えるようなカンチレバーの変位が起こると出力が振動してしまう。そのため変位と出力がリニアな関係を示す変位範囲は狭く、変位に対するダイナミックレンジが小さいという問題があった。このままでは広い磁場範囲で観測される ESR スペクトルをシームレスに観測することが困難であり、ヘムタンパク質やヘム鉄錯体への適用が困難な状況であった。

この問題を解決するため、波長可変レーザーを用いた PI 制御を行えるようシステムを改良した。その結果高い測定感度を維持しながら測定可能な範囲が広がり、ダイナミックレンジを 0.4  $\mu\text{m}$  から 7.8  $\mu\text{m}$  まで拡張することに成功した。さらにヘミンクロライドの微結晶 16 ng に応用し、500 GHz までの多周波数においてヘミンクロライドの EPR スペクトルを観測することに成功した。スピン感度は $\sim 10^8$  spins/gauss を達成した。ただし、強磁場中ではカンチレバーの変位が大きくなり過ぎることで Fabry-Perot 干渉計の平行度が悪化し、数 T 付近から徐々に感度が低下し、10 T 以上では十分な測定感度が得られなかった。こうした課題に加え、溶液試料への適用で問題となるセットアップ時の試料蒸発を防ぐ方法は見つからなかったため、第六章ではヘムタンパク質への応用は出来なかった。

④ 第七章では、第六章で残った課題を解決するため、新たに  $\text{SiN}_x$  ナノメンブレンを用いた力検出型 ESR 測定法を開発した。メンブレンはトランポリン型の薄膜デバイスであるため、メンブレン中央の変位はメンブレンに対して常に垂直である。そのためメンブレンの変位量に関わらず Fabry-Perot 干渉計の平行度が悪化しなくなった。その結果、10 T 以上の磁場範囲でもシームレスで安定したベースラインを実現し、かつ低雑音の ESR 測定が可能になった。また、Bloch 方程式から導かれる ESR 吸収に伴う試料の磁化変化を捉えるのではなく、ESR の緩和プロセスに伴う試料の温度変化を試料の磁化変化に変換する新しい ESR 検出のコンセプトを考案した。これは緩



和時間の短い試料に対しても適用可能な手法であり、反強磁性体やフラストレーション磁性体など従来の力検出 ESR の方法では測定が困難な試料への応用が可能となった。

さらにマグネット-オン配置の特徴として、試料をメンブレンと分離して設置することが出来る点が挙げられる。そのため、密閉可能な溶液セルを準備することで溶液試料の測定が可能となった。これらの工夫により、ヘミンクロライドの溶液試料 (50 mM、5  $\mu$ L) の EPR スペクトルを 337 GHz までの多周波数で、またアコメトミオグロビン ( $\text{Fe}^{3+}$ 、 $S=5/2$ ) の溶液試料 (8.8 mM、10  $\mu$ L) の EPR スペクトルを 120 GHz において観測することに成功した。スピン感度は $\sim 10^{12}$  spins/gauss を達成した。カンチレバーを用いた測定法と比べてスピン感度は 3 桁程度劣るが、マグネット-オン配置により試料量を稼げるようになっているため S/N は改善した。その結果、スピン濃度の薄いヘムタンパク質溶液の力検出 EPR 信号を世界で初めて観測することに成功した。

以上の成果より、本研究で目的に挙げていたヘム鉄の電子状態研究のための新しい実験方法論を確立することが出来た。

第四章では、ヘム鉄のゼロ磁場分裂の起源に迫るための強磁場・極低温における磁場中 EPR 分光の手法を確立し、第五章ではさらに高圧という新しい物理パラメータをゼロ磁場分裂の研究に導入した。このような多重極限環境下での EPR 測定を行うことで、自然環境下では観測出来ない未知の情報をミクロスコピックな観点から引き出すことが可能である。そしてそこから得られた情報と理論的計算手法を結合することで、ヘム鉄の未解明な電子状態を今後明らかにしていくことが可能になると期待される。本研究では新たに開発した手法を主としてヘミンクロライドに適用したが、他の軸配位子が配位したヘミンや、ヘミン以外のヘム鉄錯体および様々な金属タンパク質モデル錯体にも応用することが可能である。

また、第六章、第七章の成果により、 $\mu$ L オーダーの金属タンパク質溶液に対する強磁場・テラヘルツ EPR 測定法を新たに確立した。酸化型・還元型のミオグロビンやヘモグロビンは比較的試料量の確保が容易であるが、他のヘムタン

パク質や反応中間体のヘムタンパク質は収率が悪く、微量溶液しか確保出来ないものが大半である。そうした様々なヘムタンパク質を 10  $\mu\text{L}$  程度用意するだけで強磁場・テラヘルツ EPR 測定が可能となれば、その応用範囲は飛躍的に広がることが期待される。従来の強磁場・テラヘルツ EPR 測定法では観測出来なかった様々なヘム鉄錯体の EPR 信号を捉えることでゼロ磁場分裂の起源により一層迫ることが出来ると期待している。

特に、還元型ヘムタンパク質・ヘム鉄錯体の EPR 研究の発展を期待している。高スピン状態ヘムのマイクロ波領域における EPR 観測例[1.31]や、基底状態から励起状態間の EPR 観測例[1.42, 1.43]は存在するが、 $S=2$  の基底状態内の二準位間におけるテラヘルツ領域の EPR 観測例はこれまで報告例が一切ない。そのため基底状態におけるゼロ磁場分裂間の EPR 遷移の観測による還元型ヘム鉄のゼロ磁場分裂定数  $D$ 、 $E$  を決定出来ていない。その一方で、同じ  $S=2$  でも  $\text{Mn}^{3+}$  の金属錯体やタンパク質、および  $\text{Fe}^{2+}$  を  $\text{Mn}^{3+}$  に置換したミオグロビンなどのヘムタンパク質では、多数の強磁場・テラヘルツ EPR 測定の報告と、ゼロ磁場分裂定数の決定が行われている[4.9, 8.1-8.12]。このような状況はヘム鉄に関する EPR 研究分野の大きな課題であり、ESR 測定装置の感度不足が原因なのか、あるいはスピンハミルトニアンを用いた議論や取り扱いが不十分で本当は想定外の周波数・磁場領域に EPR 信号が観測されるはずなのか、その真相は未解明のままである。そのため、本研究で確立した手法を還元型ヘム鉄に適用し、未発見の EPR 信号を探索することは大いに意義のあることだと考えている。

本論文の実験方法論が今後広く活用され、ヘム鉄の電子状態に関する謎や、さらには生命科学分野の大きな謎を解明する上でその一助になれば幸いである。

## [参考文献]

- [8.1] D. P. Glodberg, J. Telser, J. Krzystek, A. G. Montablan, L.-C. Brunel, A. G. M. Barrett, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8722 (1997).
- [8.2] K. A. Campbell, E. Yikilmaz, C. V. Grant, W. Gregor, A.-F. Miller, R. D. Britt, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 4714 (1999).
- [8.3] J. Krzystek, J. Telser, L. A. Pardi, D. P. Goldberg, B. M. Hoffman, L.-C. Brunel, *Inorg. Chem.* **38**, 6121 (1999).
- [8.4] K. A. Campbell, M. R. Lashley, J. K. Wyatt, M. H. Nantz, R. D. Britt, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5710 (2001).
- [8.5] J. Krzystek, J. Telser, B. M. Hoffman, L.-C. Brunel, S. Licoccia, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 7890 (2001).
- [8.6] J. Krzystek, J. Telser, *J. Magn. Reson.* **162**, 454 (2003).
- [8.7] J. Krzystek, G. J. Yeagle, J.-H. Park, R. D. Britt, M. W. Meisel, L.-C. Brunel, J. Telser, *Inorg. Chem.* **42**, 4610 (2003).
- [8.8] C. Mantel, A. K. Hassan, J. Pécaut, A. Deronzier, M.-N. Collomb, C. Duboc-Toia, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 12337 (2003).
- [8.9] P. L. W. Tregenna-Piggot, H. Weihe, A.-L. Barra, *Inorg. Chem.* **42**, 8504 (2003).
- [8.10] G. Aromí, J. Telser, A. Ozarowski, L.-C. Brunel, H.-M. Stoeckli-Evans, J. Krzystek, *Inorg. Chem.* **44**, 187 (2005).
- [8.11] J. D. Harvey, C. J. Ziegler, J. Telser, A. Ozarowski, J. Krzystek, *Inorg. Chem.* **44**, 4451 (2005).
- [8.12] J. Krzystek, S. A. Zvyagin, A. Ozarowski, S. Trofimenko, J. Telser, *J. Magn. Reson.* **178**, 174 (2006).



## 謝辞

末筆ではございますが、本論文執筆にあたってご協力くださった全ての方々に感謝の言葉を申し上げます。

本研究を進めるにあたり、大道英二准教授には研究テーマの設定から研究内容、学会発表、学術論文作成、競争的資金獲得、卒業後の進路に至るまで幅広く研究活動全般に対するご指導を賜りました。またご多忙の中、主査として学位論文審査を引き受けて頂きました。大変感謝申し上げます。

太田仁教授には、研究内容に関する議論やご指導を賜っただけでなく、学会発表や電子スピンスイエンズ学会、日本赤外線学会における学会活動の中でもご指導を賜りました。さらに卒業後の進路の決めるにあたり様々な面でサポート頂きました。またご多忙の中、副査として学位論文審査を引き受けて頂きました。大変感謝申し上げます。

河本敏郎教授、越智敦彦准教授には、ご多忙の中、副査として学位論文審査を引き受けて頂きました。大変感謝申し上げます。

また、極限物性物理学教育研究分野のスタッフには研究を進めるにあたり、様々なご指導、助言を賜りました。高橋英幸助教には、カンチレバーを用いた ESR 測定法およびメンブレンデバイスをを用いた ESR 測定法の開発に関して、金属工作やプログラミング等に関するご指導を賜りました。大久保晋准教授には、特にパルス強磁場を用いた ESR 測定の方法や解析方法等についてご指導を賜りました。櫻井敬博助教には、圧力下 ESR 測定の方法や解析方法等についてご指導を賜りました。また寒剤供給の面でもお世話になりました。肘井敬吾博士には、ESR シミュレーションのためのプログラミングについてご指導を賜りました。原茂生博士には、磁性体の結晶の育成およびその解析方法についてご指導を賜りました。また寒剤供給の面でもお世話になりました。森豊博士には、寒剤供給の面でお世話になりました。大変感謝申し上げます。

本研究では共同研究によって研究を大きく前進させることが出来ました。また、タンパク質の取り扱い、解析において多大なるご指導、助言を賜りました。大阪大学大学院理学研究科化学専攻の水谷泰久教授、石川春人講師には、大腸菌

を利用したヘムタンパク質大量培養の共同研究を受け入れて頂きました。また培養方法のご指導を賜りました。大阪大学の堀洋名誉教授、神戸大学大学院理学研究科化学専攻の鏝木基成教授、佐賀大学農学部生命機能科学科の堀谷正樹助教には、ヘムタンパク質の精製方法・単結晶育成方法およびヘムタンパク質の ESR 研究全般に関するご指導を賜りました。また堀谷助教には共同研究においても多大なるご協力を頂きました。神戸大学大学院理学研究科化学専攻の小堀康博教授、同期で大学院生の江間文俊さんには、DFT 計算に関する共同研究を受け入れて頂きました。またその計算・解析方法に関するご指導を賜りました。大変感謝申し上げます。

共同研究以外にも、多くの方からタンパク質について素人の私に助言やコメントを賜り、研究を支えて頂きました。大阪市立大学大学院理学研究科生物地球専攻（元大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻准教授）の荒田敏昭特任教授、名古屋大学大学院理学研究科物質理学専攻の三野広幸准教授には、タンパク質の取り扱いや、タンパク質の ESR 測定に関連するノウハウについてご指導を賜りました。米国 Pennsylvania 大学の米谷隆博士には、マッコウクジラ由来ミオグロビン粉末試料を快く提供頂きました。試料はアコメトミオグロビン単結晶の育成に利用させて頂きました。大変感謝申し上げます。

日本学術振興会には特別研究員 DC として採用して頂き、研究面、生活面において経済的な援助を受けました。また湯川財団望月基金、村田学術振興財団には海外渡航旅費の援助を受けました。大変感謝申し上げます。

最後に、9年間の学生生活および3年間の博士課程の研究活動を支えてくださった両親に感謝の意を表します。両親の支え無しではここまでの成果を出すことは出来ませんでした。本当にありがとうございました。

平成 31 年 1 月



# Appendix



## Appendix-1

### ミオグロビンの取り扱いについて

#### A1-1 アコメトミオグロビン ( $\text{Fe}^{3+}$ , $3d^5$ ) 溶液の調製・濃度決定方法

##### <準備物>

リン酸バッファー（リン酸緩衝液とも言う。濃度は 10 mM 程度、pH = 6.0-6.8 のもの。防腐剤  $\text{NaN}_3$  等が入っていないものを使用する。リン酸バッファーの作り方は A1-2 節参照）

200 mL ビーカー：KCN 汚染水無害化用

50 mL ビーカー：サンプル溶解用

ピペットマン（1-5 mL 用、2-20  $\mu\text{L}$  用）

ピペットチップ（各ピペット用それぞれ大きさが異なることに注意）

セル〈キュベット〉（スリガラスの部分以外を触れないこと。吸光度に影響が出る。）

2 mL エッペンチューブ

ウマの骨格筋由来の Myoglobin（ウマの Myoglobin では、1 mM の溶液をつくる場合リン酸バッファー 2 mL に対して 33 mg、また 100  $\mu\text{M}$  の溶液をつくる場合リン酸バッファー 20 mL に対して 33 mg 用意。これは、分子量  $\text{MW} = 16,500 \text{ g/mol}$  を使って算出。）以下、Myoglobin を Mb と省略。

薬包紙 1 枚

遠心分離機

ヘモライナック 2（劇薬。取扱注意。50 mL 程度経口すると致死量に達する。）

サニメント手袋（ヘモライナック 2 取扱時に必要）

ウェイストクリーン 1-2 粒（KCN 汚染水無害化のために用いる）

クラッシュドアイス

セル立て

エッペンチューブ立て

セル蓋（あると持ち運びに便利）

## 1. 操作方法

- ① 電子天秤の上に薬包紙を乗せ、Mb を必要量取る。
- ② 机の上にトレーもしくはアルミホイル等を敷く。この上で調製操作を行う。
- ③ クラッシュドアイスを用意し、その中にエッペンチューブを入れて、氷上溶解出来るように準備する（出来るだけ4度以下に保つ）。
- ④ エッペンチューブに①で測りとった Mb を投入する。ここに用意したリン酸バッファを必要量移し替える。しっかり攪拌する。
- ⑤ 別のエッペンチューブにリン酸バッファのみを入れる。この二つを遠心分離機に入れ、3,000 rpm 以上の回転速度で遠心分離する。時間は一分程度。恐らく溶け残りが液中を浮遊するので、全てが底に沈むまで遠心分離を繰り返す。Mb は体内にも存在する物質で、簡易な遠心分離機を用いても変性するほど発熱はしないはずなので、溶液の温度は気にしなくて良い（ただし、精製のときは4℃を維持する必要がある）。
- ⑥ 遠心分離後、遠心管立てに遠心管を起き、蓋を静かに開ける。
- ⑦ セルをセル立てに立てていく。このときスリガラスになっている面の方向を揃えておくと便利。緩衝溶液をピペットで2 mL 取り、立てたセル全てに入れる。
- ⑧ 濃度をおよそ10  $\mu\text{M}$  以下にしないとソレー帯（400 nm 付近）の吸光度が1を超えるため、正確な測定が出来ない（吸光度1.0は、10%の光しか透過しておらず、検出側の誤差が大きくなりやすいかどうかの境目にあたる。10%以上は透過するように濃度を設定しなければならない。）実際は1-10 mM のような高濃度サンプルを精製によって作成するので、希釈を重ねて、10  $\mu\text{M}$  以下まで濃度を薄める。数  $\mu\text{L}$  単位の高濃度ミオグロビンをピペットではき出すことは難しく（2-20  $\mu\text{L}$  ピペットは、10-20  $\mu\text{L}$  の範囲では出しやすいが、10  $\mu\text{L}$  を下回るとチップ中に残りやすく誤差が大きくなりやすい）、しっかり溶液をはき出せないことが多いので、分光測定の際の希釈方法は最後のページに書いた追記を参考にすると良い。

実際の ESR 測定ではサンプル溶液にグリセリンを投入するが、グリセ

リンが吸光度に対して影響を及ぼすことはないため、吸光度測定では投入しない。

濃度を測定するためにMbの場合は全体を低スピン状態シアノメトMbにする必要がある。これはシアン-メト法と呼ばれる吸光度から濃度を決定する手法である。そのためヘモライナック 2 を一滴加えることでシアノメト Mb を作る。するとサンプルの色が茶色から赤色に変わるはずである。

高スピン状態のサンプルに対して ESR を行う予定のときは、サンプルが高スピン状態になっているかを確認するために、ヘモライナック 2 を入れないで吸光度測定をするセルも用意する（このセルからは濃度決定は出来ない）。また、分光器のレファレンス及びベースライン補正のためにリン酸バッファーのみのセルを一本作ることも忘れない。

リン酸バッファー自体のイオン濃度は、ベースラインおよび吸光度に影響（濃度依存性）しないので、複数種のイオン濃度のサンプル溶液を用意しても、ベースライン補正用のリン酸バッファーのセルは一種類のみで良い。

- ⑨ ゴミ箱へ使用済みチップを捨てる。また、アルミホイル等の消耗品も捨てる。残ったエッペンチューブ内の試料溶液は日付、Mb 濃度、バッファー濃度、pH、精製の有無を書いて N<sub>2</sub> デュワー中で保存しておく。

例：1 mM のサンプルから希釈して用意する場合の混合割合

I …試料 2  $\mu$ L + リン酸バッファー 1.998 mL = 2 mL（1000 倍希釈） + ヘモライナック 2  $\rightarrow$  1  $\mu$ M シアノメト Mb に。

II …試料 15  $\mu$ L + リン酸バッファー 1.485 mL = 1.5 mL（100 倍希釈） + ヘモライナック 2  $\rightarrow$  10  $\mu$ M シアノメト Mb に。

III …試料 150  $\mu$ L + リン酸バッファー 1.35 mL = 1.5 mL（10 倍希釈） + ヘモライナック 2  $\rightarrow$  100  $\mu$ M シアノメト Mb に。

IV …試料 2  $\mu$ L + リン酸バッファー 1.998 mL = 2 mL（1,000 倍希釈）  $\rightarrow$  1  $\mu$ M アコメト Mb に。

V …試料 15  $\mu$ L + リン酸バッファー 1.485 mL = 1.5 mL（100 倍希釈）  $\rightarrow$

10  $\mu$ M アコメト Mb に。

VI…試料 150  $\mu$ L+リン酸バッファー 1.35 mL = 1.5 mL(10 倍希釈) → 100  $\mu$ M アコメト Mb に。

VII…リン酸バッファーのみ 2 mL×1 本

## 2. 吸光度測定

研究基盤センター機器分析棟 202 日立吸光分光光度計 U3300 を使用。

- ① 持ち物は、エッペンチューブに入れた高濃度 Mb とリン酸バッファー、リン酸バッファーの入ったセル、ヘモライナック 2、セル蓋である。ヘモライナック 2 は無くさないために必ずボックスの所定の場所に入れて持ち歩く。ポケット等には絶対に入れない。
- ② セル立てに乗せたセルをカンチレバー作成室から分光室まで持って行く。このとき蓋をして、移動中にこぼすことや蒸発を防ぐ。蓋には番号を振り、ノートにも記録して、測定ミスを防ぐ。
- ③ 分光測定開始。初めにリン酸バッファーのみを入れたセル二つを分光機に配置し、ベースライン補正を行う。これは、セル由来の誤差を補正する作業である。ベースライン補正で使用したセルを使って試料の吸光度測定をするべきであるので、分光機 SAMPLE 側セルのリン酸バッファーを少し減らして、測定したい Mb 溶液を必要量加える)。測定範囲はおよそ 700-200 nm に設定する。高い濃度から測定を始め、ピペットを使ってリン酸バッファーの割合を上げて薄い濃度での測定へ移っていくと良い。シアンと配位しているリン酸バッファー溶液中のサンプルはシアノメトミオグロビン (Cyanomet-myoglobin, CN-metMb) として活性状態にあり、吸光度測定をするとおよそ 540 nm 付近にピークが現れる(図 A1-6 参照)。モル吸光係数  $\epsilon = 11.3 [1/\text{mM} \cdot \text{cm}]$  から、希釈前の濃度が推定出来る。吸光度  $A$ 、光路長 (セルの厚さ)  $L [cm]$ 、希釈前の濃度  $C [mM]$ 、希釈度  $B$  とすると、 $C = AB/\epsilon L$  となる。

※SAMPLE 側にリン酸バッファーのみを入れて吸光度測定を行った場合と、リン酸バッファー+ヘモライナック 2 を入れて吸光度測定を行った場合では、1,000-400 nm において吸光度に違いはないことを確かめてい

るので、ベースライン補正時にヘモライナック 2 は入れなくて良い。

※プラスチックセルでは、450 nm 付近で吸光度に段差が生じる。ガラスセルを用いて測定すると段差は現れなかったため、プラスチック（アクリル）が影響していると考えられる（図 A1-7 参照）。

※1,000 nm 付近に出る振動様の信号は、試料溶液由来ではなく、ほかのものが影響して干渉が起こっていると考えられる（各図 A1-6、A1-7 参照）。

Mb の吸光度測定をする場合は 700-200 nm 付近が測定出来れば十分なので、この振動は気にしなくて良い。



図 A1-1 ウェイストクリーン（左）とヘモライナック 2（右）。

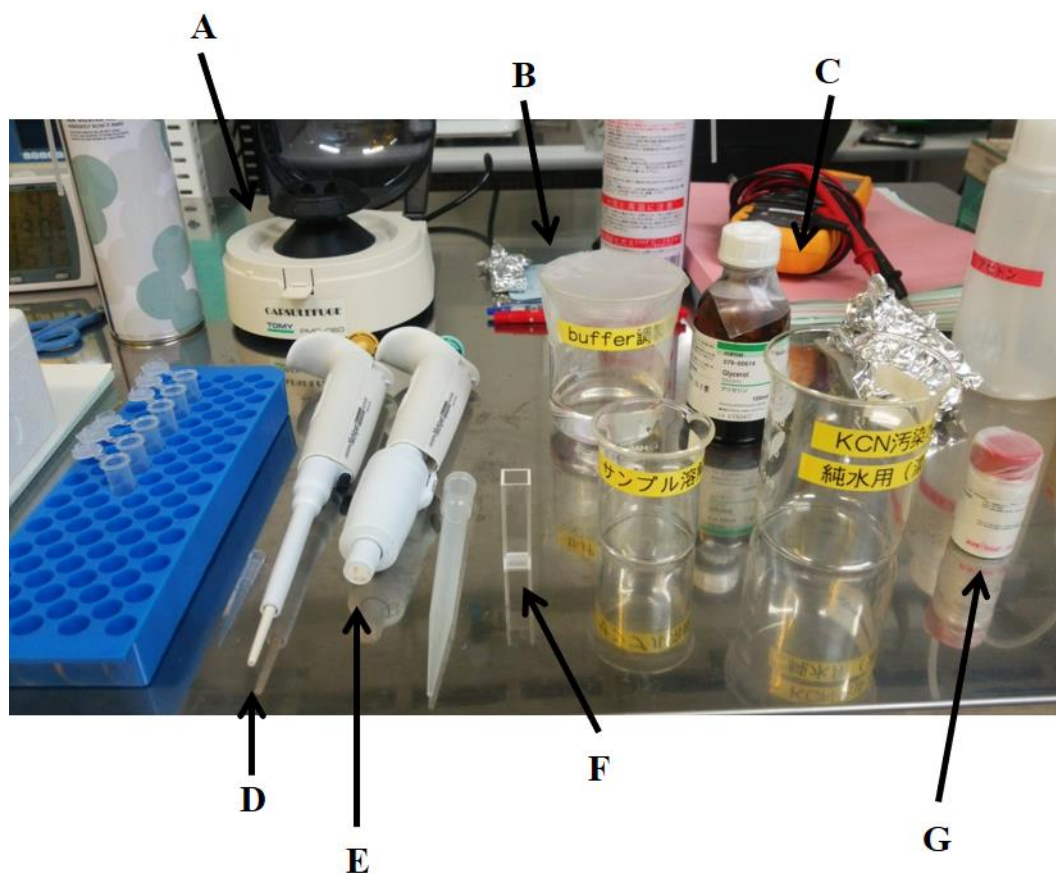


図 A1-2 準備物。(A) 簡易遠心分離機、(B) リン酸バッファー、(C) グリセリン（必要に応じて使用する）、(D) 2-20  $\mu$ L 用ピペット、(E) 1-5 mL 用ピペット、(F) 分光用セル、(G) 試料。



図 A1-3 氷上で Mb をリン酸バッファーに溶解させている様子。

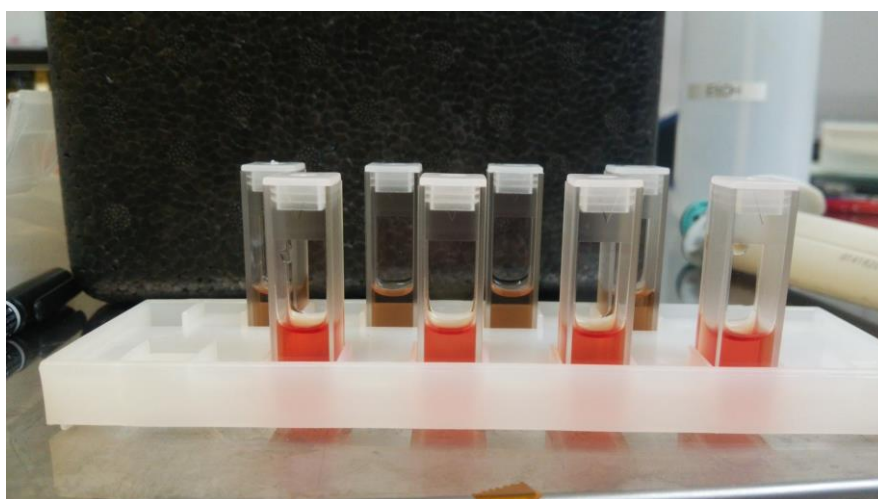


図 A1-4 調製したアコメト Mb (茶色) とシアノメト Mb (赤色)。

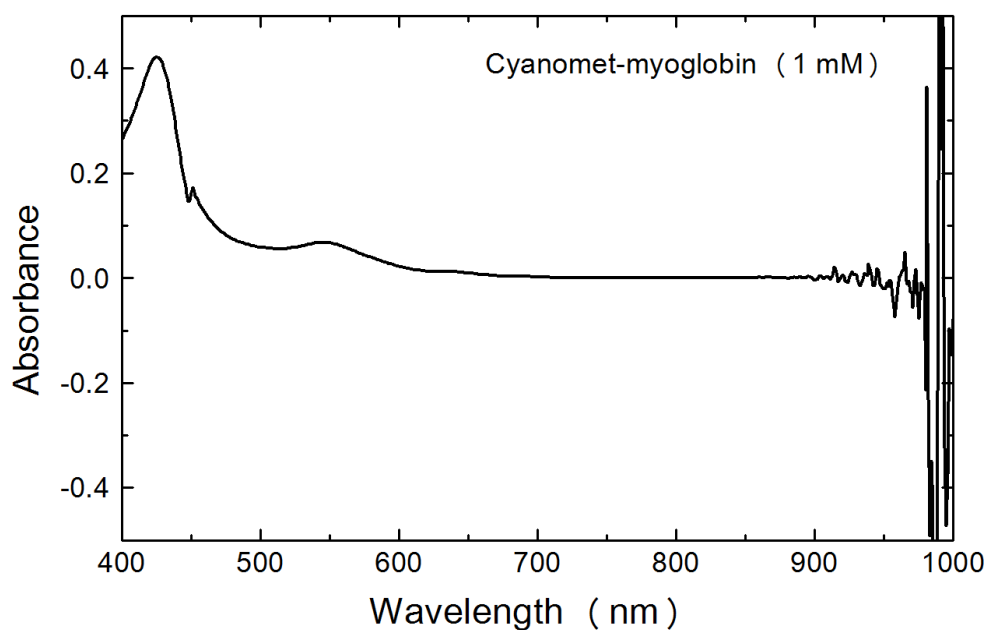


図 A1-5 シアノメト Mb (1 mM) を 100 倍希釈 (10  $\mu$ M) して行った吸光度測定の結果。プラスチック (アクリル) のセルを使用した。

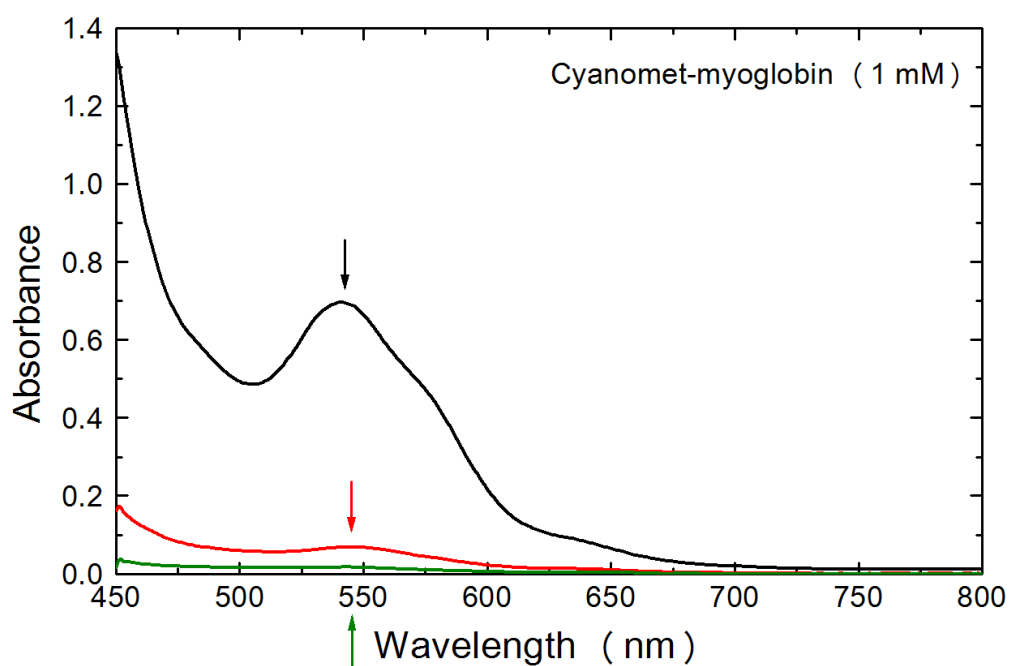


図 A1-6 シアノメト Mb (1 mM) を様々な濃度に希釈して行った吸光度測定の結果。プラスチック (アクリル) のセルを使用した。黒が 10 倍希釈 (100  $\mu$ M)、赤が 100 倍希釈 (10  $\mu$ M)、緑が 1000 倍希釈 (1  $\mu$ M) である。



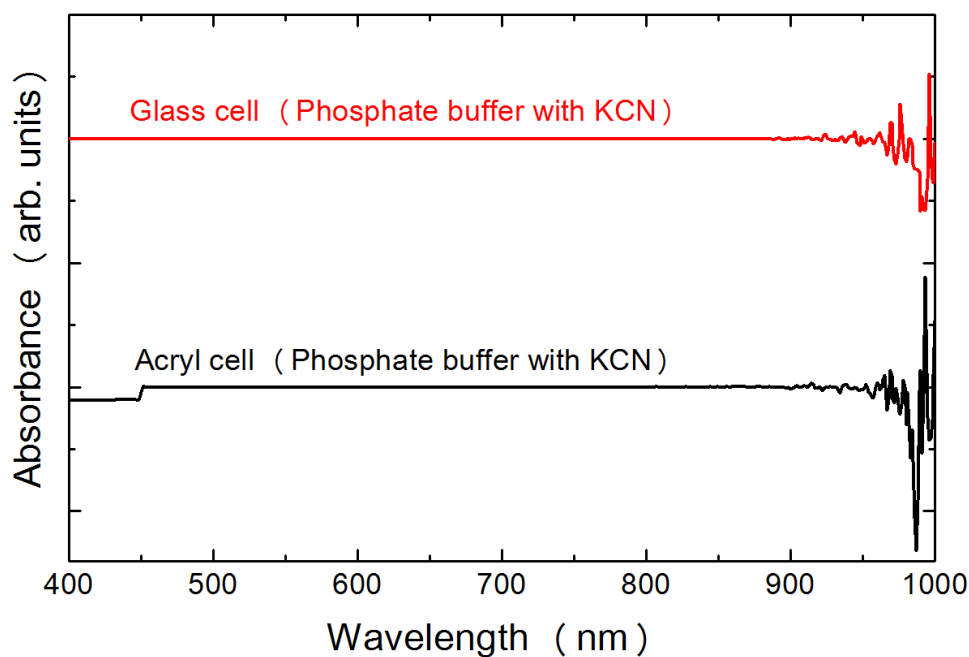


図 A1-7 セルの材質による吸光度の依存性。試料はリン酸バッファーに KCN を溶かしたもの。この結果から材質に依存した吸光度の変化はないと思われる。

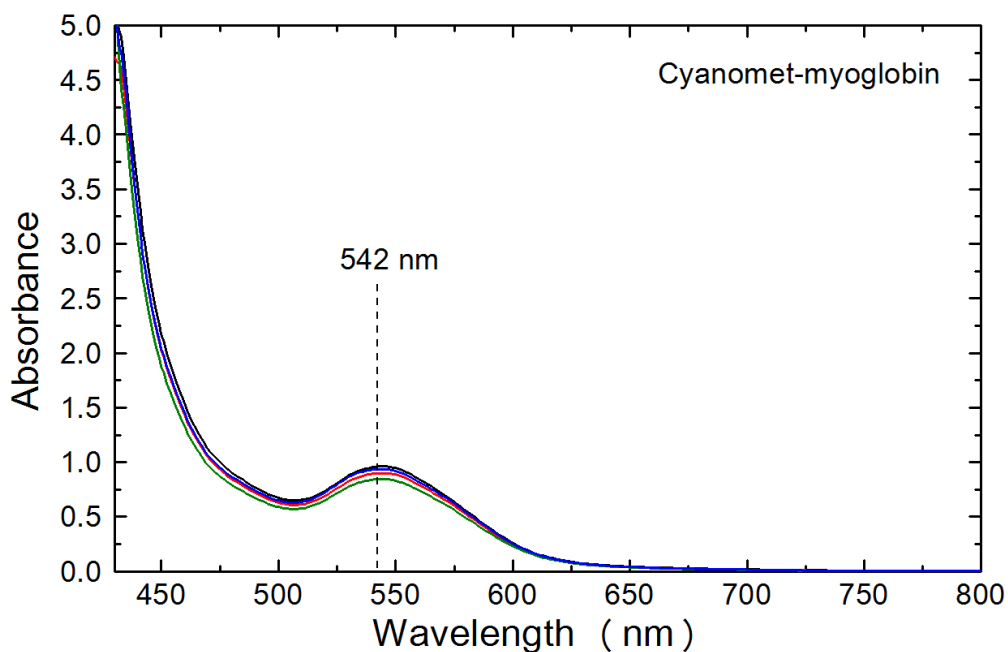


図 A1-8 200 mM (黒)、300 mM (赤)、400 mM (緑)、500 mM (青) 濃度のリン酸バッファーを用いた場合のシアンメト法による吸光度測定の結果。どの場合も 542 nm でピークが現れ、シアンメト Mb になっていることが分かる。

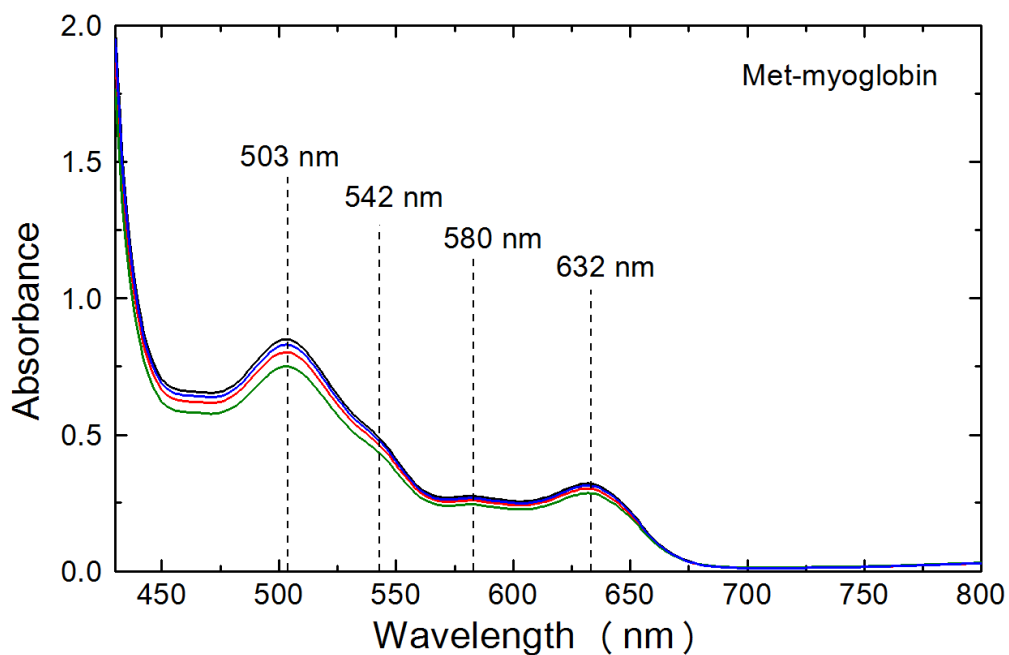


図 A1-9 200 mM (黒)、300 mM (赤)、400 mM (緑)、500 mM (青) 濃度のリン酸バッファーを用いた場合の吸光度測定の結果。503 nm、632 nm はアコメト Mb 由来、542 nm、580 nm は  $\text{Fe}^{2+}$  のオキシメト Mb (Oxymet-Mb) もしくは Low spin のメト Mb 由来。 $\text{Fe}^{2+}$  の場合は High-spin 由来の信号は 503 nm 付近のみで 632 nm は出ない。

### 3. 片付け

- ① ドラフト内にトレーもしくはアルミホイルを敷く。KCN 汚染しているセル等をすべて汚染水浄化用に用意した 200 mL ビーカーに入れ、蒸留水を入れる。無害化のため 1.25 L に対し六粒のウェイストクリーン（次亜塩素酸カルシウム）を入れるので、200 mL に対して一粒入れる。二時間程度待つと良い。
- ② 廃液タンクに液全部を捨て、蒸留水で流水洗浄した後、ビーカーやガラスセルは乾燥機に入れる。
- ③ アルミホイル、プラスチックセルなどはゴミ箱へ捨てる。

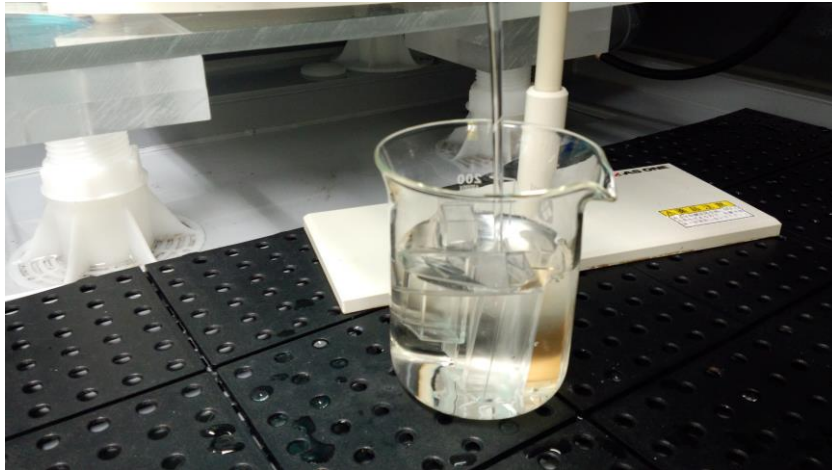


図 A1-10 ドラフト内で廃液処理をしている様子。

紫外・可視吸光度測定の流れ（1 mM の Mb 溶液を作った場合）

- ① 二本のセルに、10 mM リン酸バッファーを入れる。1.5 mL 以上（高さ 1.5 cm 以上）は必要。SAMPLE 側に入れるセルの液量は、メモしておく。下記は 2 mL 入れたとする。
  - ② リン酸バッファーのみのセル（= 0 mM ）を二本用意し、分光機内に入れてベースライン補正。
  - ③ SAMPLE 側のセルから 10 mM リン酸バッファーを 0.2 mL 取り出し、エッペンチューブから 1 mM の Mb を 0.2 mL 加え、蓋をして泡立たないようにセルを上下ひっくり返したりして溶液をしっかりと混ぜる。これで 100  $\mu$ M のセルにする。
  - ④ SAMPLE 側のセルから溶液を 1.8 mL 取り出し、エッペンチューブから 10 mM リン酸バッファーを 1.8 mL 加え、10  $\mu$ M のセルにする。
  - ⑤ SAMPLE 側のセルから溶液を 1.8 mL 取り出し、エッペンチューブから 10 mM リン酸バッファーを 1.8 mL 加え、1  $\mu$ M のセルにする。
- このようにしてセル内濃度を下げていく。10  $\mu$ M や 1  $\mu$ M など、目標の濃度に達したら、まずこの状態で分光測定を行う。次に、ヘモライナック 2 を一滴加え、蓋をして泡立たないようにセルを上下ひっくり返したりして溶液をしっかりと混ぜる。その後もう一度分光測定を行う。
- これでアコメト Mb とシアノメト Mb の吸光度測定が終了する。
- \*セルには、石英セルを使えば、280 nm 付近のタンパク特有の信号もきれいに観測出来る。

## A1-2 アコメトミオグロビン ( $\text{Fe}^{3+}$ , $3d^5$ ) 溶液の精製方法

<項目一覧>

- ① パウダーMb の溶解
- ② CM-Sepharose Fast Flow
- ③ 濃縮
- ④ Sephadex/PD-10 について
- ⑤ もう一つのバッファー交換方法
- ⑥ 濃度測定、精製の評価
- ⑦ リン酸バッファーの作り方
- ⑧ 準備物一覧
- ⑨ 再生して使うもの
- ⑩ その他

### ① パウダーの Mb 溶解

Sigma-Aldrich 社製 95-100 % equine skeletal muscle myoglobin を必要量薬包紙上に取り、ビーカー内で 10 mM Na-Phosphate (K-Phosphate) (pH = 6.0) バッファーに溶かす。溶け残りを除去するためにフィルター濾過するか、遠心分離 (centrifugation) にかける。遠心分離の場合上澄み (sup) のみ別のビーカーに取り出す。リン酸バッファーは、カリウムの方は KPB、ナトリウムの方は NaPB と略すこともある。溶解後、必ず溶液の pH を測定する。だいたい、pH は 6.5 に上がっていることが多いので、pH = 6.0 になるまで 10 mM の  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (もしくは  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) を加えていく。体積が増え、濃度が下がるのは仕方がない。

### ② カラム CM-Sepharose Fast Flow

CM = Carboxy Methyl の略。これはイオン交換クロマトグラフィーであり、含まれるカルボキシイオン末端  $\text{COO}^-$  が負に帯電していることから、pH = 6.9 程度で酸性となり正に帯電したミオグロビン  $\text{Mb}^+$  を捕まえ、ほかのものは先に流し落とすことが出来る。まずはカラムの平衡化を行う。

ガラスフィルター（大きさ 17 の容器、粗さ G2 のグラスター（グラスターはゲルを通さないフィルターである））を吸引ビンにとりつけアスピレータをつなぐ。ガラスフィルターにカラムをいれ、さらに①で用いる pH = 6.0 リン酸バッファーを入れ吸引ろ過する。リン酸バッファーはおよそ 1 L 程度流し続けることでカラムの pH 平衡化が出来る。またアスピレータをつなぐのは、吸引をしないとなかなかリン酸バッファーがカラムを通り抜けられないため、減圧によりはやく平衡化させるためである。平衡化が完了したかは、下部の吸引ビンに落ちてくるリン酸バッファーの pH が 6.0 になっていることで確認出来る。何度か流しては乾燥させることを繰り返し、pH 平衡にする。カラムが乾燥するまで放置すると、カラムの体積が収縮し、ガラス表面から剥がれる。乾燥すると小麦粉が固まった感じになる。これによりカラムを取り出せるようになる。

そのカラムをビーカーに移し、pH = 6.0 リン酸バッファーを入れることで再びゲル状にする。このカラムを、ピペットを用いて三方コックを下端につけたカラム容器に 20 mL 程度入れる（直径 2 cm、高さ 20 cm くらいの容器に 6-7 cm 入れる）。カラム上面は、出来る限りごつごつならないよう平らにする。

まず pH = 6.0 のリン酸バッファーを入れ、コックを開く。流速は適当で速くてもよい。このとき下から出てくる液が pH = 6.0 になっているかをここで再確認する。流し切って確認したらコックを閉じる。

カラム容器上部に管をつけ①で用意したミオグロビン溶液に差し入れておく。カラム容器下部には出てくる液体をうけるためのビーカーを用意する。三方コックを開くと液が落ちてくるが、その際の内圧の低下により上部からはミオグロビンが吸い込まれていく。すべてのミオグロビン溶液がカラム内に溶解すると色が薄まる。充填するカラムの体積はタンパク質の吸着量に合わせて調整するべきである。カラムが上下に長過ぎるとそれだけミオグロビンの通り道は長くなるので、薄い濃度のミオグロビンが出てきてしまう。逆に短過ぎると、変性したミオグロビン（表面のチャージがおかしいもの）を取り除きたいのにその分離が出来なくなるので意味がない。

その後もう一度上から pH = 6.0 のリン酸バッファーを流し、コックを開く。

カラムの三倍体積以上は流す。ゆっくりとした流速でリン酸バッファーが出てくるようにする。このときに吸着しなかった変性ミオグロビンを流し切ることが出来る。コックを閉じる。

その後、溶出をさせるために高濃度の緩衝溶液を加える（後に詳しく記述）。コックを開き、落ちてくるスピードが一秒強の間隔のポタポタであるようにコックの開量を調整する。はじめはミオグロビン以外のものが落ちてくるが、そのうち液に色がついてくるはずである。これが溶出である。色の付き始めがミオグロビンの出始めたときであり、その液を別のビーカーでしっかり集める。これによりうまくいけば 1 mM 以上のミオグロビン溶液が取れるはずである。

溶出させるためには 2 つの方法がある。両者とも原理としては、高いイオン濃度のリン酸バッファーを通すことで、カラムに付着していたミオグロビンが外れて流れやすくなる（クーロン力の低下）。今回は 50 mM K-Phosphate (pH = 7.0) バッファーを流し入れることで一気に溶出させる方法をとる。また、リン酸バッファーに NaCl を混ぜてイオン濃度を上げることで一気に溶出させることも出来る。今回は採用しなかったが、リン酸バッファーの濃度を徐々に上げていくことで少しずつ溶出させていく **gradient** 溶出法で行う方がよりきれいな精製が出来る。

カラムの保存は、リン酸バッファーに浸し、冷蔵庫で保存する。浸さずに放置すると、小麦粉状ではなくさらに乾燥してカチカチになってしまう。

### ③ 濃縮

この濃縮操作により必要な濃度を得る事が出来る。これには、限外ろ過メンブレンを用いる。窒素加圧 (3-5 気圧) により押し出すことで大量のサンプルを濃縮する方法と、少量サンプルを遠心分離により濃縮する方法がある。限外ろ過メンブレンは通す分子の大きさを制限出来る。この大きさの上限を MWCO (Molecular Weight Cut Off) といい、今回は MWCO = 10,000 程度のものを利用すればミオグロビン以外のものは通り抜け、ミオグロビンだけが残ってくれる。今回はエッペンチューブにメンブレンを入れられるキットに、②で精製したミオグロビンを入れて遠心分離に 15 分かける（このキットは

Amicon Ultra という)。遠心分離のスピードは、小さ過ぎると分離にならないが、大き過ぎても全てが無理矢理にメンブレンを通り抜けてしまう。一般的な遠心スピードおよそ 8,000 rpm までのもので行うと良い。このときは冷却機能付遠心分離機を用いる。今回は 50 mL 体積 15 mL の大型エッペンチューブを使用する。(1.5 mL エッペンチューブでは、メンブレン容器部が 250  $\mu$ L しかない。②により生まれたミオグロビン溶液が 100 mL 単位であるために何個にも分けてエッペンチューブにいれなくてはならず面倒である。従って出来るだけ小分け量を減らすために、15 mL のものを採用する。)

#### ④ Sephadex/PD-10 について

濃縮の後、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いてバッファーの交換＝バッファー交換をおこなう。ゲル濾過クロマトグラフィーは分子の大きさによって多孔質ビーズの間の通りにくさの違いを利用して、濾過、分離するものである。今回はミオグロビン以外のものがほぼ含まれていない状態のものを購入しているので、分子量による違いが存在せず、必要ない、というか意味がない。

Sephadex G25 fine を用いる場合は、ゲルの上から平衡化のために新たな pH のバッファーを流し、その後ミオグロビンを流し込み、濾過する。平衡化として流した液が水なら脱塩、バッファーならバッファー交換になる。

最近では簡易なプレパックがあり、ゲルの上にフィルターが付いており、平衡化したあとミオグロビンを入れて放置しておく、それだけで濾過完了になる便利なものもある。

ゲル濾過クロマトグラフィー通過後は濃度が薄くなるので、再度③に戻って濃縮作業をする。

#### ⑤ もう一つのバッファー交換方法

バッファー交換は、アミコンウルトラを用いて、濃縮したミオグロビン溶液に目的のバッファーを入れ、再び二十分程遠心分離を行う。これを三回繰り返せば、 $10^3 = 1,000$  倍希釈になるので、ほぼバッファー交換が出来たと見なせる。こちらの方が簡単。堀谷研、水谷研ではこの方法をとっている。



#### ⑤ 濃度測定、精製の評価

分光計で濃度を測定することにより精製を評価出来る。このとき、280 nm にタンパク質特有の吸収が出て、400 nm 付近にヘム由来の吸収が出る。この400 nm の吸収が280 nm の吸収に比べて大きく出ていないと、ヘムが抜けてしまっていることを意味する。

保存は、溶液測定で使うための低濃度のサンプルを作ったり、高濃度のまま残しておいたりして、エッペンチューブに一回に使う量ずつとっておき、液体窒素デュワーで保存する。使うときは、デュワーから取り出し、溶かして使う。このようにすると、長期間保存出来る。

#### ⑥ リン酸バッファの作り方

リン酸バッファは、1 M リン酸二水素ナトリウム or カリウムと1 M リン酸水素二ナトリウム or カリウムを混ぜ合わせ、それを pH メーターで確認しながら調製して作る。pH メーターの校正は、必ず二点校正もしくは三点校正を行う。今回は、1 M リン酸二水素カリウムと1 M リン酸水素二カリウムをつくる。リン酸バッファを保存するビーカーが清潔であれば、1 M のリン酸バッファはカビが生えにくく、常温でも一年間は保存出来る。従って、1 M、pH = 6.0 のリン酸バッファと、1 M、pH = 7.0 のリン酸バッファの二つを清潔な容器に作って冷蔵庫内に保存すればさらに腐敗しにくく、使用したいときにすぐに使える。

#### ⑦ 準備物一覧

三角フラスコ 500 mL  
シリコン栓 13 号  
吸引濾過びん 1 L 用  
リン酸二水素カリウム  
リン酸水素二カリウム  
純水  
ミオグロビンパウダー

冷却機能付遠心分離機

エッペンチューブ 50 mL

アミコンウルトラ-15

50 mL エッペンチューブブラック

簡易低温維持庫（冷蔵庫）

pH メーターセット

薬包紙

イオン交換クロマトグラフィー用カラム CM-Sepharose Fast Flow

ゲル濾過クロマトグラフィー用カラム PD-10

カラム容器 C-Columns C16/20

三方コック

ビーカー（緩衝溶液調製、イオン高濃度緩衝溶液調製、上澄みミオグロビン  
入れ、平衡化時不要緩衝溶液受け取り、カラム精製時不要液受け取り、カ  
ラム精製時溶出液受け取り）

ガラスフィルターブフナーロート（大きさ 17 の容器、粗さ G2）

金属製アスピレータ

真空輸送チューブ内径 9 mm

ビュレット台

丸型クランプ（小型）

角型ムッフ（蝶型）

（限外濾過メンブレン装着エッペンチューブ 15 mL）

マイクロピペット（正確な容量のはかりとり用）

ピペット（カラム充填用）

セル（分光用）

#### ⑧ 再生して使うもの

限外メンブレンは高価なので、再生させて使う必要がある。その場合、しっ  
かり再生出来たかを評価する方法として電気泳動や可視吸収が使われる。

また、カラムも高価なので再生させて使う。塩濃度の違いを利用して、吸着  
した物質をすべて溶出することで再生出来る。リン酸バッファーに NaCl を

500 mM となるよう混合した溶液を作成し、流すことで再生出来る。

⑨ その他

溶液測定の場合、グリセリンはすべての精製過程終了後に加える。20%配合をする場合は、精製物:グリセリン = 8:2 になるようにすれば良い。

単結晶作成は、pH に気を遣う必要があるなので、ゲル濾過クロマトグラフィーでの精製過程が必要になる。

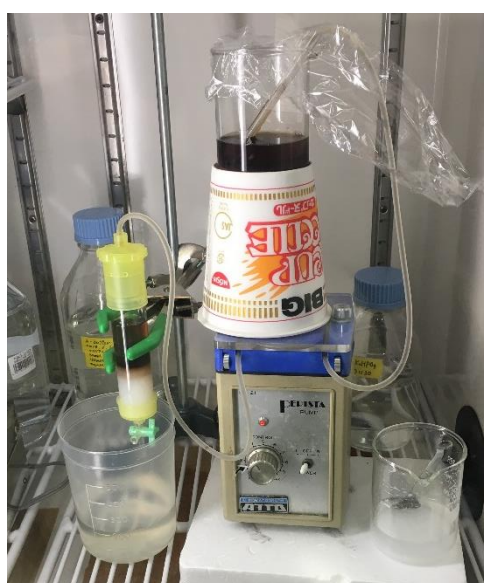


図 A1-11 佐賀大堀谷研での精製の様子。冷蔵庫内で行っている。CM カラムをオープンカラムに詰めて行った。

### A1-3 アコメトミオグロビン ( $\text{Fe}^{3+}$ , $3d^5$ ) 単結晶育成方法

#### <準備物>

ミオグロビン溶液の入ったエッペンチューブ

リン酸緩衝溶液 (イオン濃度は最終的に作る結晶母液により異なる)

硫酸アンモニウム (固形物)

純水

ガラス小瓶 (ガラスバイアルやエッペンチューブでも良い)

1-5 mL マイクロピペット

#### <作成方法>

静置バッチ法を用いて単結晶を作成する。

① 100%飽和硫酸アンモニウムを用意する。

作り方: 固体の硫酸アンモニウムを1 L当たり 767 g の割合になるよう溶解させる。

(例) まず 767 g の硫酸アンモニウムをビーカーに入れ、体積として1 Lになるよう純水を加える。

② ミオグロビンの溶液を用意する。ミオグロビンの濃度は、1 mM や 10 mM など濃ければ微結晶が出来、10-100  $\mu\text{M}$  など薄ければ、核が出来にくい分やっとな出来た核がどんどん一つの大きな結晶になり、1 cm 角近くのものに成長する。カンチレバーに載せることを考えると、微結晶が良いので、高濃度の溶液を用意する。

③ ガラス小瓶の中に、体積にして硫酸アンモニウム 75%、ミオグロビン溶液が 5%、リン酸バッファーが 20%となるように、硫酸溶液、ミオグロビン溶液、リン酸緩衝溶液を混ぜる。こうすることにより 100%飽和硫酸アンモニウムは 75%飽和硫酸アンモニウムになる。リン酸バッファーのリン酸イオン濃度は、全体で 20 mM 程度になるようにする。これらの割合は計算して決める。

#### <条件の変更>

ミオグロビン溶液とリン酸バッファーの割合が5%と20%の割合で行うところを、6-19%、7-18%、8-17%、というように変えていく。つまりは全体の

体積に対するミオグロビンの濃度を変えていく。

その他、ミオグロビン溶液自体のもともとの濃度、pH、リン酸バッファーのイオン濃度を変えることも条件を振ることにつながる。

- ④ ガラス小瓶に入れたら、蓋を閉めて静かに室温で放置する。歩いた時の振動程度なら良いが、冷蔵庫等の振動や、ゆさゆさと揺れるような状況は作らないようにする。うまくいけば 2-3 日で黒っぽい単結晶が出来上がる。高濃度のミオグロビン溶液を用いて微結晶を作る場合、朝放置して夕方には何かが出てくるというくらいはやくに出来はじめる可能性もある。
- ⑤ 単結晶が出来上がったら、ポリエチレンのチューブをバーナーで細くしたものを、パスツールピペットの先に装着し、吸い取って、カンチレバーの上に載せる。
- ⑥ 単結晶に傷をつけない限り、乾燥しても問題はない（X 線回折では乾燥した状態で測定されている）。ガラスキャピラリーなど硬いピペット系の中に単結晶を吸いこんではき出すことは、単結晶を傷つける可能性が高くなる。傷がつくと、構造が崩壊し、不良結晶になるので注意する。カンチレバーの上に結晶を置いたら、濾紙で不要な母液を吸い取り、レバー上で動かないようにする。結晶の向きを決めるために、レバー上で動かす場合は、飽和濃度の高い硫安溶液を浸した濾紙でさわって動かす。

\*成長方向に関することはタンパク質の構造に関するデータベース PDB にアクセスして論文を探す。

\*単結晶作成時にインキュベーターは必要ない。厳密な条件出しがしたいときは使えばよい。目的は ESR 測定なので必要ないと思われる。

\*X 線回折による確認を行っても良いが、見た目では結晶の方向は明瞭に分かるので、行う必要はない。

X-band ESR で確認するなら、1-2 mm の結晶を作れば行える。



図 A1-12 マッコウクジラミオグロビンの単結晶。試料は米国 Pennsylvania 大学米谷隆先生からマッコウクジラ由来ミオグロビンの粉末（CALBIOCHEM 社製、現在は廃番）を提供して頂き、太田研で作成したもの。仕込んでから 15 日後である。おそらく 3 日後には出来上がっていたと思われる（見ていなかっただけ）。六角形の結晶が無数に出来上がっている。中央の大きい結晶で長さ 400  $\mu\text{m}$  程度である。1 cm 以上の単結晶は作成出来なかった。

## Appendix-2

### 大腸菌を用いたタンパク質の大量増量プロトコル（簡易版）

参考文献は[7.9]である。

<主な使用機器一覧その1（培養・集菌・破碎までで必要なもの）>

- ・インキュベーター「SANYO, MIR-162」

シャーレで大腸菌を前培養する際に使用。

- ・オートクレーブ機「トミー精機, LSX-500」

様々な滅菌の場面で使用。

- ・冷凍庫（-80°C、-20°C）

- ・冷蔵庫（4°C）

- ・小容量シェーカー「バイオシェーカー社, BR-22H」

200 mL フラスコで小容量の本培養をする際に使用。

- ・大容量シェーカー「Eppendorf, New Brunswick Scientific Innova43」

5 L フラスコで大容量の本培養をする際に使用。

- ・分光計「GE ヘルスケア, Gene Quant 100」

本培養時、大腸菌の量を OD<sub>600</sub> の値で確認する際に使用。

- ・ボルテックスミキサー「Scientific Industries Inc., VORTEX Genie2」

大腸菌破碎の行程で、50 mL チューブ内を攪拌する際に使用。これに限らず便利。

- ・超音波破碎機「タイテック, VP-30S」

大腸菌破碎時に使用。

- ・バイオクリーンベンチ「SANYO, BIO CLEAN BENCH MCV-B91S」

寒天培地に大腸菌をまく際、この中で行う。

- ・遠心分離機「HITACHI, himac CR-20GII」

大腸菌の集菌・破碎の行程で使用。

<主な使用器具一覧その1（培養・集菌・破碎までで必要なもの）>

- ・5 L フラスコ 6 本
- ・バッフル付 200 mL フラスコ 2 本
- ・金属製スパチュラ
- ・滅菌シャーレ「ASAHI GLASS CO. SH90-15」 2 個
- ・アルミホイル
- ・テルモシリンジ (30 mL)

アンピシリン滅菌処理で使用。

- ・滅菌フィルター「ミリポア Millex (フィルターサイズ 0.22  $\mu\text{m}$ 、タイプ Low Protein Binding)」

アンピシリン滅菌処理で使用。(型番：SLGP033RS)

- ・金属製コップ
- ・滅菌テープ
- ・コンラージ棒
- ・マイクロピペット (各種)
- ・分光用セル
- ・5 L 計量カップ

大腸菌集菌時に使用

- ・遠心分離用 500 mL ボトル 4 本
- ・遠心分離用 50 mL チューブ 2 本

以下 500 mL ボトルと書く。

日立 himac シリーズ。15,000 rpm まで遠心可能。以下 himac 50 mL チューブと書く。

< 試薬等一覧その 1 (培養・集菌・破碎まで必要なもの) >

- ・純水
- ・イーストエクストラクト
- ・トリプトン
- ・寒天 (アガー)
- ・アンピシリンナトリウム (白色粉末)
- ・IPTG (白色粉末)



・コンピテントセル「BioDynamics Laboratory Inc., Zip Competent Cell BL21(DE3)」

BL21 株の大腸菌。

・Mb プラスミド

< 主な使用機器一覧その 2 (精製で必要なもの) >

・pH メーター

・冷蔵庫 (4°C)

・マグネチックスターラー

・分光器 (波長スキャン型のもの)「島津製作所, UV-3150」

< 主な使用器具一覧その 2 (精製で必要なもの) >

・メスシリンダー (500 mL、1 L)

・100 mL、500 mL、1 L ビーカー各種

・金属製スパチュラ

・攪拌回転子

・カラム容器

・テルモシリンジ (50 mL)

・シリコンチューブ

・パスツールピペット

< 試薬等一覧その 2 (精製で必要なもの) >

・純水

・リン酸二水素ナトリウム

・リン酸水素二ナトリウム

・1 N 水酸化ナトリウム水溶液

pH = 6.0 の開始バッファーを作成する際に使用した。

・CM カラム「Whatman, CM52」

準備しておくもの

＜アンピシリン溶液（以下、Amp と略）の作り方＞

- ・保存用に、アンピシリンナトリウムが 50 mg/mL となるよう純水に溶解させる。
- ・ミリポアの Millex を用いてフィルター滅菌する。30 mL テルモシリンジにアンピシリン溶液を入れてからシリンジ先端に Millex を取り付ける。
- ・滅菌済みの 2 mL エッペンチューブに分注して-20 °C以下で保存する。

＜IPTG の作り方＞

- ・保存用に、IPTG が 1 M となるよう純水に溶解させる。
- ・Amp と同じ要領でミリポアの Millex を用いてフィルター滅菌する。
- ・滅菌済みの 2 mL エッペンチューブに分注して-20 °C以下で保存する。

＜LB 寒天培地の作り方＞

- ・2 L フラスコにトリプトン 16 g、イーストエクストラクト 10 g、寒天の粉（アガー）15 g を入れ、1 L の水に溶解させる。
- ・オートクレーブする（121°C、20 分）。トミー精機の「LSX-500」なら、オートクレーブ後に 60 °Cで保温するよう設定出来る。
- ・60 °Cになったら、フラスコを取り出し、Amp を 50 µg/mL 濃度になるよう加える。
- ・滅菌シャーレに入れ、4 °Cの冷蔵庫で寒天を固める。保存も冷蔵庫で良い。

注意点

- ・1 から 4 までの行程は日を空けず 3 日間で一気に行わなければならない。
- ・6 を行ったら、その日のうち 7 を行う。大腸菌を破碎したあとは、Mb が大腸菌のプロテアーゼにさらされて分解される恐れがある。
- ・大腸菌汚染したごみはすべてオートクレーブしてから捨てる。
- ・片付けの際、オートクレーブしないが再利用するものはハイターで殺菌・洗浄する。

(1日目)

1. 2xYT 培地作成

- ・5 L フラスコを 6 本、バッフル付 200 mL フラスコを 2 本用意する。
  - ・5 L フラスコに、トリプトンを 32 g、イーストエキストラクトを 20 g 入れ、さらに水 2 L を入れて溶解する。これを 6 本分行う。
  - ・用意したフラスコすべて (2xYT 培地 2 L の入った 5 L フラスコ×6 本+空の 200 mL フラスコ×2 本) をオートクレーブにかけて滅菌する。
- オートクレーブするにあたり、フラスコの口からゴミが入ることを防ぐため、アルミホイルを各フラスコにかぶせる。さらに滅菌テープをアルミホイルの上から貼る。オートクレーブは液体滅菌モード、121°Cで 20 分行う。



図 A2-1 2xYT 培地の素となるトリプトンとイーストエキストラクトを2Lフラスコに入れた様子。



図 A2-2 2xYT 培地を作成し、フラスコをオートクレーブにかける様子。

## 2. トランスフォーム（形質転換）と LB 寒天培地を用いた前培養

- ・コンピテントセル（エッペンチューブ 2 本）を冷凍庫から取り出し氷上で解凍する。

- ・コンピテントセル 0.1 mL（白色の溶液）が入ったエッペンチューブに、プラスミド溶液（無色透明）1  $\mu$ L を入れる。

（今回は、長期間プラスミドを使用していなかったらしく、経年劣化によりプラスミドが加水分解している可能性もあるため、5  $\mu$ L 入れたものも作った（1  $\mu$ L 入れたものが 1 本、5  $\mu$ L 入れたものが 1 本、合計 2 本）。）

- ・チューブを指で軽くはじいて液を混ぜ、氷上にエッペンチューブを差込み 5 分待つ。

- ・ここからバイオクリーンベンチ内で作業する。

コンピテントセルとプラスミドの混合溶液をマイクロピペットで全量取り出し、LB 寒天培地にかける。コンラージ棒で寒天培地全体にのぼす。（1 個のシャーレにつき 1 本のエッペンチューブ全量をかける。合計 2 個のシャーレを使う。）

- ・シャーレに蓋をし、ひっくり返して（寒天培地を上側、蓋を下側）、37  $^{\circ}$ C のインキュベーターに入れて一晩放置。

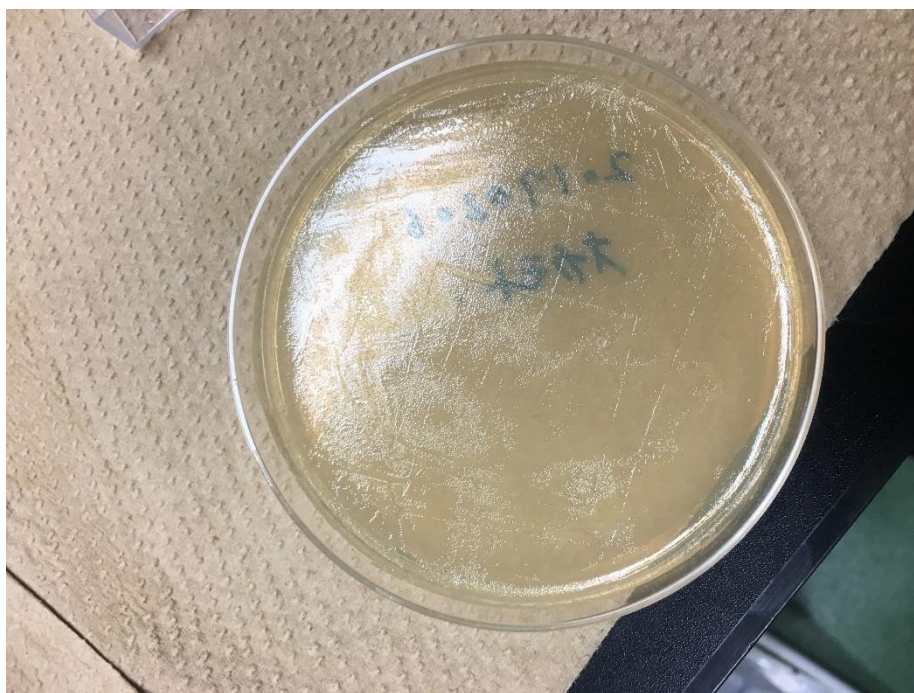


図 A2-3 寒天培地シャーレに形質転換したコンピテントセルを塗り付けた後の様子。

(2日目)

3. 大腸菌の本培養（大量培養）

<まず 200 mL のフラスコ 2 本を用いて、少量培養を行う。>

- ・インキュベーターに放置していた寒天培地を取り出す。コロニーが出来ていることを確認する。
- ・滅菌しておいた空の 200 mL フラスコ 2 本それぞれに 5 L フラスコ中の 2xYT 培地を 100 mL ずつ入れる。
- ・200 mL フラスコ中の培地をマイクロピペットで 2 mL 程度とり、各寒天培地に入れ、コンラージ棒で大腸菌をこすり取る。寒天からはがせたら、全液を 200 mL フラスコへ戻す。2、3 回これを繰り返して、出来るだけすべての大腸菌をフラスコに入れる。一つのフラスコに対して一つの寒天培地の大腸菌を入れる。元々使っていたアルミホイルでフラスコに蓋をする。
- ・Amp を 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるよう加える。
- ・出来上がった Amp 入りの 200 mL フラスコ 2 本を、シェーカー（バイオシェーカー社、BR-22H）に入れる。設定は 37°C、180 rpm で 3 時間待つ。
- ・3 時間後、200 mL フラスコを取り出す。



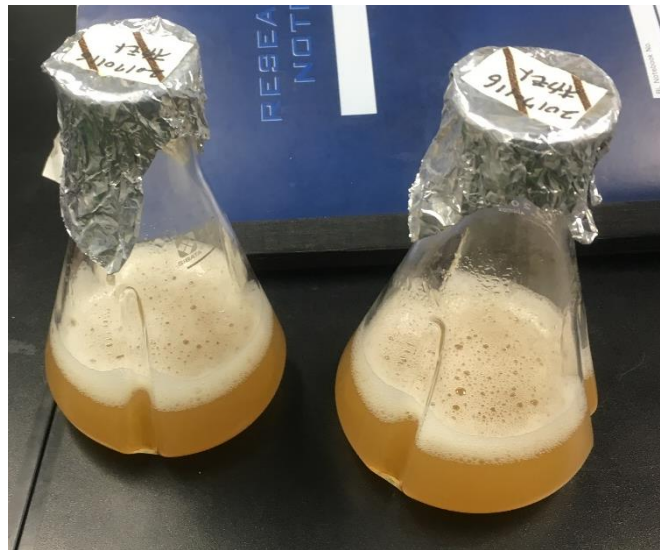
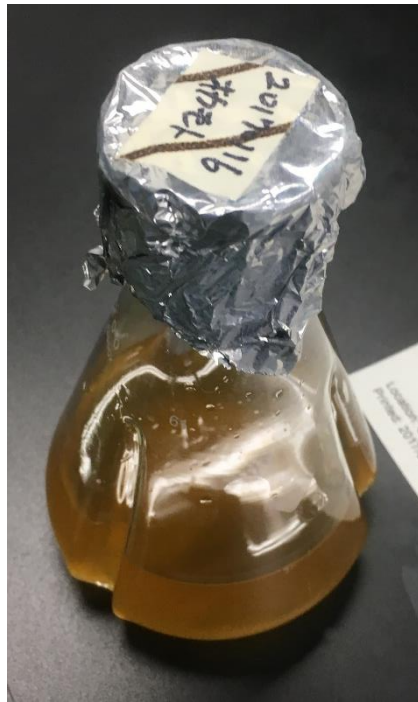


図 A2-4 200 mL フラスコで培養する前（上）と培養した後（下）。

<ここから 5 L フラスコ 6 本を用いて大量培養を行う。>

・一方のフラスコ中の培地 100 mL すべてをもう一方の 200mL フラスコに直接注ぎ入れてひとつにまとめ、少しフラスコを振って濃度を均一にする。

・ 5 L フラスコに、200 mL フラスコの培地を 20 mL ずつ入れていく。さらに Amp を 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるよう再度加える。これを 6 本の 5 L フラスコに対して行う。元々使っていたアルミホイルでフラスコに蓋をする。

・ 5 L フラスコ 6 本をシェーカー (Eppendorf 製、New Brunswick Scientific, Innova43) に入れる。設定は 37°C、140 rpm。

・まずスタート直後に大腸菌の濃度を知るために、少量の培地を分光用セルに入れ、分光器 (Gene Quant 100) で 600 nm での OD を測定する。おそらくこのときは  $\text{OD}_{600} = 0.6$  には達していないと思われる。振とう開始から 30 分ごとに培地を 5 L フラスコから取り出し、分光器で  $\text{OD}_{600}$  値を測定、記録することを繰り返す。30 分ごとにだんだん  $\text{OD}_{600}$  値が上昇すると思われるので、 $\text{OD}_{600} = 0.6$  付近になるまで繰り返す。

今回の培養では、5 L フラスコで振とう開始してから 2 時間で、 $\text{OD}_{600} = 0.564$  となった。

・  $\text{OD}_{600} = 0.6$  付近になったら、5 L フラスコ 6 本すべてに IPTG を 1 mM とするように加え、一晩放置する。



図 A2-5 2L フラスコで振とう培養を一晩行った後の様子。

(3 日目)

#### 4. 集菌

- ・ 500 mL の遠心分離用ボトルを 4 本用意する。
- ・ 使用する遠心分離機は「HITACHI himac CR 20GII」。
- ・ 5 L フラスコをシェーカーから取り出す。まず 1 本の 5 L フラスコ中の 2 L の培地すべてを 5 L 計量カップにうつす。4 本の 500 mL ボトルそれぞれに、8-9 割程度の量まで培地を入れる。
- ・ 遠心分離機の対角に入るボトルの重量は純水を加えて合わせる。
- ・ 8,000 rpm、4 °C で 10 分間遠心分離する。
- ・ 遠心分離後、上澄み液を捨てる（残しておく）。
- ・ ここまでの作業を 5 L フラスコ 6 本にある培地すべてに対して繰り返す。
- ・ さらに大腸菌をまとめていく。himac 50 mL チューブを 2 本用意する。金属製スパチュラを使って、500 mL ボトル 2 本分の大腸菌を 1 本の himac 50 mL チューブに移す（500 mL ボトルは 4 本あるので合計 2 本作る）。500 mL ボトル内やスパチュラに大腸菌を残さないよう、残しておいた上澄み液に溶かして himac 50 mL チューブにすべて移す。
- ・ 2 本のチューブの重量を純水を加えて合わせ、8,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離する。
- ・ 遠心分離後、上澄み液をすてる。
- ・ -80 °C の冷凍庫で一晩冷凍する。



図 A2-6 500 mL の遠心分離用ボトルにたまった大腸菌。

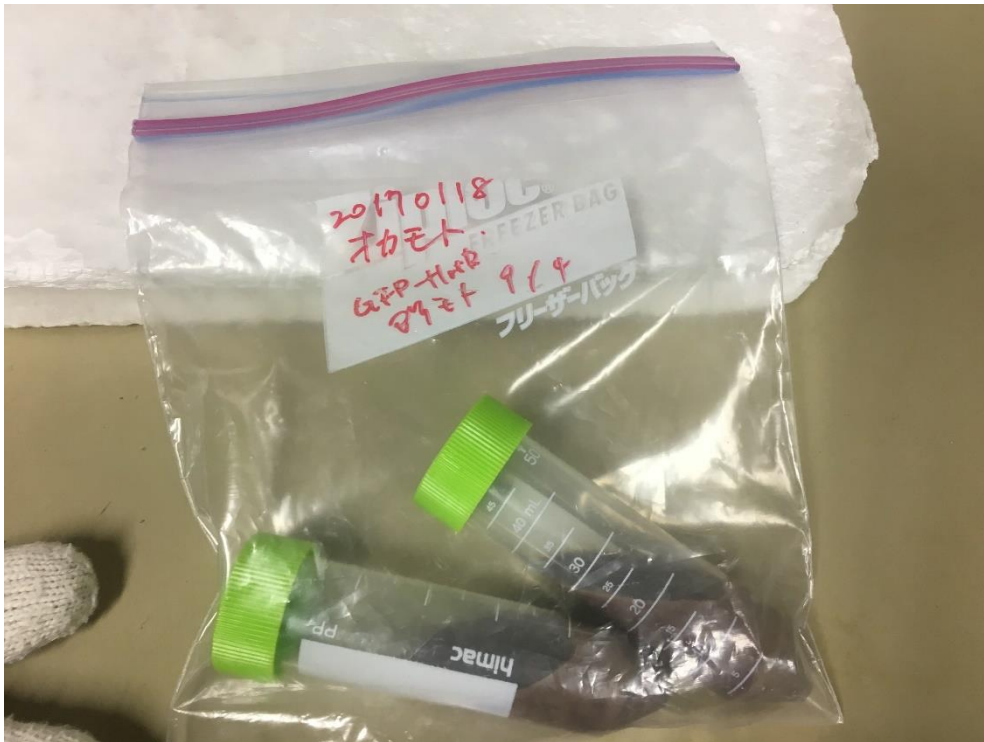


図 A2-7 himac エッペンチューブを $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存する前の様子。上澄み液は取り除かれている。

5. バッファー、陽イオン交換カラムの準備

- ・明日の精製のためにバッファーと陽イオン交換カラム（CM カラム）を準備する。

<リン酸バッファーについて>

「A」開始バッファーは pH = 6.0、10 mM リン酸バッファー、

「B」溶出バッファーは、10 mM リン酸水素二ナトリウム水溶液を用いる。

<カラム>

- ・開始バッファー「A」を用いて CM カラムを pH = 6.0 に平衡化しておく（既製品のカラムを使う場合は、精製の段階で行う）。

(4日目)

## 6. 大腸菌の破碎

- ・大腸菌の入った2本の himac 50 mL チューブを、冷蔵庫へ入れておき、解凍する。

- ・発泡スチロール容器にクラッシュドアイスを入れ、そこに解凍した himac 50 mL チューブと、金属製コップを差し込む。

開始バッファ「A」を himac 50 mL チューブの 35 mL の線まで入れ、ボルテックスで攪拌する。50 mL 満タンまで入れてしまうと、溶液がかき混ぜりにくくなるので、35 mL 程度が丁度である。溶液中に大腸菌が溶け切らなくても、チューブからはがれさえすればよい。この作業を2本のチューブ両方に行う。

- ・超音波破碎機を用いて大腸菌の破碎を行う。

2本のチューブ内の大腸菌をすべて金属製のコップに流し入れてまとめる。

1度移しただけでは、チューブ内に大腸菌が残っているので、さらにチューブに10 mL 程度「A」を入れて攪拌し、すべての大腸菌をコップへ移す。

- ・超音波破碎機のパワー調整を行う。

- ・超音波破碎では発熱が大きいため、コップ内の温度上昇を防ぐために氷上にコップを埋め込んだまま超音波破碎を行う。

- ・90 sec の破碎を、インターバルを 30 sec 以上おいて、5 回行う。インターバル中に、コップが温まっていないか手で確認し、大丈夫であれば続行する。

- ・90 sec×5 回=450 sec の破碎完了後、大腸菌を himac 50 mL チューブ 2 本に等分量になるよう戻し、純水で重量を合わせて、遠心分離を行う。

- ・8,000 rpm では落とせない不純物も取り除くため、14,000 rpm、4 °C で 30 分行う。

- ・遠心分離後の上澄み液 (Mb が入っていて赤色) を、氷上に置いた 200 mL フラスコに採集する。以下、このフラスコ内の溶液を Mb 溶液と呼ぶ。



図 A2-8 大腸菌を破碎中している様子。



## 7. 精製

- ・ 10 mM リン酸二水素ナトリウム水溶液を 1 L 以上用意する。
- ・ Mb 溶液が pH = 6.0 になるように、10 mM リン酸二水素ナトリウム水溶液を加えて、pH を下げていく。(元々 75 mL ほどしかなかった Mb の溶液が、この作業により 1.2 L 程度にまで体積が膨らんだ。)
- ・ pH = 6.0 に平衡化した CM カラムを、カラム容器に詰める。(既製品を使用する場合はこの時点で pH = 6.0 の緩衝液をカラムの 3 倍体積以上流して平衡化しておく。)
- ・ 開始バッファ「A」をカラム容器に入れ、カラムが pH = 6.0 であることを確認する。
- ・ Mb 溶液をカラムに通し Mb を吸着させる。
- ・ 「洗い」を行う。カラム中の不純物をおとすために、開始バッファ「A」をカラム体積の 3 倍量流す。その後さらに、開始バッファ「A」と溶出バッファ「B」を 50 % ずつの割合で混合した溶液を作り、カラム体積の 2 倍量流す。このときはまだ Mb は吸着したままで溶出しない。
- ・ 最後に「溶出」を行う。溶出バッファ「B」をカラム容器に入れ、Mb の色のついた溶液が出てきたら、200 mL フラスコにとる。溶出は、ACTA という自動精製を用いて行うことも可能 (図 A2-12)。
- ・ 色が茶色であれば  $\text{Fe}^{3+}$  であるが、この時点では  $\text{Fe}^{2+}$  で溶出している可能性が高い。そこで、フェリシアン化カリウムを十分量入れて、酸化し、 $\text{Fe}^{3+}$  ミオグロビンにする。アミコンウルトラ 15 を用いて Buffer 交換することによりフェリシアン化カリウムを取り除く。1,000 倍希釈まで行えば十分である (はじめはフェリシアン化カリウムの黄緑色がきついと思うが、1,000 倍希釈すれば色はなくなっているはず)。



図 A2-9 pH = 6.0 に調整している様子。

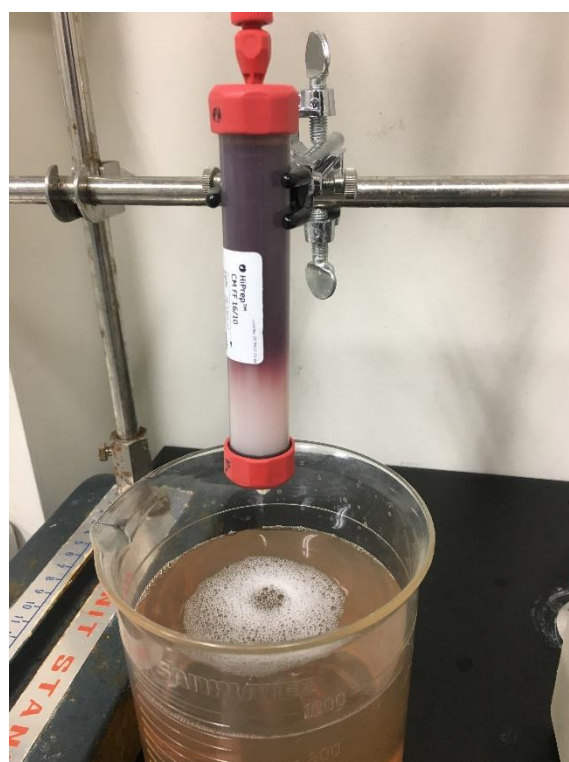


図 A2-10 CM カラムにミオグロビンを吸着させている様子。



図 A2-11 ACTA を用いてコンピューターにより gradient 溶出させている様子。



図 A2-12 得られたミオグロビン溶液。赤いので恐らく  $\text{Fe}^{2+}$  になっている。

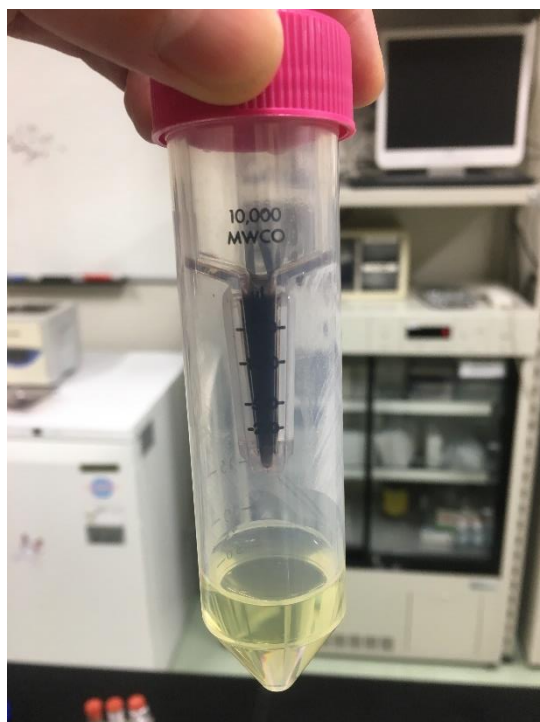


図 A2-13 Buffer 交換の様子。下にはフェリシアン化カリウムの入った溶液が出ている。

#### 8. 吸光度測定による精製後の Mb 溶液の評価

- ・得られた Mb 溶液に対して、分光光度計（島津製作所 UV-3150）により吸光度測定を行う。400 nm 付近のヘムの吸収ピーク強度が、280 nm 付近のタンパク質特有の吸収ピーク強度に対して 3.5 倍以上になっていることを目安に、良質な Mb 溶液が得られているかを確認する。

## Appendix-3

### DFT 計算を用いたヘミンクロライドのゼロ磁場分裂定数の比 $|E/D|$ の見積もりについて

ここでは、本文 4-4.4 節で議論した量子化学計算によるヘミンクロライドのゼロ磁場分裂定数の比 $|E/D|$ の導出過程について詳細に説明する。量子化学計算は、Schrödinger 方程式を可能な限り厳密に解くことで、実験結果と比較しうる結果を得ることが出来る。しかし、完全に厳密な計算をすることは実際には困難であるので、いくつかの近似が導入される。

本研究では、DFT 計算（Schrödinger 方程式の代わりに、それと等価な Kohn-Sham 方程式に基づく計算）を使用した。DFT 計算では、「計算手法の種類」と、「基底関数の種類」をあらかじめ決める必要がある。前者は、Schrödinger 方程式の近似方法の種類を意味している。一方後者は、方程式上の波動関数を既知の関数で近似することに対応しており、用いる関数の種類を意味している。DFT に関連する計算手法の種類は、「汎関数」と呼ばれることもある。この計算手法と基底関数に何を採用するかで、計算精度や計算時間が決定される。その選択は、分子の構造や、含まれる元素の種類等で適切に選択する必要がある。本研究では計算手法の種類として「B3LYP」を使用し、基底関数として「6-31g(d, p)」を使用した。両者を合わせて「B3LYP/6-31g(d, p)」と表記することもあり、これを「基底汎関数」と呼ぶことがある。本研究では Gaussian09 と呼ばれるソフトを使用した。これは神戸大学大学院理学研究科化学専攻の小堀康博教授が所有しており、先生のノートパソコン(Mac)を用いて計算を行った。

本研究で $|E/D|$ を見積もるためには、ヘミンクロライドの基底状態  $S = 5/2$  と、励起状態  $S = 3/2$  を計算する必要がある。基底状態に対しては六重項を仮定した時間発展のない DFT 計算、励起状態に対しては四重項を仮定した時間発展のある DFT 計算 (TD-DFT) を行った。当然ながら、原子座標の構造最適化は行っていない。

図 A3-1(a)に、六重項 ( $S = 5/2$ ) を仮定し、時間発展を考えない DFT 計算を行った結果を示す。図上部の SCF Done は、六重項で計算した時の系全体の最

も安定なエネルギーレベルを示しており、 $-3558.63490590$  [a.u.]である。ここで、[a.u.]はハートリー (Hartree) を意味しており、 $1$  [a.u.] =  $27$  [eV] =  $216,000$  [cm<sup>-1</sup>]である。図中左の構造はヘミンクロライドの立体構造に電子密度を重ねて表したものである。青い部分が電子密度の高い部分である。Fe 原子周囲は等方的に電子密度を形成していることが分かる。また図中右の表は各分子軌道のエネルギー準位を示している。ここでは  $\alpha$  スピン (表の左側) を見て、 $d_{xz}$  軌道、 $d_{yz}$  軌道、 $d_{x^2-y^2}$  軌道の電子密度が現れる準位を探す。図 A3-1(b)は、図 A3-1(a)の表で番号付けされている各分子軌道のエネルギー準位における電子密度をヘミンクロライドの立体構造上に重ねて示している。これを見ると。様々な形の電子密度が各準位に現れている。この中で、162A と 163A を見てみる。図 A3-1(c)は、162A (上) と 163A (中央) を斜めから観察した様子である。電子密度の閾値を上げて、比較的電子密度の高い部分だけが残るようにしている。鉄イオン周囲の電子密度は高いことが分かり、その形は $d_{xz}$  軌道および $d_{yz}$  軌道に対応する電子密度になっていることが分かる。また、170A は、Fe 原子周囲で $d_{x^2-y^2}$  軌道の電子密度の形が現れていることが分かった。

次に、図 A3-2(a)に、四重項 ( $S = 3/2$ ) を仮定し、時間発展を考えて DFT 計算を行った結果を示す。図上部の SCF Done は、四重項で計算した時の系全体の最も安定なエネルギーレベルを表しており、 $-3558.62412059$  [a.u.]である。図中左の電子密度の様子を、図 A3-1(a)のものと比べてみると、明らかに四重項の方が、Fe 原子の配位子である N 原子方向 (xy 方向) の電子密度が低くなっている。これは、 $d_{x^2-y^2}$  軌道の電子密度が下がっていることを示唆しており、ゼロ磁場分裂定数の議論で考えている励起状態の  ${}^4A_2'$ 、 $E_x$ 、および  $E_y$  の電子配置に対応している。図 A3-2(b)は、図 A3-2(a)の表で番号付けされている各分子軌道のエネルギー準位における電子密度をヘミンクロライドの立体構造上に重ねて示している。この中で、162A と 163A は、Fe 原子周囲で $d_{xz}$  軌道および $d_{yz}$  軌道に対応する電子密度の形になっており、また 172A は、Fe 原子周囲で $d_{x^2-y^2}$  軌道の電子密度の形が現れていることが分かった。

ここから、4-5 式にパラメータを代入するために、 $\Delta({}^4A_2')$ 、 $\Delta(E_x)$ 、 $\Delta(E_y)$ をどのように決めていくか説明する。六重項の DFT 計算と、四重項の TD-DFT 計算それぞれの結果において、電子密度を眺めただけでは、正しい  $3d$  軌道のエネルギー

ギー準位なのかは正確に判別することは出来ない。つまり、Fe 原子周囲の電子密度の形が類似するエネルギー準位が複数存在する場合に、少なくとも間違っていないという証拠付けが出来る準位を選ぶ必要がある。そこで、次のように判別することにした。

図 A3-3 は、斜方対称場における基底状態と励起状態のエネルギー関係および  $E_x$  状態と  $E_y$  状態の  $3d$  軌道を表している。ここで、 $d_{xz}$  軌道と  $d_{x^2-y^2}$  軌道のエネルギー差を  $\Delta X$ 、 $d_{yz}$  軌道と  $d_{x^2-y^2}$  軌道のエネルギー差を  $\Delta Y$  とする。励起状態の四重項  $E_x$  状態と  $E_y$  状態では、いずれも  $d_{x^2-y^2}$  軌道にスピンの入らず、 $d_{xz}$  軌道および  $d_{yz}$  軌道のいずれかに二つのスピンが入る。したがって、六重項の DFT 計算結果から得られる  $\Delta X$  (もしくは  $\Delta Y$ ) よりも、四重項の TD-DFT 計算結果から得られる  $\Delta X$  (もしくは  $\Delta Y$ ) の方が大きければ、六重項の場合より四重項の場合の方が  $d_{x^2-y^2}$  軌道にスピンを配置しにくくなるので、そのような関係になるようなエネルギー準位を選べば良い。

まず、六重項について、先ほど述べたように図 A3-1(b)から、162A と 163A は  $d_{xz}$  軌道および  $d_{yz}$  軌道、170A は  $d_{x^2-y^2}$  軌道と仮定した。162A と 163A どちらが  $d_{xz}$  軌道と  $d_{yz}$  軌道に当たるのか判別は出来ないが、ここでは 162A を  $d_{xz}$  軌道、163a を  $d_{yz}$  軌道としておく。図 A3-1(a)中の表から、162A、163A、および 170A のエネルギーはそれぞれ、-0.26823 [a.u.]、-0.26756 [a.u.]、-0.22813 [a.u.]である。したがって、 $\Delta X_{\text{sextet}} = 0.0401$  [a.u.]、 $\Delta Y_{\text{sextet}} = 0.03943$  [a.u.]、 $\Delta X_{\text{sextet}} - \Delta Y_{\text{sextet}} = 0.00067$  [a.u.]となる。

同様に、四重項について、図 A3-2(b)から、162A と 163A は  $d_{xz}$  軌道および  $d_{yz}$  軌道、172A は  $d_{x^2-y^2}$  軌道と仮定した。ここでは 162A を  $d_{xz}$  軌道、163A を  $d_{yz}$  軌道としておく。図 A3-2(a)中の表から、162A、163A、および 172A のエネルギーはそれぞれ、-0.25055 [a.u.]、-0.24997 [a.u.]、-0.10925 [a.u.]である。したがって、 $\Delta X_{\text{quartet}} = 0.1413$  [a.u.]、 $\Delta Y_{\text{quartet}} = 0.14072$  [a.u.]、 $\Delta X_{\text{quartet}} - \Delta Y_{\text{quartet}} = 0.00058$  [a.u.]となる。

これらの結果から、 $\Delta X_{\text{sextet}}$  や  $\Delta Y_{\text{sextet}}$  よりも、 $\Delta X_{\text{quartet}}$  や  $\Delta Y_{\text{quartet}}$  の方が一桁程度大きく、選んだエネルギー準位は  $d_{xz}$  軌道、 $d_{yz}$  軌道、 $d_{x^2-y^2}$  軌道と見なして確からしいと言える。

また、 $\Delta X \sim \Delta Y \gg \Delta X - \Delta Y$  であるので、ここからは  $\Delta(E_x) \sim \Delta(E_y) \gg \Delta(E_x) - \Delta(E_y)$  として考える。

まず、 $\Delta(^4A_2)$  を求める。SCF Done は、各計算結果の中で最も安定なエネルギー準位を意味しているので、六重項の DFT 計算で算出された SCF Done は  $^6A_1$  に相当し、四重項の TD-DFT 計算で算出された SCF Done は  $^4A_2'$  に相当する (励起状態の中で最低準位にあるため)。よって、二つの SCF Done の差が  $\Delta(^4A_2)$  に相当し、 $\Delta(^4A_2) = 0.01078531$  [a.u.] =  $2329$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] と見積もられる。

次に、 $\Delta(E_x)$  および  $\Delta(E_y)$  を求める。図 A3-2(c) に、四重項の励起状態に関するログを示す。この図は、どの準位間で確率振幅があるかを表しており、またその励起エネルギーがいくらかも示されている。例えば 162A と 172A との間に確率振幅がある場合、表の中に  $162A \rightarrow 172A$  などのように表されている。これは、両準位間にスピン-軌道相互作用があることに対応している。図を見ると、Excited State 2 に、 $162A \rightarrow 172A$  があり、励起エネルギーは  $1.0464$  eV となっている。また、Excited State 3 には、 $163A \rightarrow 172A$  があり、励起エネルギーは  $1.0559$  eV となっている。これらはまさに  $d_{xz}$  軌道と  $d_{x^2-y^2}$  軌道、もしくは  $d_{yz}$  軌道と  $d_{x^2-y^2}$  軌道の間でスピンの移動する可能性を示している。ここに書かれている励起エネルギーの値は、 $^6A_1$  状態からのエネルギー差を表している。よって、 $\Delta(E_x) \sim 8371.2$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]、 $\Delta(E_y) \sim 8447.2$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] と見積もられる。

さらに、 $\Delta(E_x) - \Delta(E_y)$  は、 $\Delta X_{\text{quartet}} - \Delta Y_{\text{quartet}}$  の値を使用すると、 $\Delta(E_x) - \Delta(E_y) = 125$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] と見積もられる。

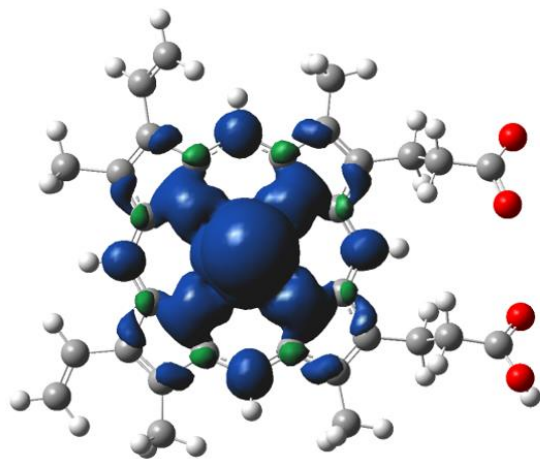
これらを用いて、4-5 式に代入し、 $|E/D|$  を計算すると、 $|E/D| \sim 0.002$  と見積もられる。



-----  
# ub3lyp/6-31g(d,p) geom=connectivity  
-----

Charge = 0 Multiplicity = 6

SCF Done: E(UB3LYP) = -3558.63490590 A.U. after 28 cycles



176	↑	-0.00358	176	↓	-0.00261
175	↑	-0.02952	175	↓	-0.02835
174	↑	-0.08221	174	↓	-0.04646
173	↑	-0.08710	173	↓	-0.07074
172	↑	-0.18981	172	↓	-0.07277
171	↑	-0.19620	171	↓	-0.07939
170	↑	-0.22813	170	↓	-0.09356
169	↑	-0.23171	169	↓	-0.09619
168	↑	-0.23457	168	↓	-0.09836
167	↑	-0.23627	167	↓	-0.19048
166	↑	-0.23949	166	↓	-0.20336
165	↑	-0.24068	165	↓	-0.22804
164	↑	-0.24907	164	↓	-0.23271
163	↑	-0.26756	163	↓	-0.23410
162	↑	-0.26823	162	↓	-0.23720
161	↑	-0.27216	161	↓	-0.24248
160	↑	-0.27826	160	↓	-0.25075
159	↑	-0.28624	159	↓	-0.27033

図 A3-1(a) 六重項 ( $S = 5/2$ ) を仮定し、時間発展を考えない DFT 計算を行った結果。左の構造はヘミンクロライドの立体構造と電子密度、右の表は各分子軌道のエネルギー準位を示している。表の左は  $\alpha$  スピン (アップスピン)、右は  $\beta$  スピン (ダウンスピン) を表している。

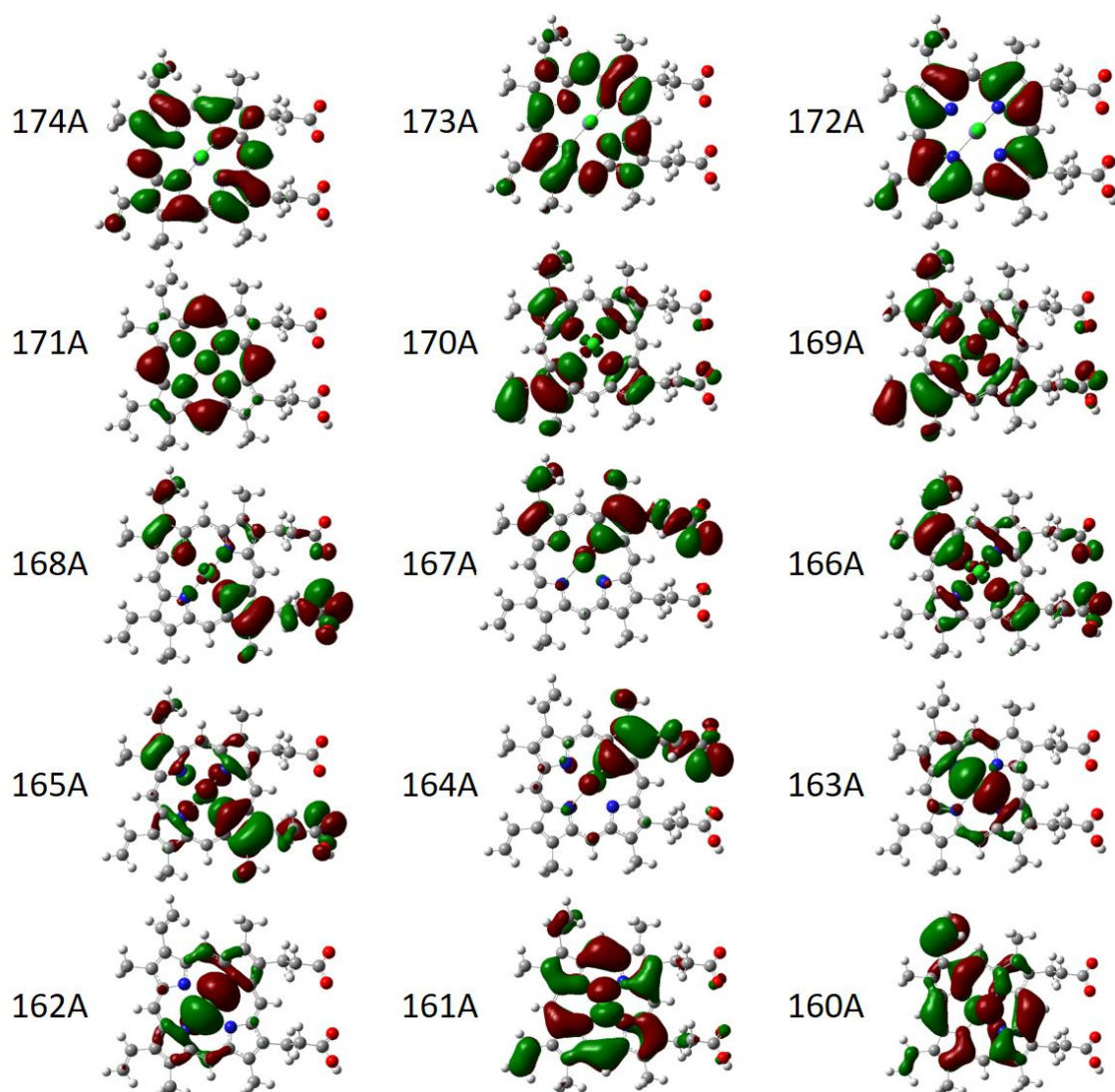


図 A3-1(b) 図 A3-1(a)の表で番号づけされている各分子軌道のエネルギー準位における電子密度をヘミンクロライドの立体構造上に重ねたもの。全て  $\alpha$  スピンの電子密度である。162A と 163A に  $d_{xz}$  軌道、 $d_{yz}$  軌道に対応する電子密度が現れており、166A もしくは 170A に  $d_{x^2-y^2}$  軌道に対応する電子密度が現れている。

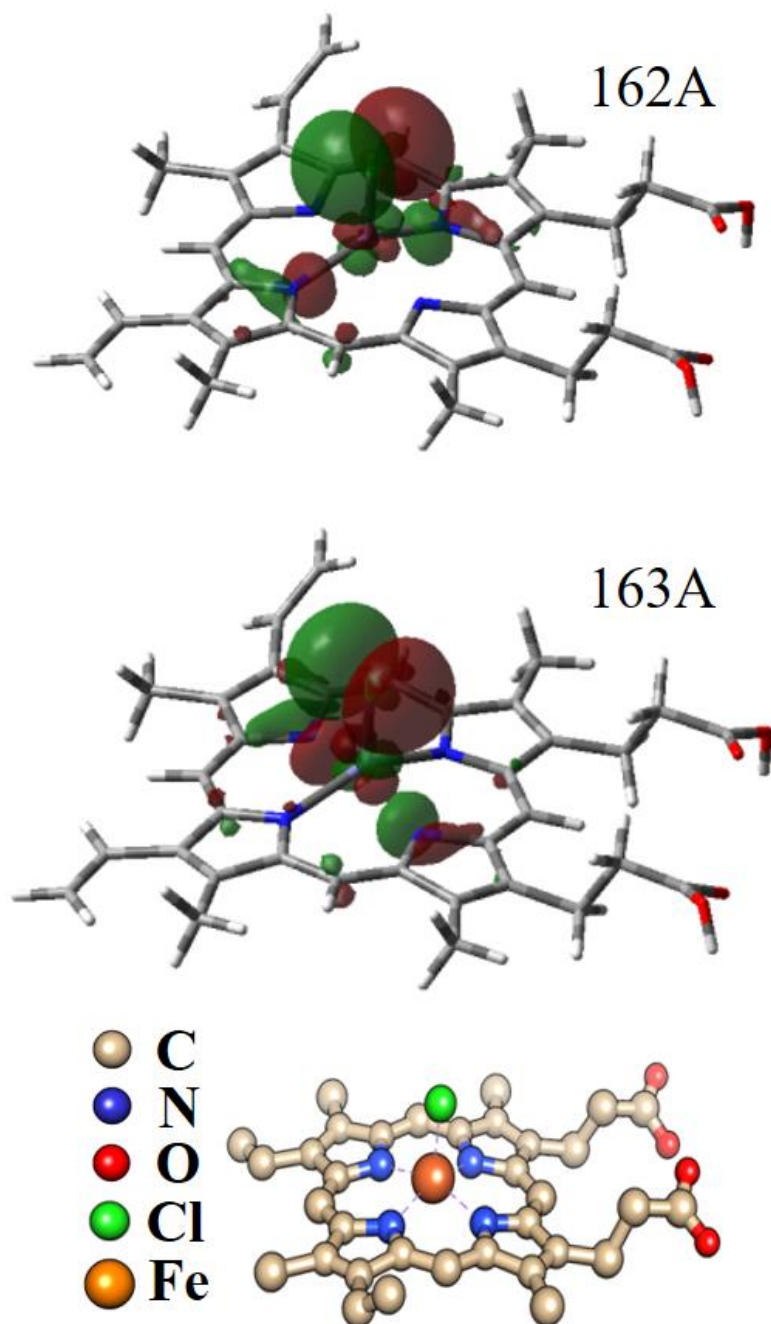


図 A3-1(c) 図 A3-1(b)の 162A (上) と 163A (中央) を斜めから観察した様子。電子密度の閾値を上げて、比較的電子密度の高い部分だけが残るようにしている。中心付近に電子密度が高いことが分かり、鉄イオン周囲に $d_{xz}$ 軌道および $d_{yz}$ 軌道に対応する電子密度が現れている。元素の種類が分かりやすいように、Ball & Stick で描いたヘミンクロライドの立体構造も下部に示した。

```
-----
# td ub3lyp/6-31g(d,p) geom=connectivity
-----
SCF Done: E(UB3LYP) = -3558.62412059 Charge = 0 Multiplicity = 4
A.U. after 31 cycles
```

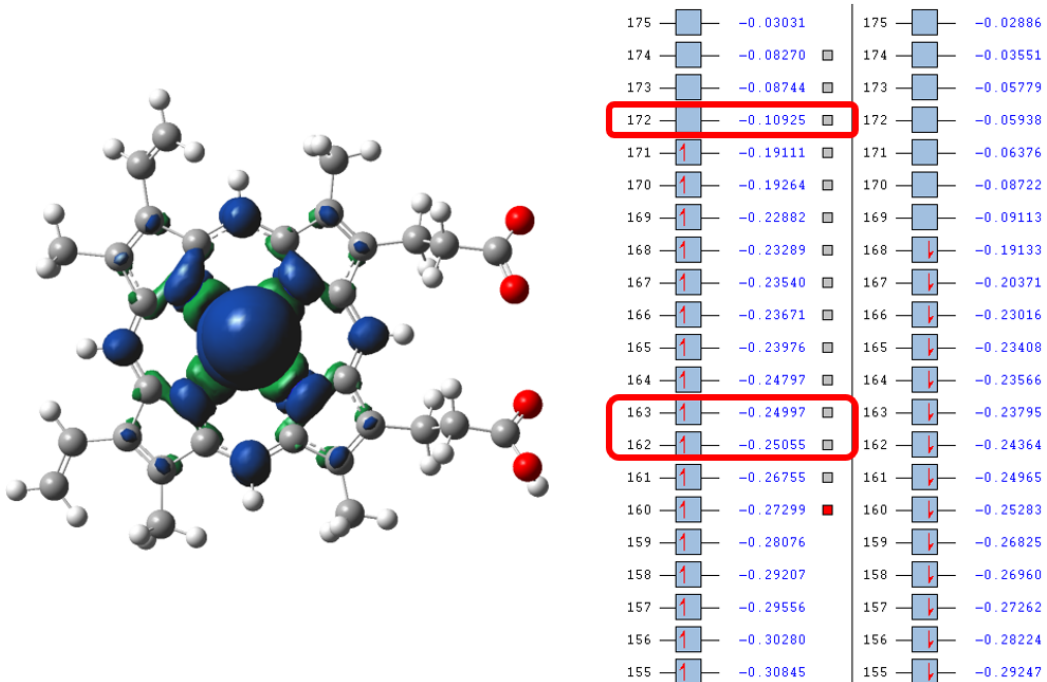


図 A3-2(a) 四重項 ( $S = 3/2$ ) を仮定し、時間発展を考慮して DFT 計算を行った結果。左の構造はヘミンクロライドの立体構造と電子密度、右の表は各分子軌道のエネルギー準位を示している。上の表の左は  $\alpha$  スピン (アップスピン)、右は  $\beta$  スピン (ダウンスピン) を表している。

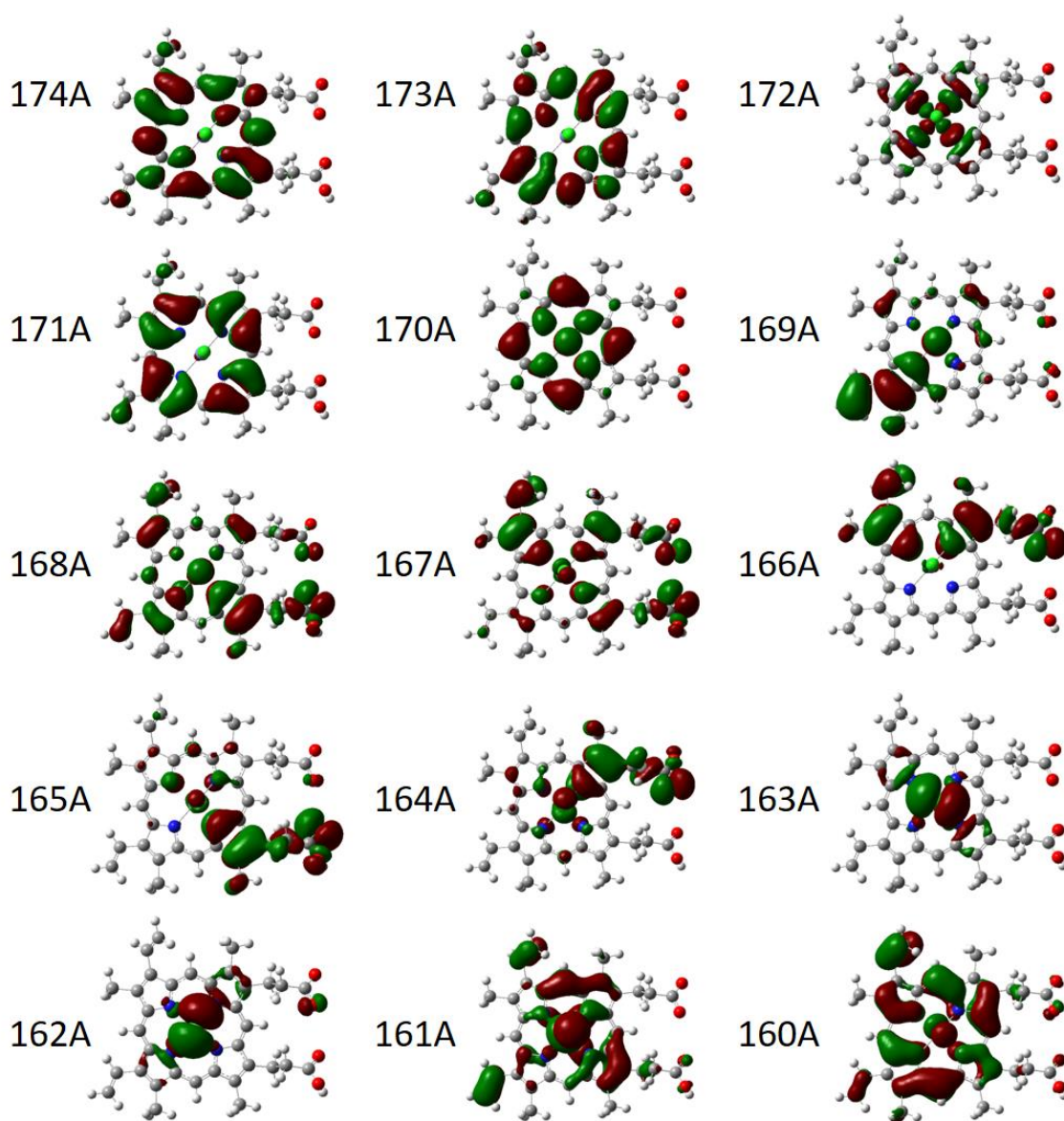


図 A3-2(b) 図 A3-2(a)の表で番号づけされている各分子軌道のエネルギー準位における電子密度をヘミンクロライドの立体構造上に重ねたもの。全て  $\alpha$  スピンの電子密度である。162A と 163A に  $d_{xz}$  軌道、 $d_{yz}$  軌道に対応する電子密度が現れており、172A に  $d_{x^2-y^2}$  軌道に対応する電子密度が現れている。

Excitation energies and oscillator strengths:

```
Excited State 1: 4.137-A      0.8456 eV 1466.30 nm  f=0.0000 <S**2>=4.029
 134A ->172A      -0.11784
 161A ->172A      -0.17369
 168A ->172A       0.18310
 169A ->172A       0.22912
 170A ->172A       0.88127
 171A ->172A       0.21453
```

This state for optimization and/or second-order correction.

Total Energy, E(TD-HF/TD-KS) = -3558.59304685

Copying the excited state density for this state as the 1-particle RhoCI density.

```
Excited State 2: 4.028-A      1.0464 eV 1184.85 nm  f=0.0000 <S**2>=3.806
 162A ->172A      -0.15852
 160B ->169B       0.10070
 160B ->170B      -0.31378
 160B ->172B      -0.58010
 161B ->169B      -0.10579
 161B ->170B       0.32168
 161B ->172B       0.58956
```

```
Excited State 3: 4.028-A      1.0559 eV 1174.24 nm  f=0.0000 <S**2>=3.807
 163A ->172A      -0.16990
 160B ->169B       0.27926
 160B ->170B       0.12300
 160B ->173B       0.56628
 161B ->169B      -0.30056
 161B ->170B      -0.13016
 161B ->173B      -0.60676
 167B ->173B       0.10559
```

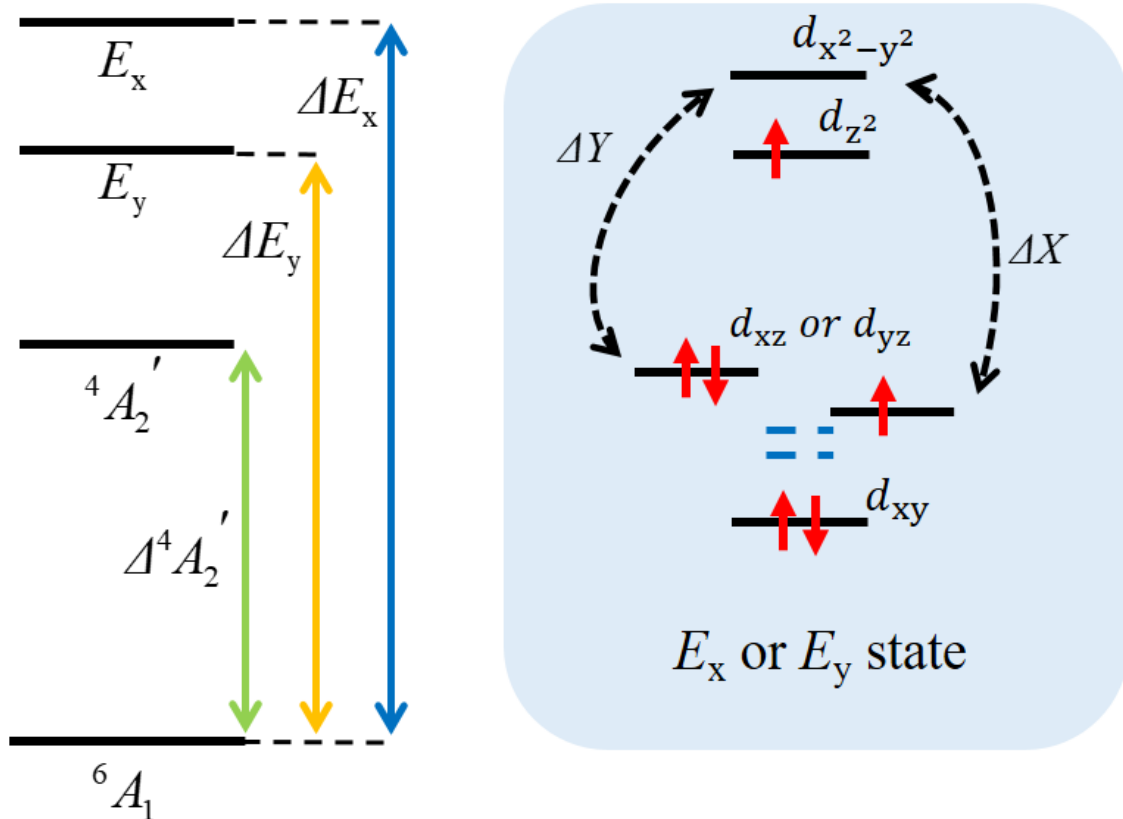
SavETr: write IOETrn= 770 NScale= 10 NData= 16 NLR=1 LETran= 62.

Job cpu time: 0 days 6 hours 47 minutes 33.0 seconds.

File lengths (MBytes): RWF= 1136 Int= 0 D2E= 0 Chk= 127 Scr= 1

Normal termination of Gaussian 09 at Sat Jul 22 01:30:15 2017.

図 A3-2(c) 励起状態のエネルギーと、それぞれの励起にどの分子軌道が関係しているかを示してた計算結果のログ。



Rhombic  
( $C_{2v}$ )

図 A3-3 斜方対称場における基底状態および励起状態のエネルギー関係と、 $E_x$ 、 $E_y$  状態の 3d 軌道上のスピンの配置。





## Appendix-4

### ハイブリッド型圧力セルを用いたヘミンクロライドの EPR 測定

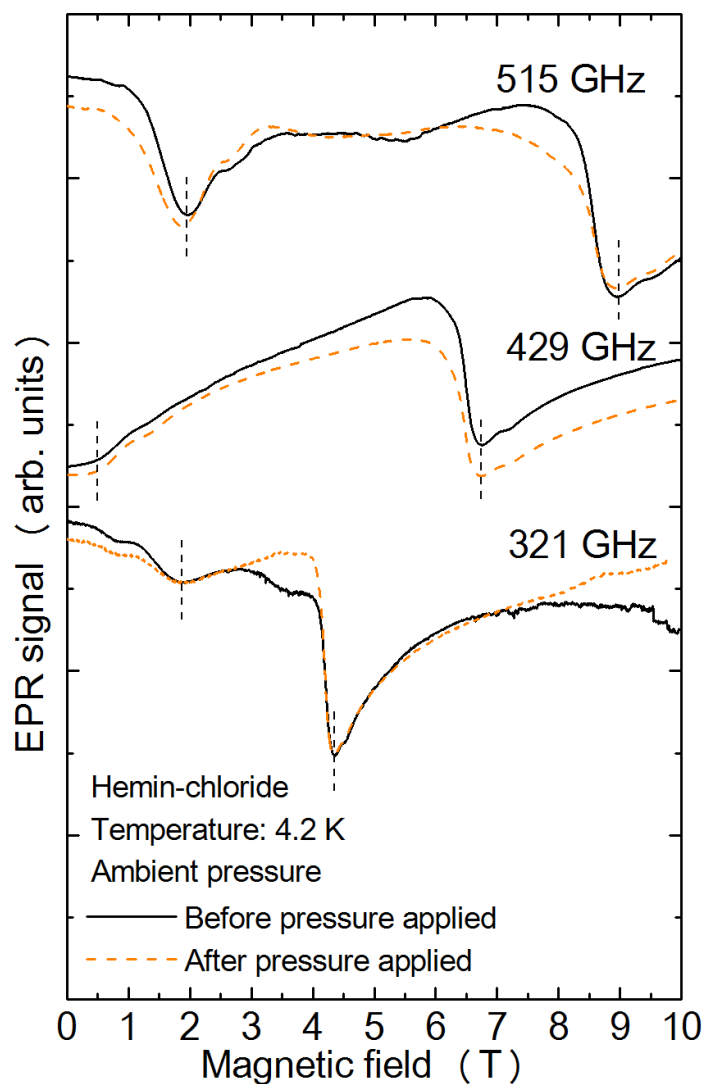


図 A4-1 常圧下におけるヘミンクロライドの EPR 測定結果。黒色の実線は、圧力を印加する前の EPR スペクトルで、図 5-2(a)に対応する。橙色の破線は、1.96 GPa 印加して EPR 測定を行った後、減圧して常圧に戻して再度測定した時の EPR スペクトル。縦の点線は、 $g_{\text{perp}}$  吸収、 $\alpha$  モード、 $\beta$  モードのピークを表している。加圧の前後で共鳴磁場は変わっておらず、再現性は保たれている。

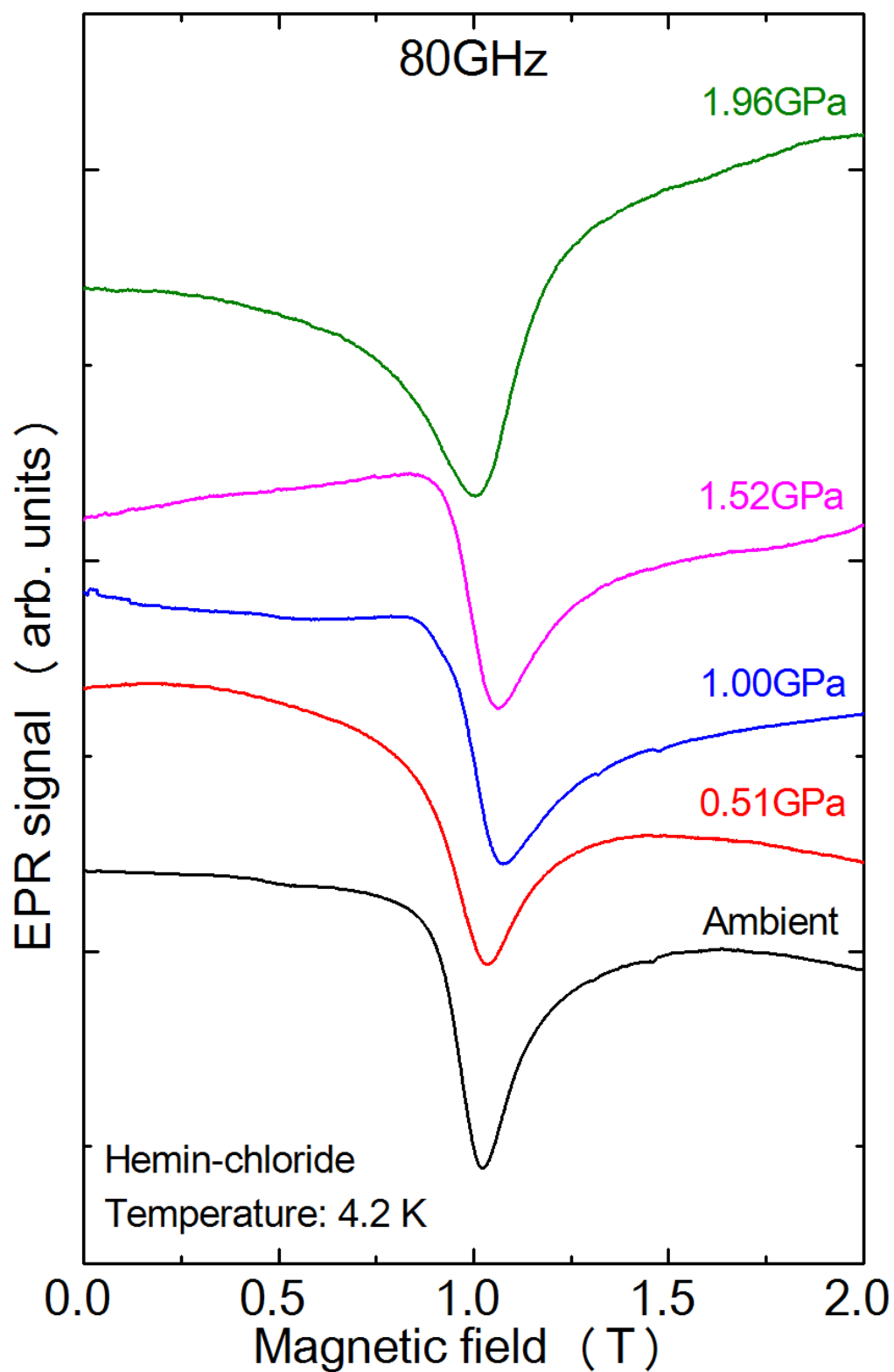


図 A4-2(a) 80 GHzにおいて得られたヘミンクロライドの EPR スペクトルの圧力依存性。

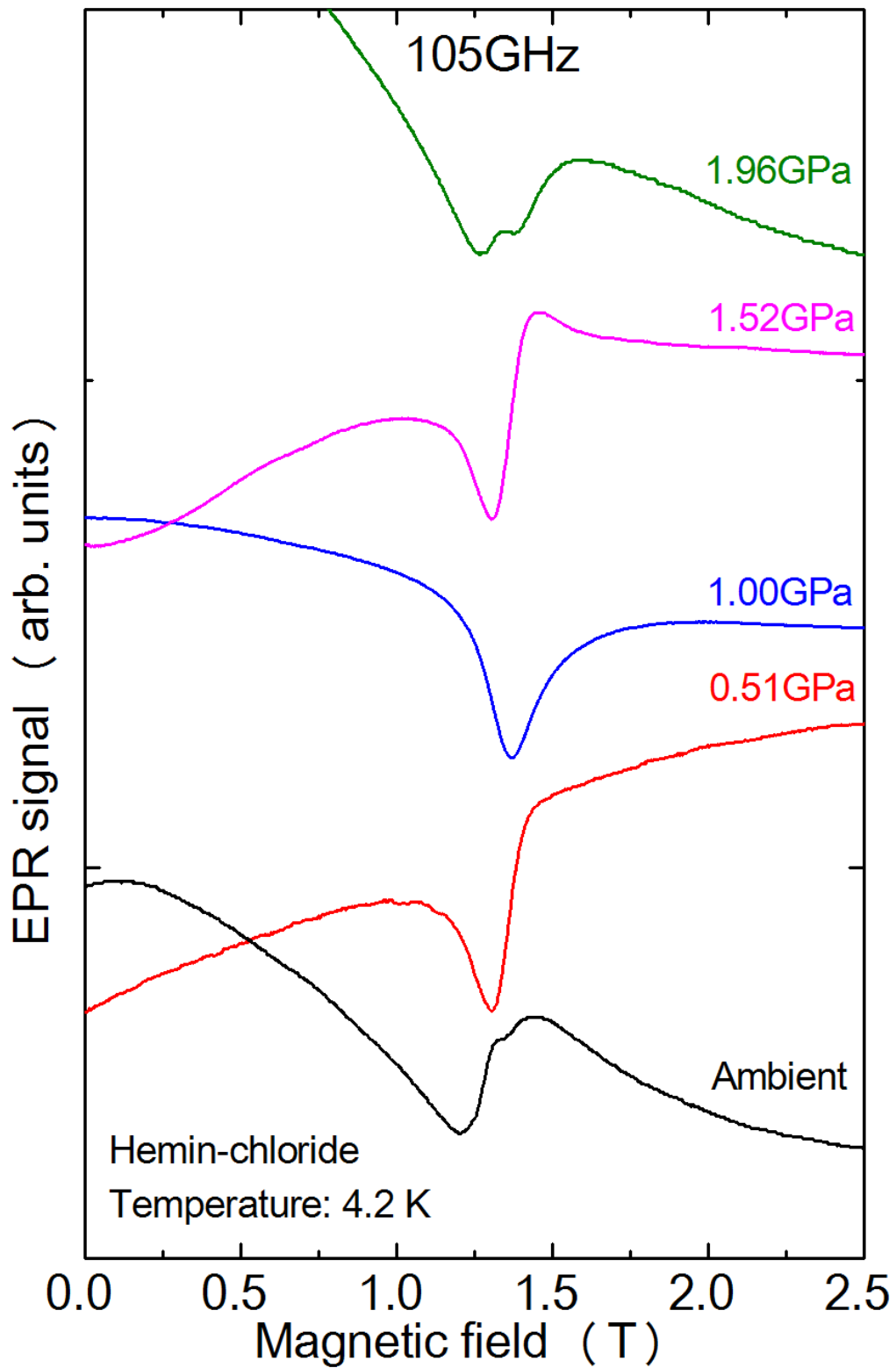


図 A4-2(b) 105 GHz において得られたヘミンクロライドの EPR スペクトルの圧力依存性。

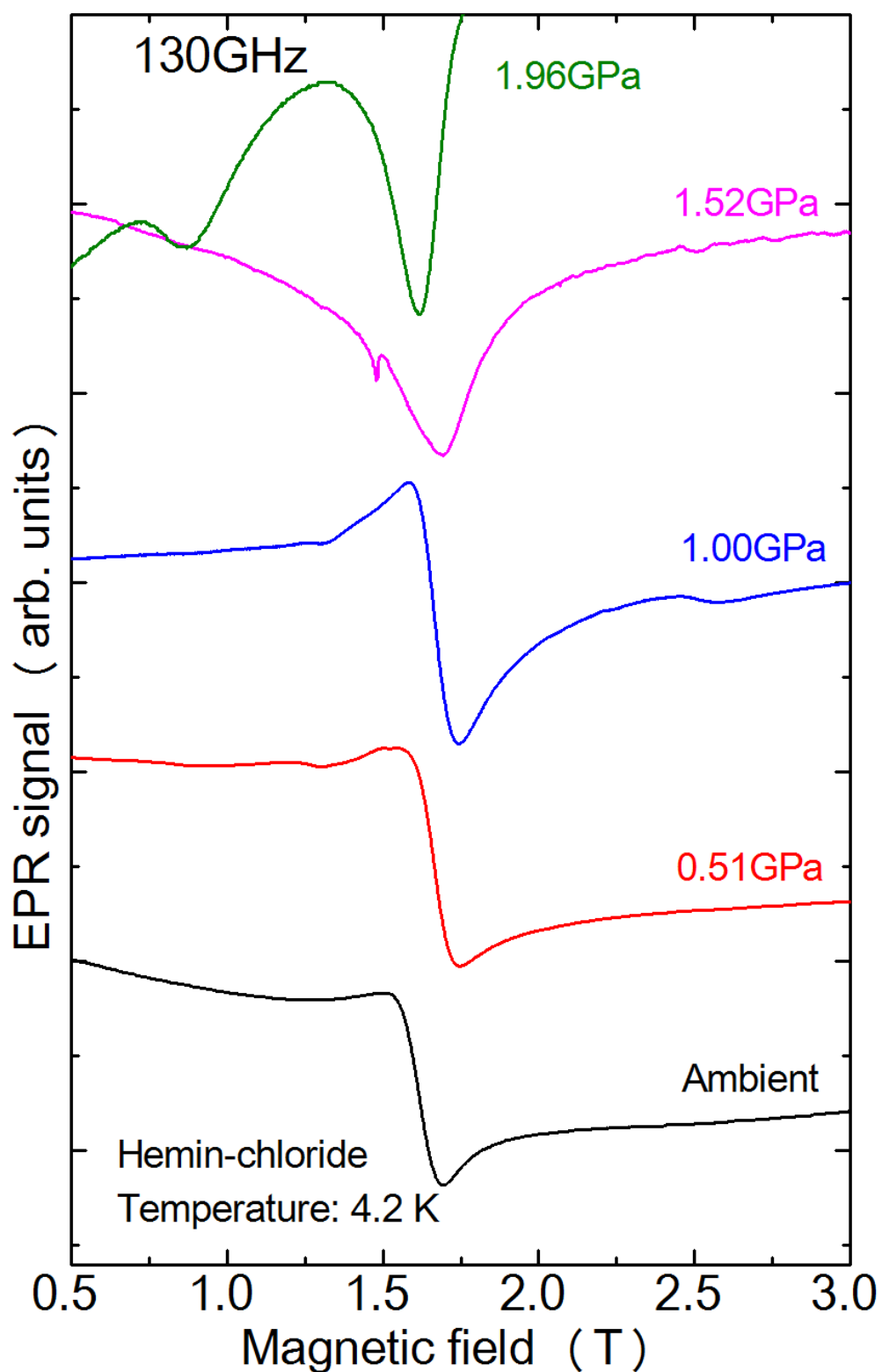


図 A4-2(c) 130 GHz において得られたヘミンクロライドの EPR スペクトルの圧力依存性。

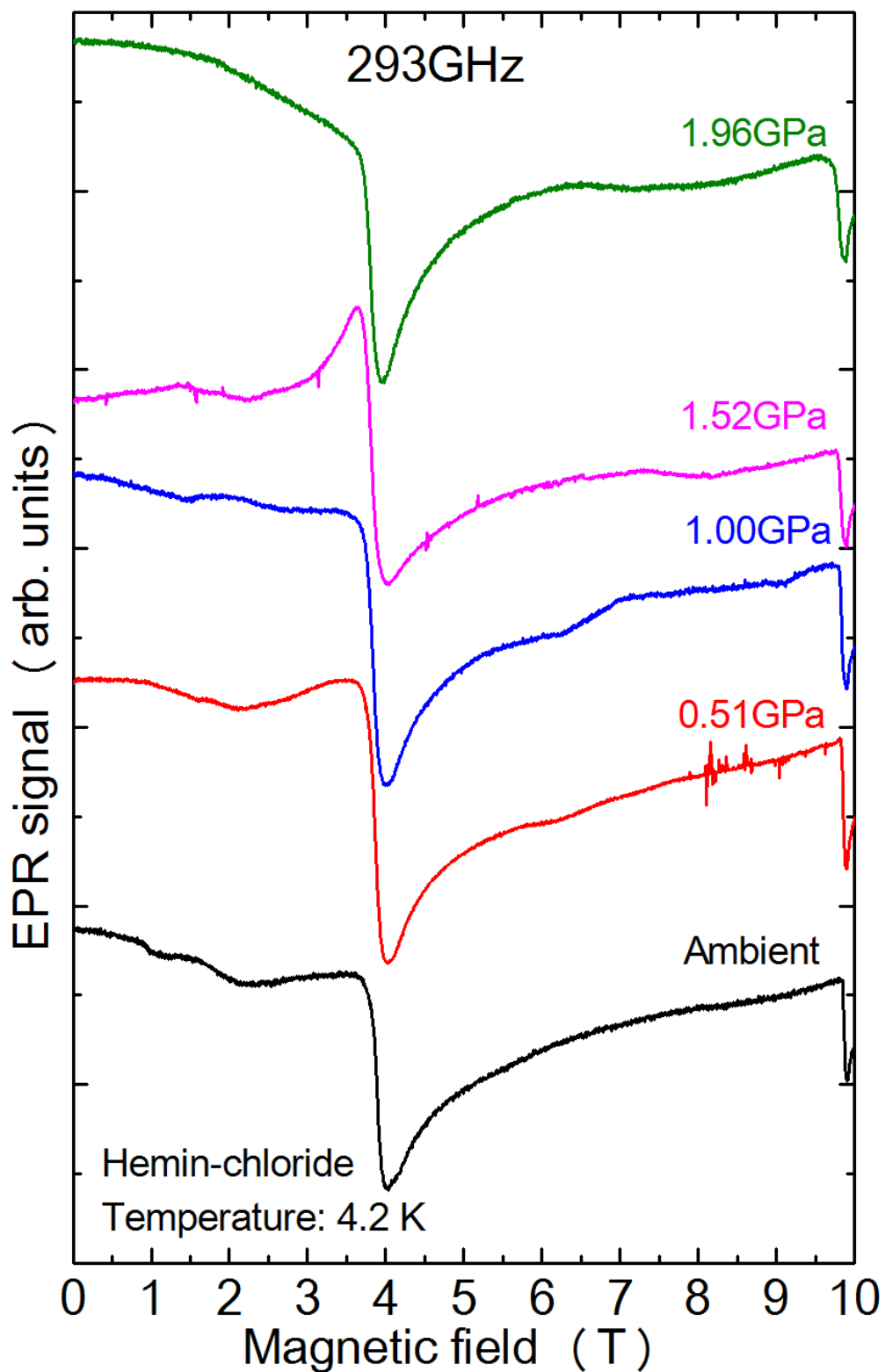


図 A4-2(d) 293 GHz において得られたヘミンクロライドの EPR スペクトルの圧力依存性。

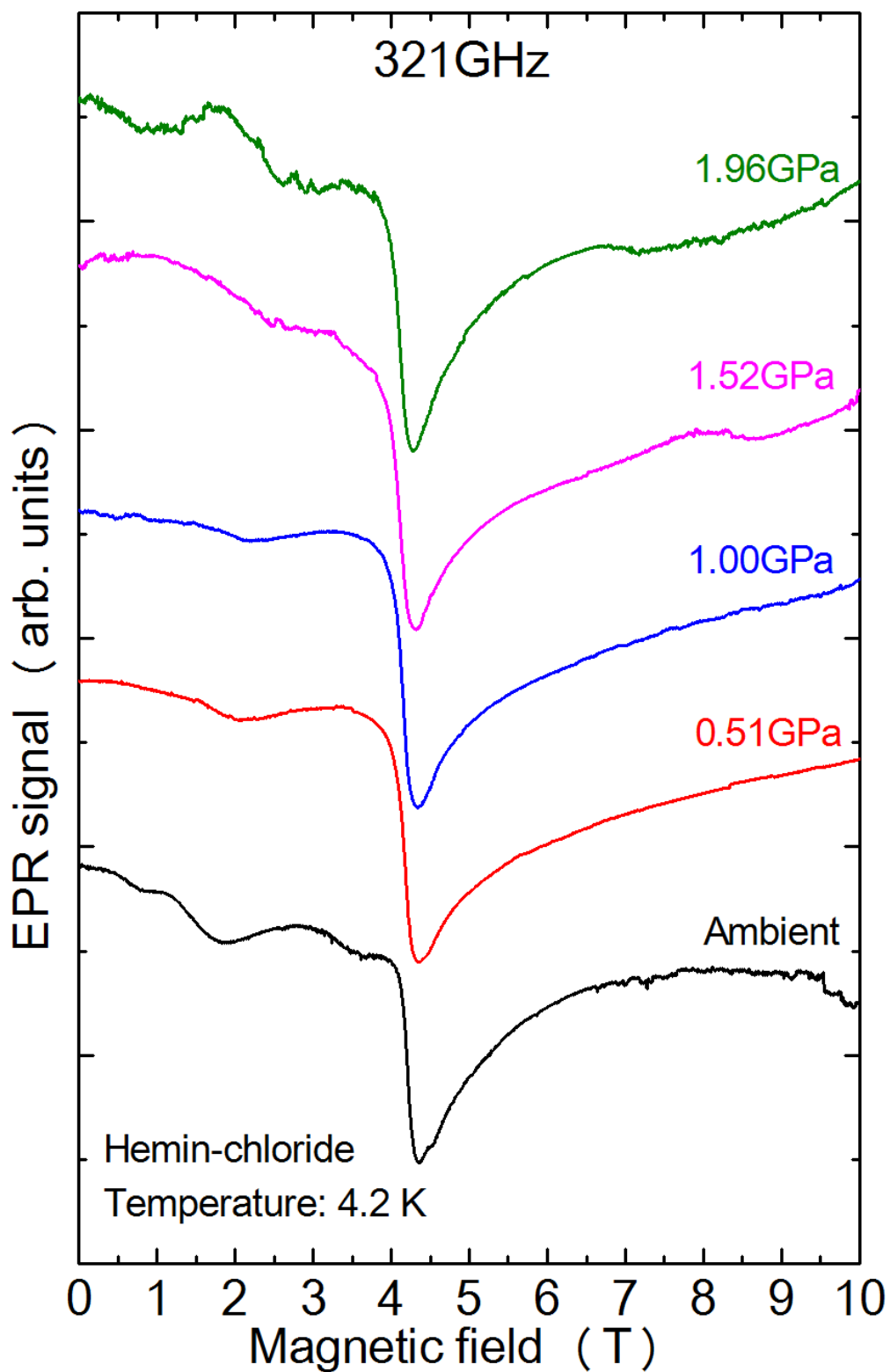


図 A4-2(e) 321 GHz において得られたヘミンクロライドの EPR スペクトルの圧力依存性。

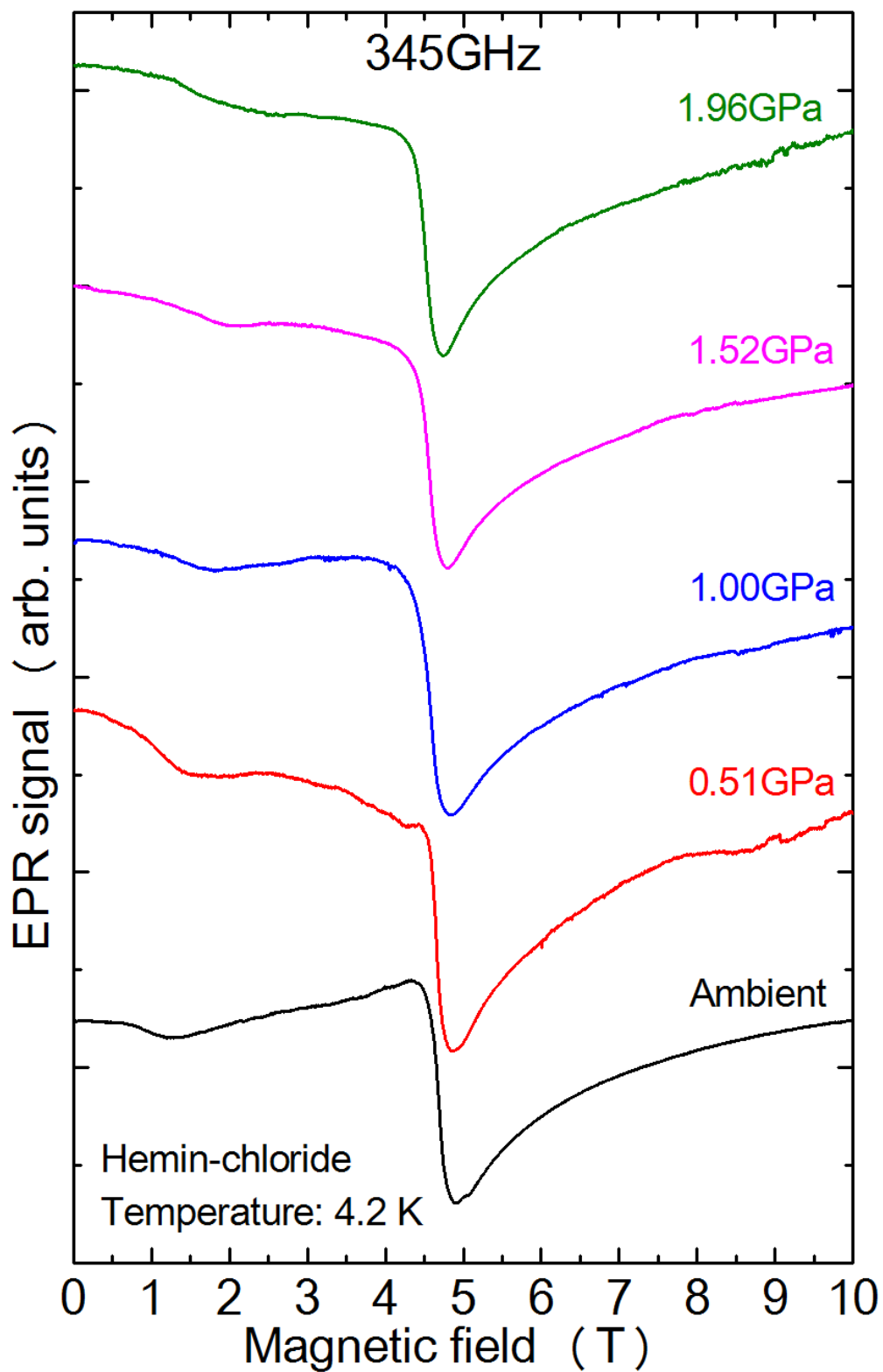


図 A4-2(f) 345 GHz において得られたヘミンクロライドの EPR スペクトルの圧力依存性。

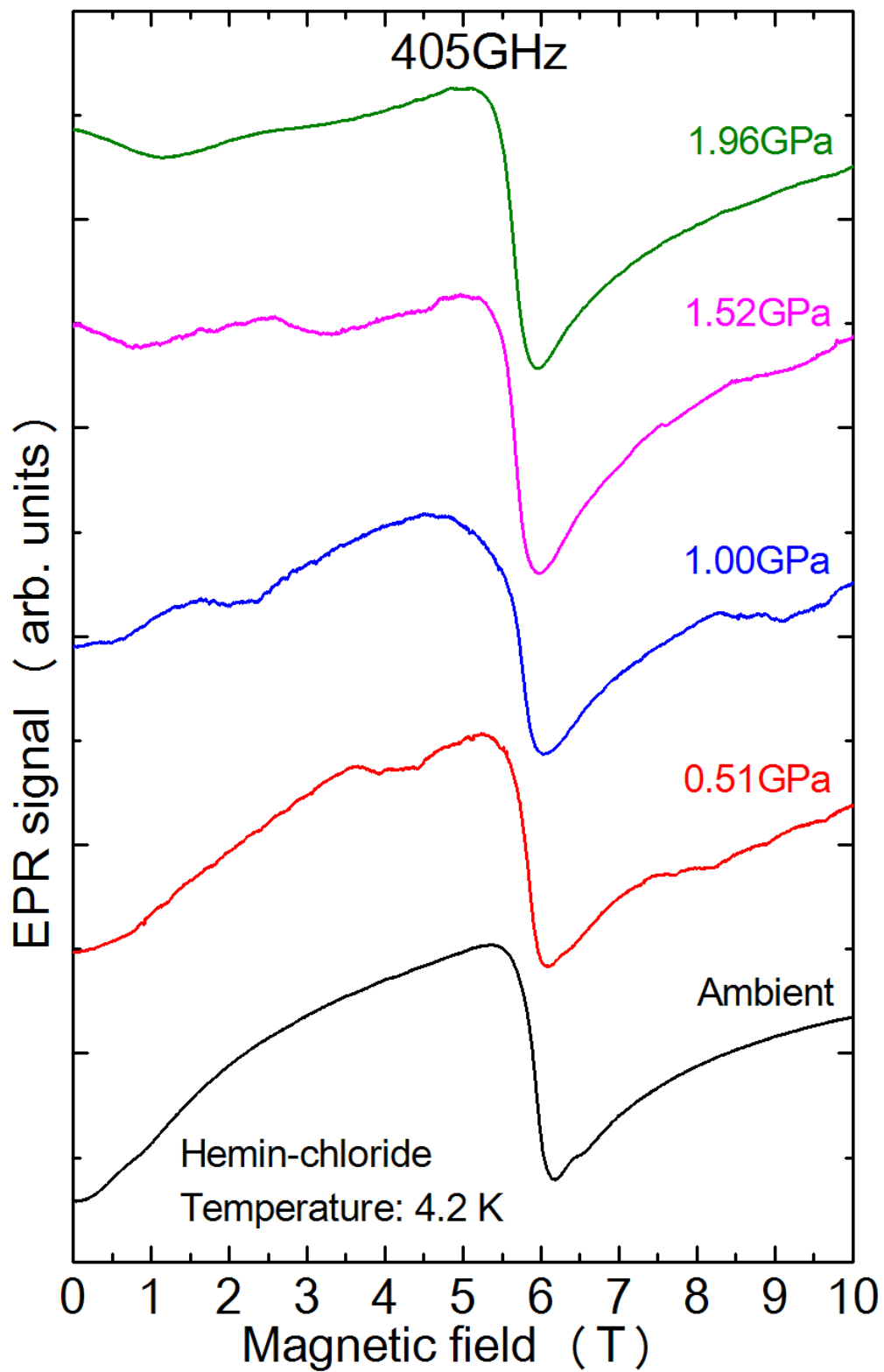


図 A4-2(g) 405 GHz において得られたヘミンクロライドの EPR スペクトルの圧力依存性。



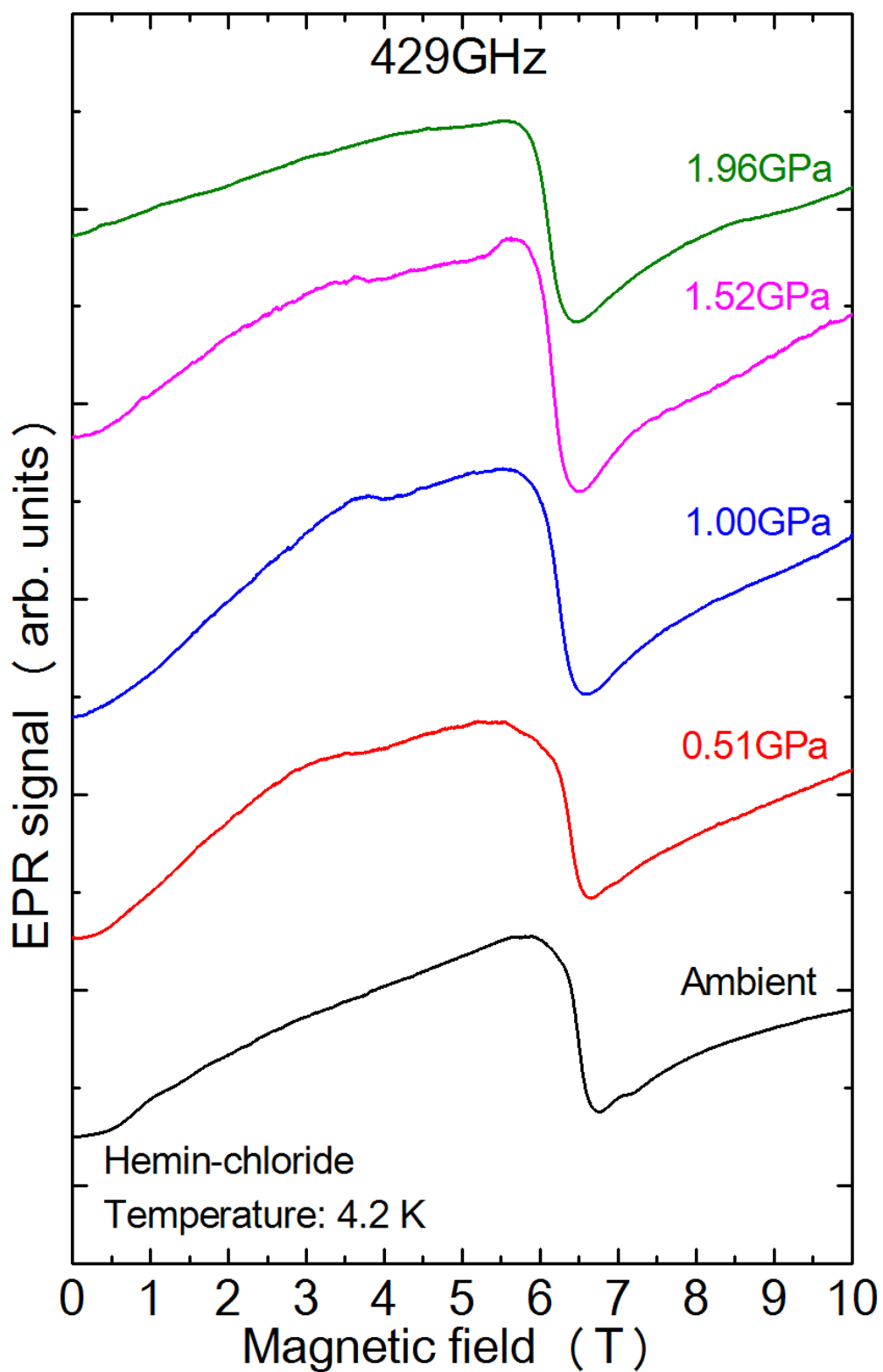
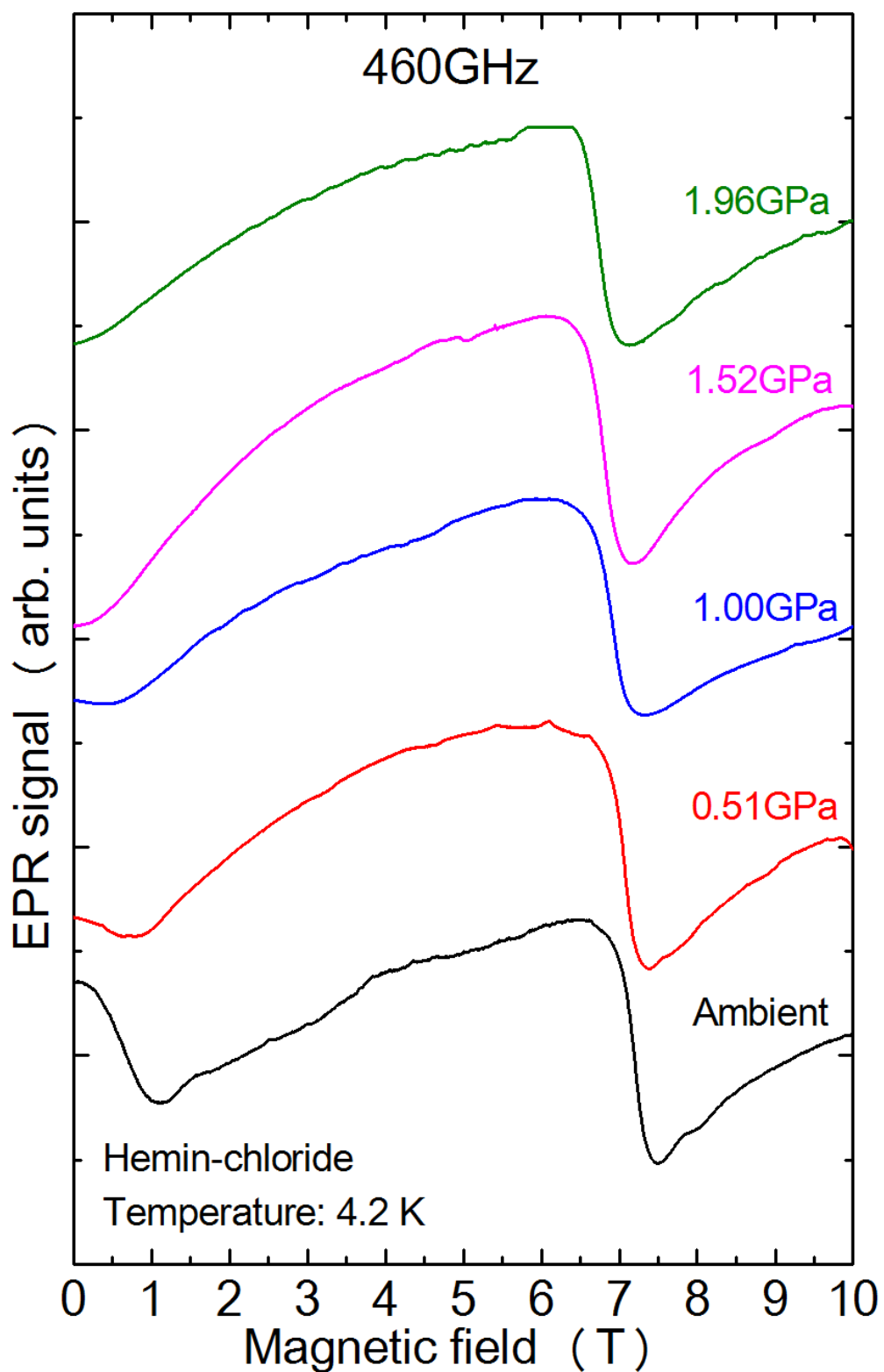


図 A4-2(h) 429 GHz において得られたヘミンクロライドの EPR スペクトルの圧力依存性。



図A4-2(i) 460 GHzにおいて得られたヘミンクロライドのEPRスペクトルの圧力依存性。

## Appendix-5

### SiN<sub>x</sub> ナノメンブレンを用いた力検出型 ESR 測定法によるカゴメ格子反強磁性体 KMn<sub>3</sub>Ge<sub>2</sub>O<sub>9</sub> およびヘミンクロライド粉末の強磁場・テラヘルツ ESR 測定

ここでは、第七章で開発した、SiN<sub>x</sub> ナノメンブレンを用いた力検出型 ESR 測定法を利用して、カゴメ格子反強磁性体 KMn<sub>3</sub>Ge<sub>2</sub>O<sub>9</sub> およびヘミンクロライド粉末の強磁場・テラヘルツ ESR 測定を行った結果について説明する。

#### A5-1 カゴメ格子反強磁性体 KMn<sub>3</sub>Ge<sub>2</sub>O<sub>9</sub> の ESR 測定結果

KMn<sub>3</sub>Ge<sub>2</sub>O<sub>9</sub> は神戸大学研究基盤センターの原茂生博士により水熱合成法を用いて作成された。図 A5-1 に、KMn<sub>3</sub>Ge<sub>2</sub>O<sub>9</sub> の結晶構造を示す。KMn<sub>3</sub>Ge<sub>2</sub>O<sub>9</sub> は磁性イオンの Mn<sup>3+</sup> イオンを取り出して眺めたときに、Mn<sup>3+</sup> 同士で正三角形を構成し、かつ正三角形の頂点を互いに共有したカゴメ格子構造を持つ反強磁性体である。結晶の空間群は六方晶 *P6<sub>3</sub>/mmc* であり、ユニットセルの格子定数は、 $a = 5.833 \text{ \AA}$ 、 $c = 13.711 \text{ \AA}$  である。ab 面内にカゴメ格子構造が広がり、それが c 軸方向に積層した構造をとっている。積層方向は、K 原子や GeO<sub>2</sub> がカゴメ格子の層同士を隔てている。磁化率測定や比熱測定から、40 K では  $S = 2$  の常磁性のふるまいを示すが、それ以下では反強磁性転移を起こすことが知られている。

図 A5-2(a)、A5-2(b)に、KMn<sub>3</sub>Ge<sub>2</sub>O<sub>9</sub> の単結晶五粒を CuBe 板に真空グリースを用いて貼り付けた写真を示す。図 A5-2(a)では、CuBe 板に対して c 軸方向が垂直に立つよう貼り付けており、 $B \parallel c\text{-axis}$  の配置をとっている。一方、図 A5-2(b)では、CuBe 板に対して ab 面が垂直に立つよう貼り付けており、 $B \parallel ab\text{-plane}$  の配置をとっている。単結晶一粒の大きさは、ab 面（六角形の部分）の対角長がおおよそ 200-300 μm 程度で、c 軸方向の長さがおおよそ 500 μm 程度である。五粒トータルでの質量はおおよそ 0.2 mg である。これら二つの配置に対して、4.2 K で強磁場・テラヘルツ ESR 測定を行った。

図 A5-3(a)に、 $B // c\text{-axis}$  の配置で行った ESR 測定結果、図 A5-3(b)に、 $B // ab\text{-plane}$  の配置で行った ESR 測定結果を示す。磁場掃引速度は 0.5 T/min であった。 $B // c\text{-axis}$  の測定では、90-636 GHz までの幅広い周波数範囲、および 15 T までの磁場範囲で ESR スペクトルを観測することに成功した。ESR スペクトルのピークは、90 GHz で 12.5 T 付近で見られるが、周波数を高くするにつれて低磁場へシフトし、440 GHz 付近で 0 T に達する。さらに周波数を高くすると、今度は高磁場へシフトしていった。また、各周波数において 13.5 T 付近にスペクトルのスパイクが見えるが、ここでは磁化のスピンフロップ転移が起こっており、メンブレンの変位が急激に変化したためと理解出来る。この 13.5 T よりも強磁場の領域では、105 GHz と 120 GHz で新たなピークが確認出来る。

次に、 $B // ab\text{-plane}$  の測定では、453-538 GHz までの周波数範囲、および 15 T までの磁場範囲で ESR スペクトルを観測することに成功した。この測定では、 $B // c\text{-axis}$  のスペクトルのピークに比べてかなりブロードな線幅を持っていた。また 13.5 T 付近でスピンフロップ転移は見られなかった。

図 A5-4 に、 $B // c\text{-axis}$ 、 $B // ab\text{-plane}$  両方で得られた ESR スペクトルのピークを共鳴磁場と周波数の関係でプロットしたものを示す。これらの結果から  $\text{KMn}_3\text{Ge}_2\text{O}_9$  は磁化容易軸を  $c$  軸方向に持つ容易軸型の反強磁性体であり、反強磁性ギャップは 440 GHz であることが結論付けられた。

本研究では数百  $\mu\text{m}$  程度の微小な単結晶を五個使用したが、S/N 比から予想されるように単結晶一粒だけでも十分解析に耐えうる ESR スペクトルが得られたと考えられる。従来の透過法による強磁場・テラヘルツ ESR 測定では、本手法のように単結晶一個で ESR スペクトルが得られるほどの測定感度は無いため、数十から百個以上の単結晶を搭載しなければならない。その場合、すべての単結晶の軸を合わせることは困難であり、単結晶 ESR スペクトルを得ることは難しい。結晶面から軸の見分けがつかない試料も存在し、その場合は尚更軸方向を揃えることは困難であるので、事実上パウダーパターンの ESR スペクトルしか得られない。こうした意味において、本手法は古典論では説明出来ない磁気構造を有する磁性体（フラストレーション、トポロジカル、量子揺らぎなど）に対する研究を推し進める上で必要不可欠な手法になると考えている。

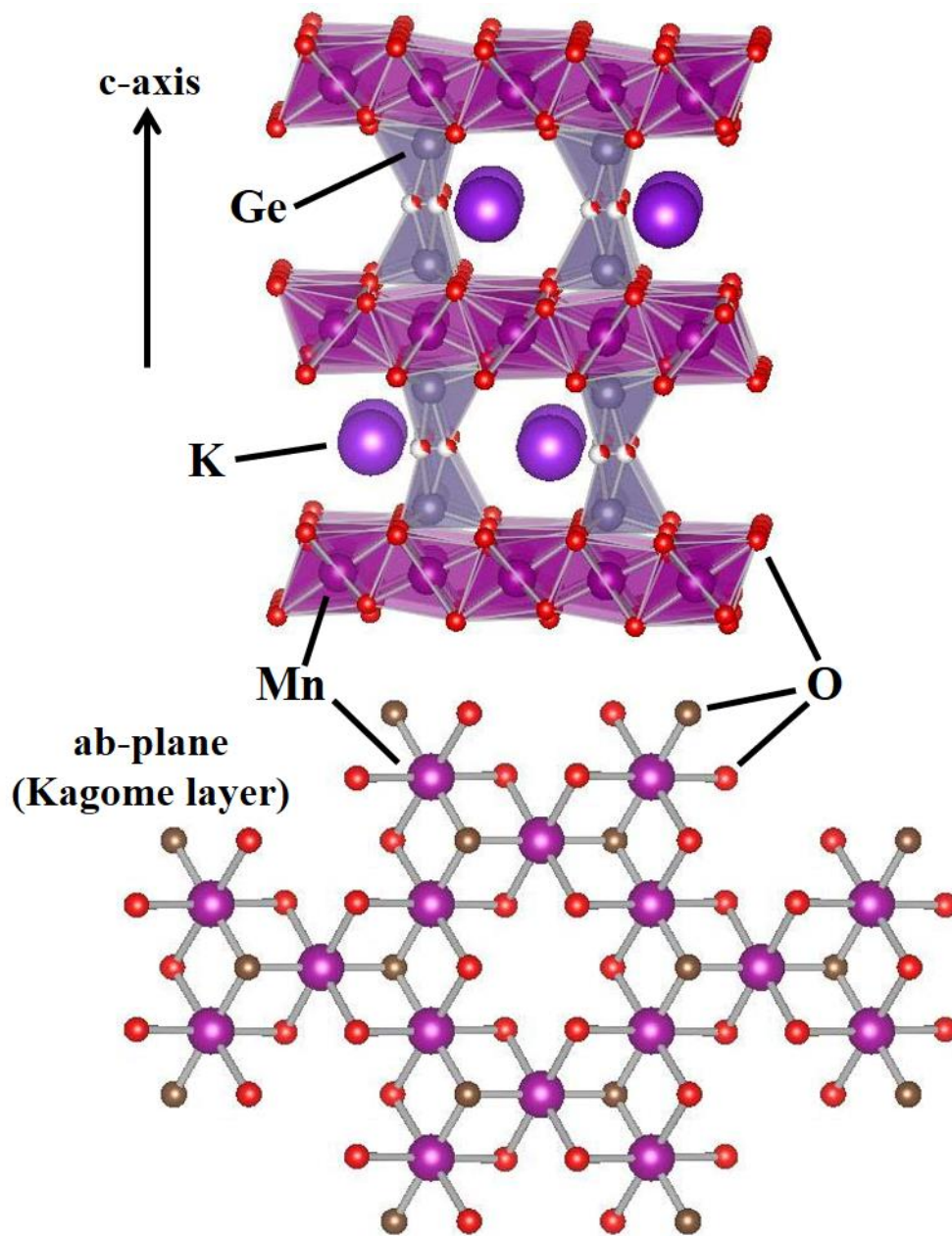
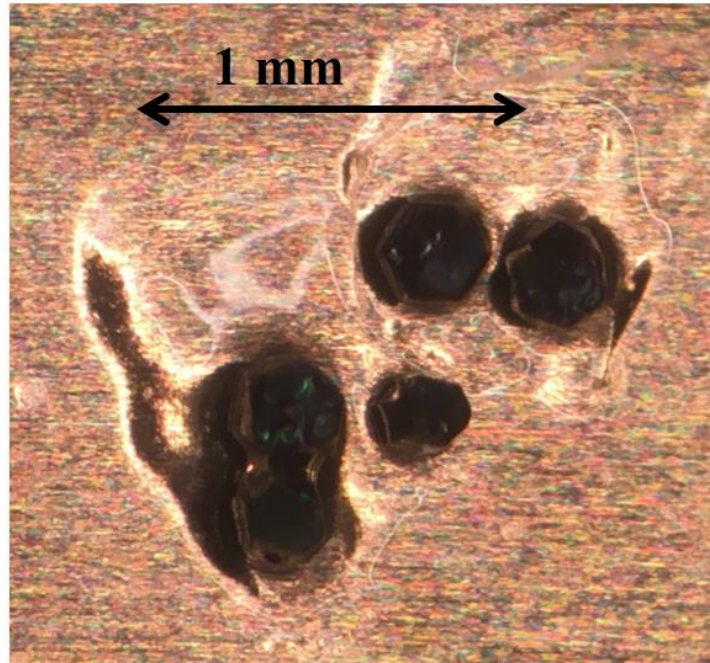


図 A5-1  $\text{KMn}_3\text{Ge}_2\text{O}_9$  の結晶構造。上は結晶の三次元構造を  $ab$  面内方向から見た図で、下はカゴメ格子を構成する  $ab$  面内の二次元構造を  $c$  軸方向から見た図。

**(a)  $B // c$ -axis**



**(b)  $B // ab$ -plane**

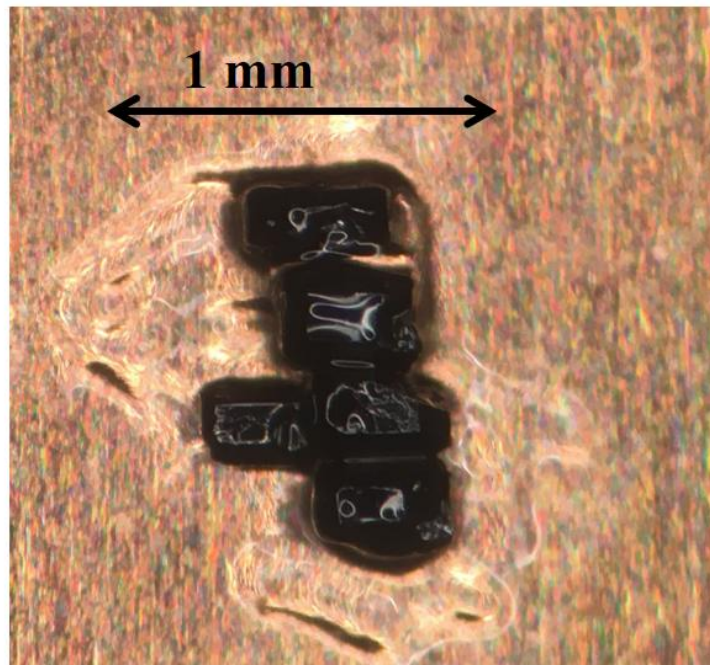


図 A5-2  $\text{KMn}_3\text{Ge}_2\text{O}_9$  の単結晶五粒を CuBe 板上に真空グリースを用いて貼り付けた様子。磁場と結晶軸の関係は(a)  $B // c$ -axis および(b)  $B // ab$ -plane である。

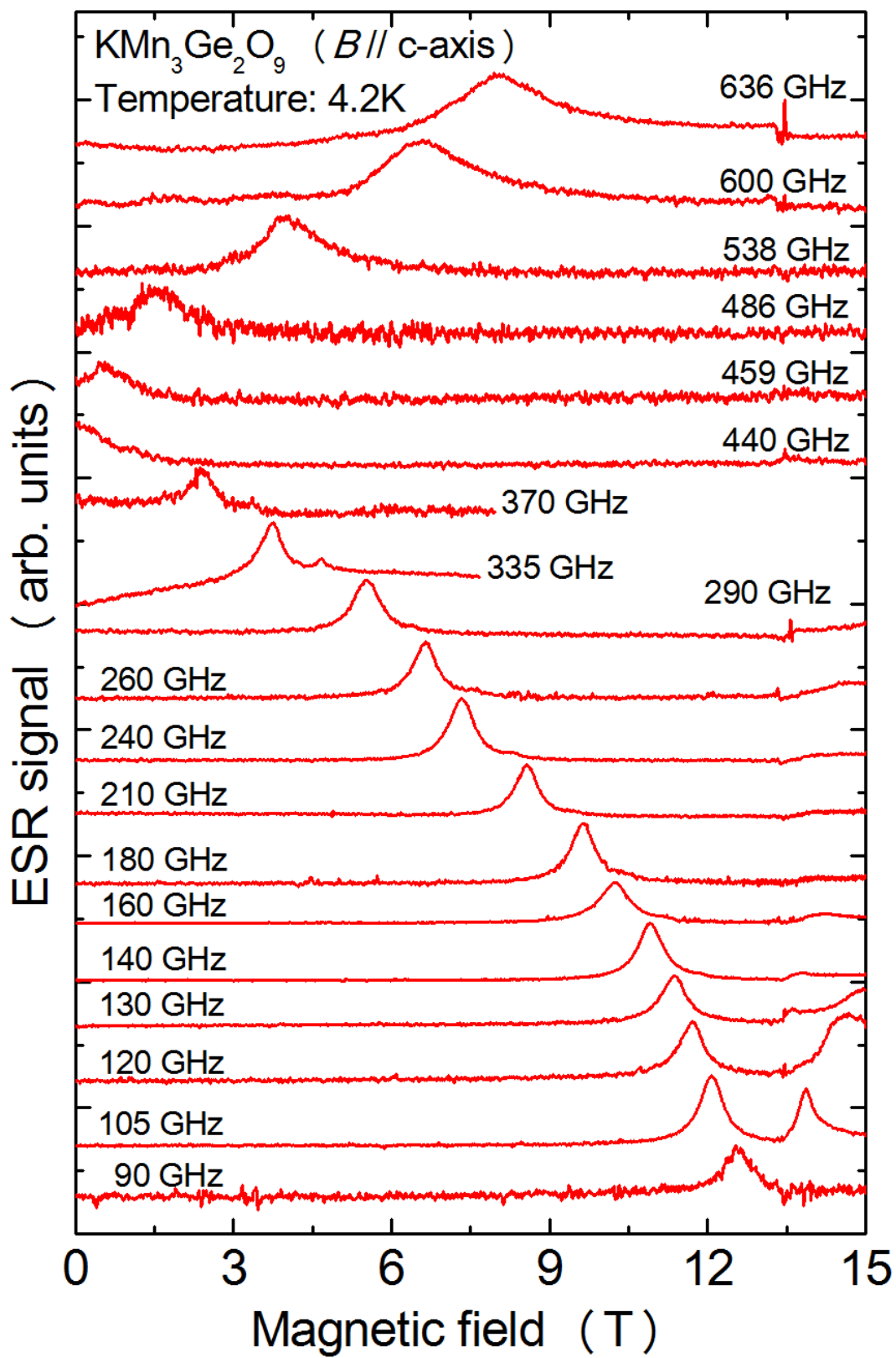


図 A5-3(a) 4.2 K における  $\text{KMn}_3\text{Ge}_2\text{O}_9$  ( $B // c\text{-axis}$ ) の ESR 測定結果。

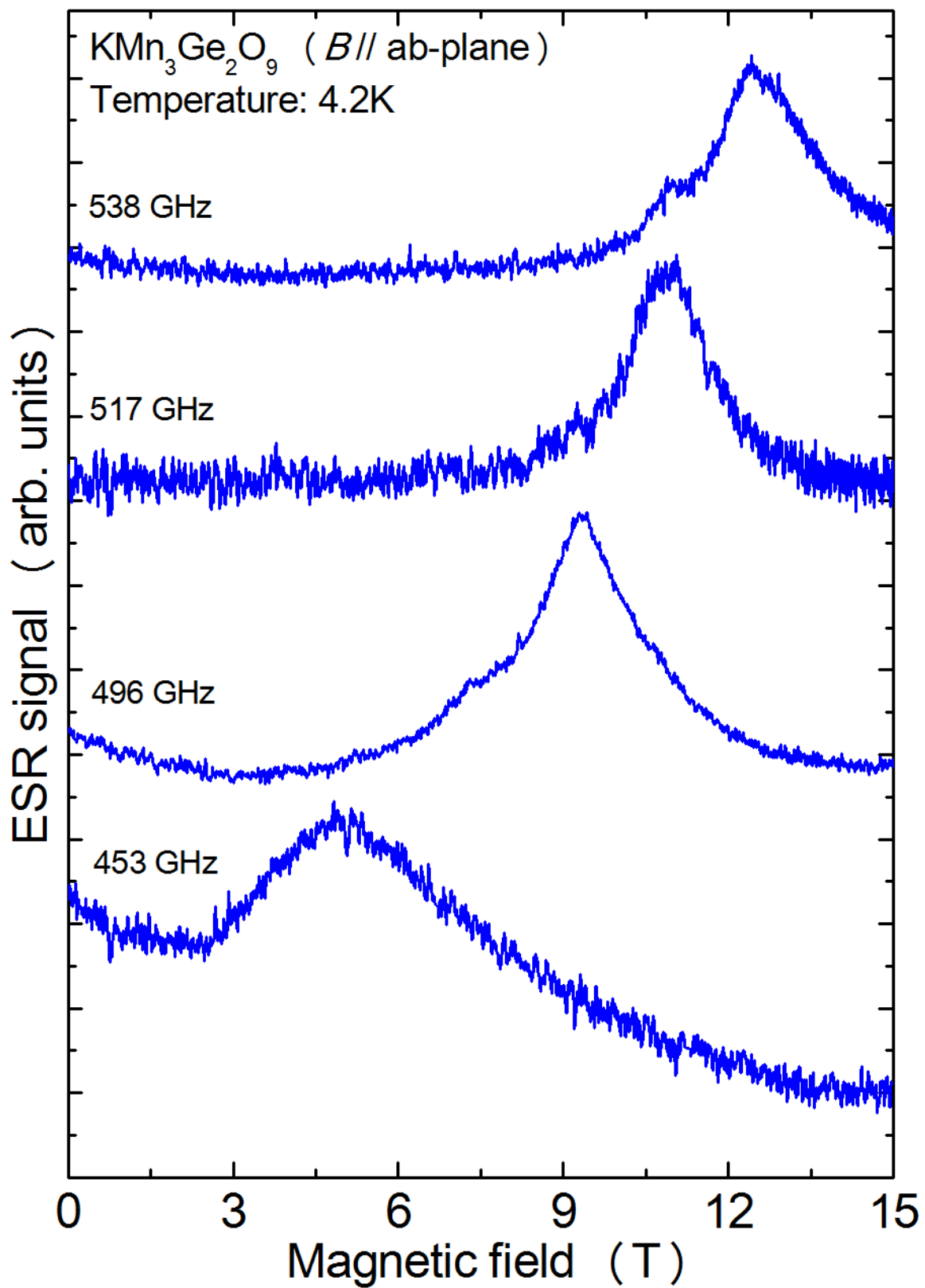


図 A5-3(b) 4.2 K における  $\text{KMn}_3\text{Ge}_2\text{O}_9$  ( $B // ab$ -plane) の ESR 測定結果。



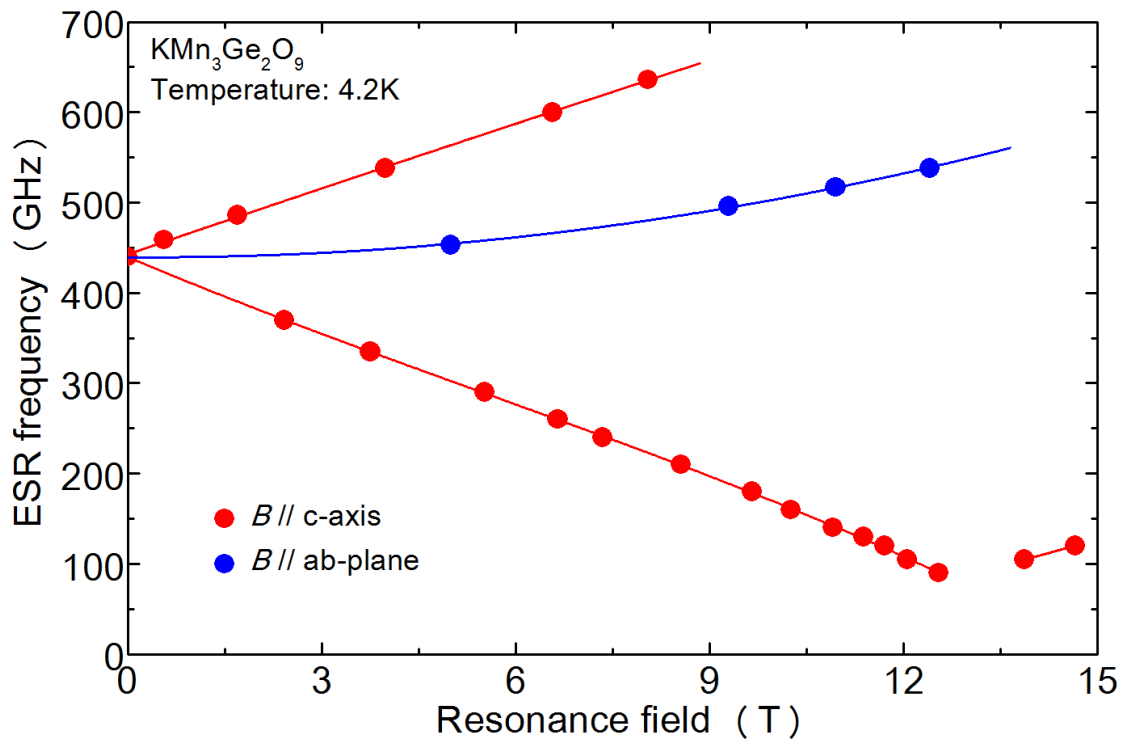


図 A5-4 *B* // c-axis、*B* // ab-plane 両方で得られた KMn<sub>3</sub>Ge<sub>2</sub>O<sub>9</sub> の ESR スペクトルのピークを共鳴磁場と周波数の関係でプロットしたもの。

## A5-2 ヘミンクロライド粉末の EPR 測定結果

ヘミンクロライド粉末は、第七章で議論した溶液試料と同じく Sigma-Aldrich から購入したものである。720  $\mu\text{g}$  のヘミンクロライド粉末を少量の真空グリースと混ぜてまとまるようにし、図 A5-5 のように高さ 1.5 mm の試料ホルダーに搭載した。溶液試料ではないので、テフロン製の蓋は不要である。

図 A5-6 に、4.2 K において得られたヘミンクロライド粉末の強磁場・テラヘルツ EPR 測定結果を示す。磁場掃引速度は 0.5 T/min であった。120 GHz、260 GHz、335 GHz、600 GHz において測定を行い、EPR スペクトルを観測することに成功した。各周波数において、 $g_{\text{perp}}$  吸収を観測し、また 335 GHz では  $\alpha$  モード、600 GHz では  $\beta$  モードを観測した。600 GHz では 13 T まで磁場掃引したが、ベースラインが安定しており、ノイズに埋もれそうな  $\alpha$  モードや  $\beta$  モードの構造を捉えることに成功した。カンチレバーを用いた力検出型 ESR 測定法で  $\alpha$  モードや  $\beta$  モードの探索を行ったことがあるが、本文で述べたような理由からベースラインの安定性を確保出来ていなかったため、観測は失敗に終わっていた。

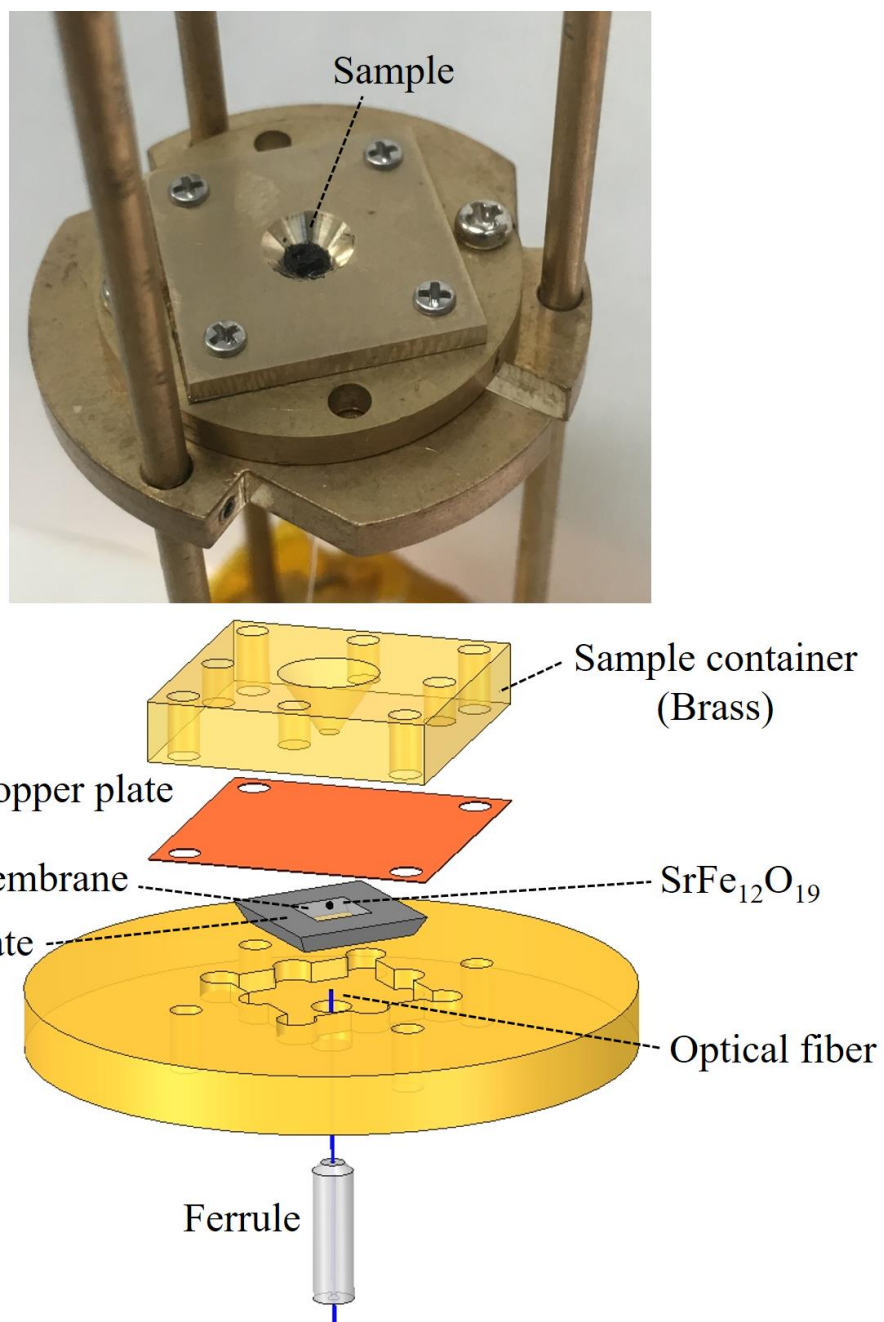


図 A5-5 ヘミンクロライド粉末を搭載した試料ホルダー（上）とその模式図（下）。試料容器の高さは 1.5 mm である。中心には、溶液セルと同じく両角 90° の円錐形の穴を作っている。

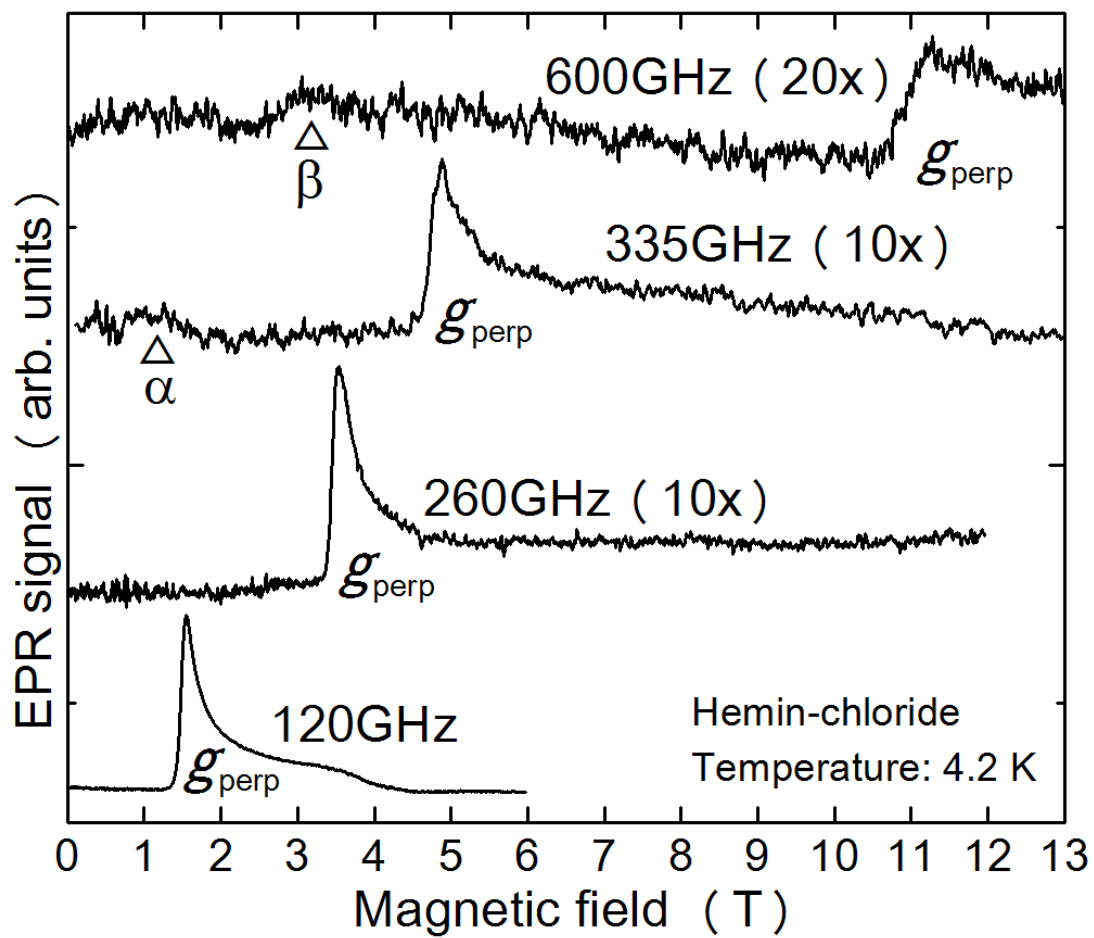


図 A5-6 ヘミンクロライド粉末の EPR 測定結果。

## Appendix-6

### 溶液セル内部の電磁界解析シミュレーション

溶液セル内部にどのような電磁場の強め合いが起こるかを調べるため、CST studio と呼ばれる電磁界解析シミュレーションソフトを用いて計算を行った。

今回シミュレーションに用いた溶液セルを図 A6-1 に示す。形状は、底の直径 1 mm、高さ 3 mm、セル入口の直径 5 mm である。この円錐は仰角 35.5 度となっており、第七章で議論した磁場勾配発生用のフェライト磁石が作る磁場勾配の正負が入れ替わる角度 (35.3 度) にほぼ近い角度である。今後マジックアングルに近い仰角を持つ溶液セルを作った場合の参考になれば幸いである。また底は CuBe 板の代わりに 0.05 mm 分の厚みを持たせている。

真空中に置かれた溶液セル (真鍮) の上方(001) から平面波が照射されると仮定し、シミュレーションを行った。シミュレーションの空間分解能 (メッシュの細かさ) については照射する電磁波の波長の 1/5 に設定した。振動磁場は y 軸方向、振動電場は x 軸方向に振幅を持って進行するよう設定している。120 GHz における結果の一部を図 A6-2(a)-(d) と図 A6-3(a)-(d) に示す。図 A6-2(a)-(d) は x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル、図 A6-3(a)-(d) は y 軸方向から見た xz 面 ( $y = 0$ ) における振動電場ベクトルの様子である。各点におけるベクトルの強さ、向きは時間的に変化するため、位相が  $45^\circ$ 、 $135^\circ$ 、 $225^\circ$ 、 $315^\circ$  の場合を示している。また図 6-4(a)-(z) に、50-300 GHz までの各周波数の場合の、x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場の時間平均を取った Contour plot を示す。これらの結果から、溶液セルが円錐型のため、電磁波は集光され、溶液セルの底の方であればあるほど振動磁場強度が強くなっていることが分かる。また周波数を高くすればするほど、波長が短くなるために底の方へ電磁波が入りやすく、振動磁場強度は強くなっていることが分かる。つまり溶液セルの底は尖らせるよりも円形に設計した方が底の方へ電磁波を導入しやすく、勾配磁石による磁場勾配も底の方が大きいため、ESR 信号強度を稼ぎやすくなると言える。

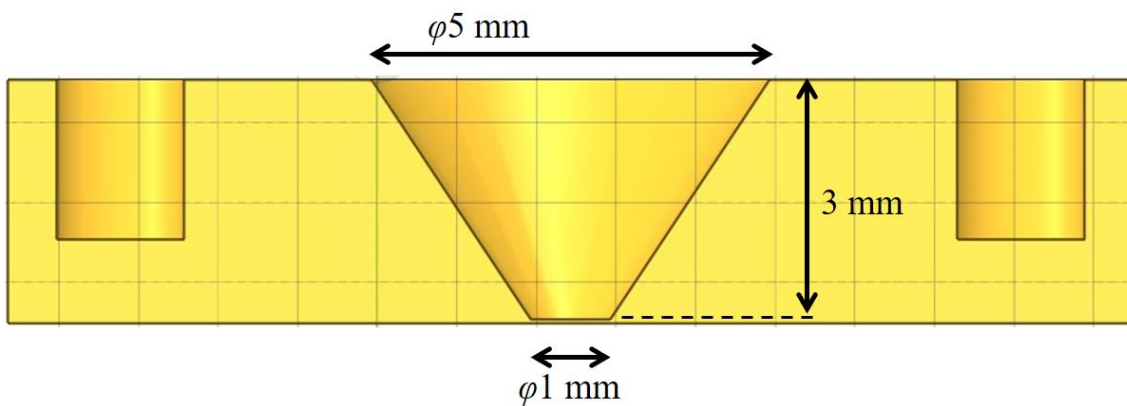


図 A6-1 シミュレーションに使用した溶液セルの設計図。

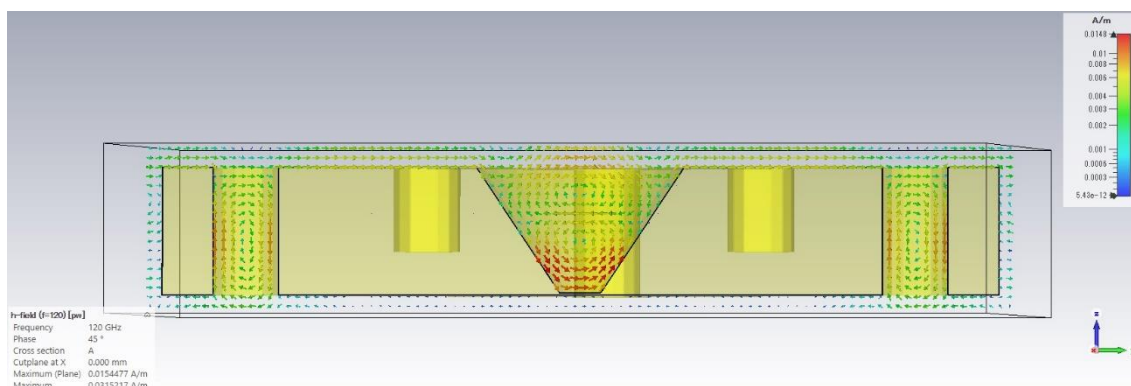


図 A6-2(a) 120 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、位相  $45^\circ$  での x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル。

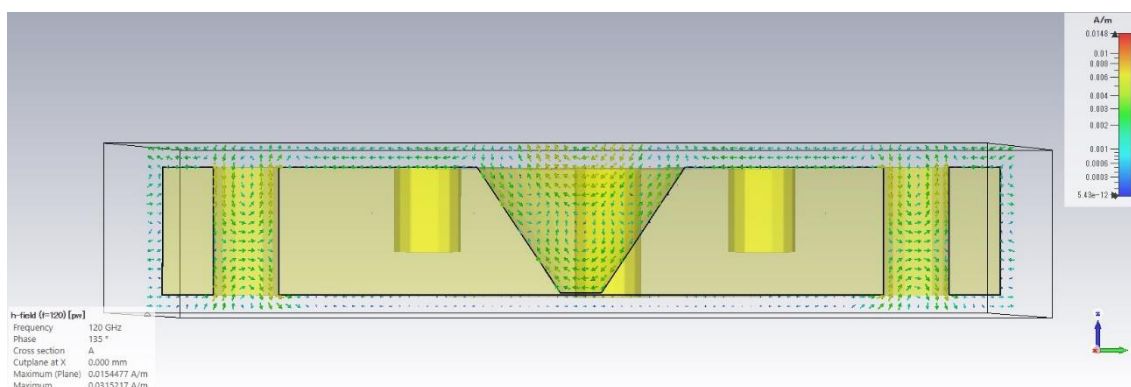


図 A6-2(b) 120 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、位相  $135^\circ$  での x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル。

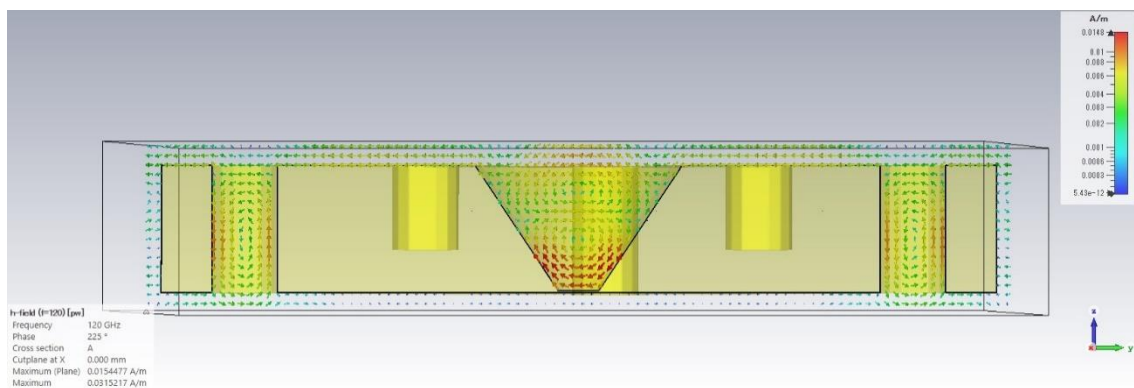


図 A6-2(c) 120 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、位相  $225^\circ$  での x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル。

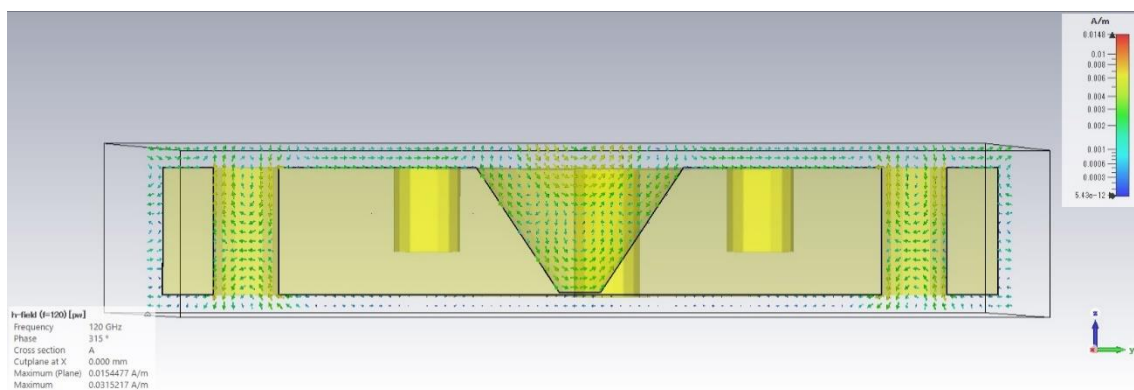


図 A6-2(d) 120 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、位相  $315^\circ$  での x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル。

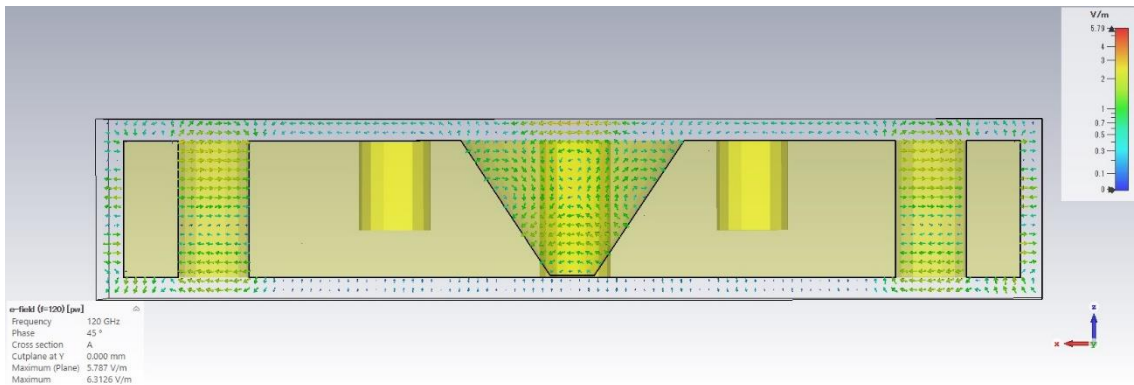


図 A6-3(a) 120 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、位相  $45^\circ$  での  $y$  軸方向から見た  $xz$  面 ( $y = 0$ ) における振動電場ベクトル。

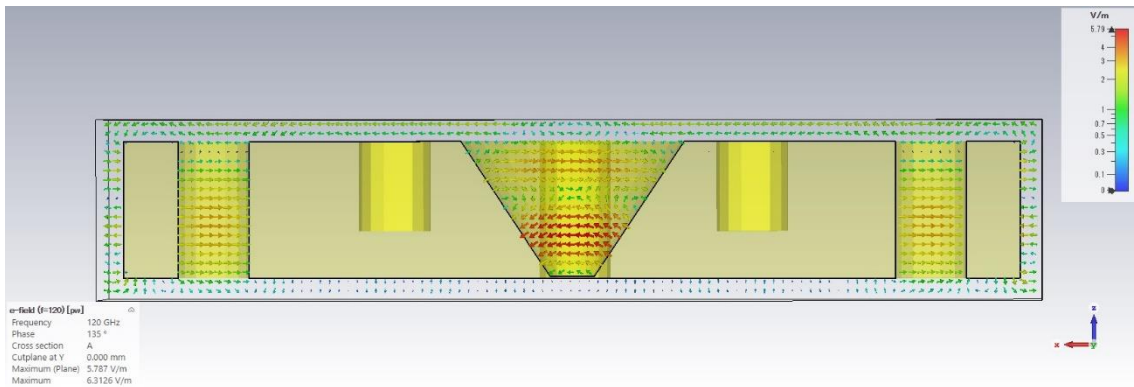


図 A6-3(b) 120 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、位相  $135^\circ$  での  $y$  軸方向から見た  $xz$  面 ( $y = 0$ ) における振動電場ベクトル。



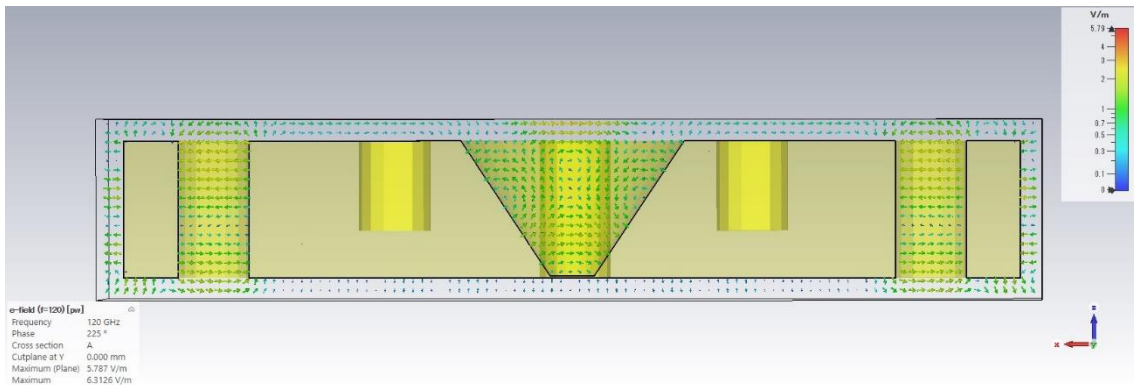


図 A6-3(c) 120 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、位相  $225^\circ$  での  $y$  軸方向から見た  $xz$  面 ( $y = 0$ ) における振動電場ベクトル。

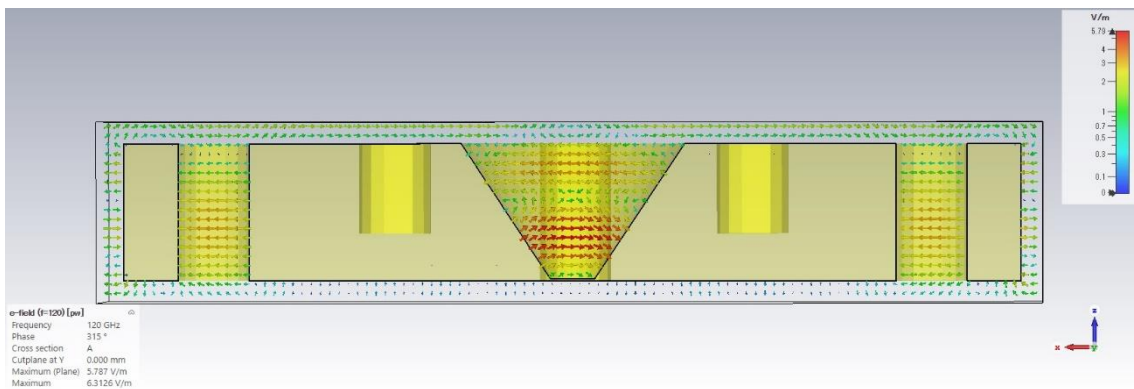


図 A6-3(d) 120 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、位相  $315^\circ$  での  $y$  軸方向から見た  $xz$  面 ( $y = 0$ ) における振動電場ベクトル。

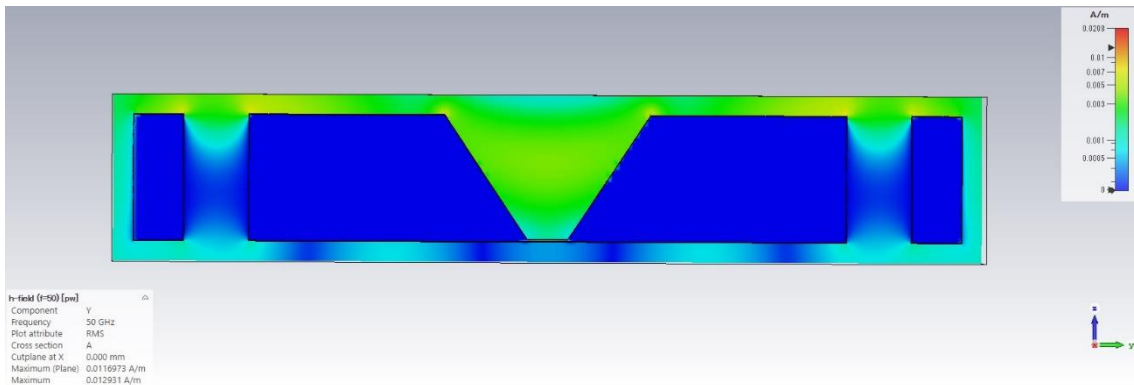


図 A6-4(a) 50 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル (電磁波の y 成分) の時間平均を取った Contour plot。

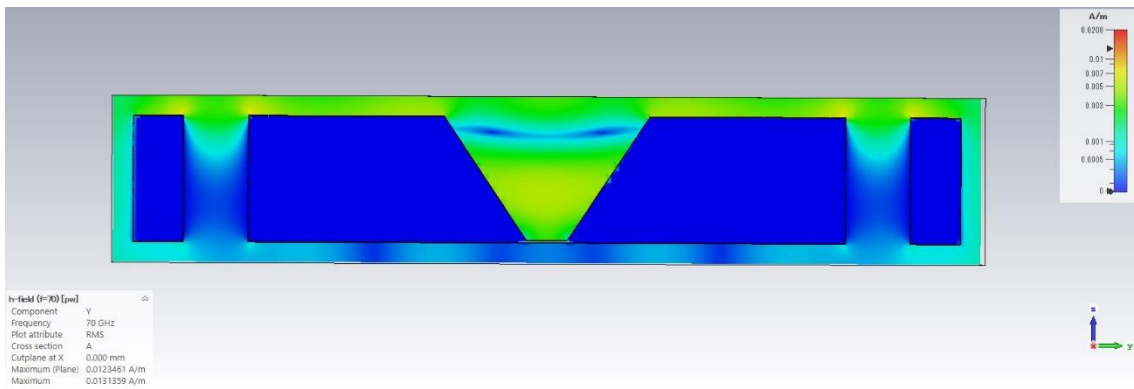


図 A6-4(b) 60 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル (電磁波の y 成分) の時間平均を取った Contour plot。

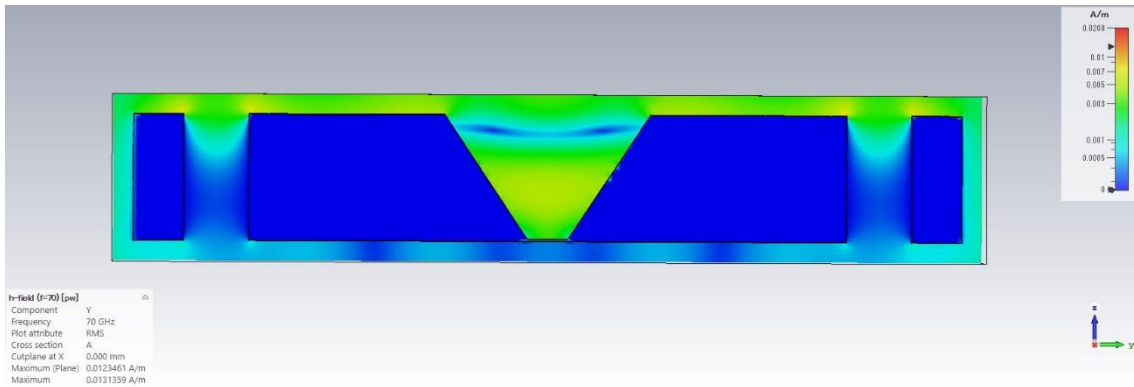


図 A6-4(c) 70 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル (電磁波の y 成分) の時間平均を取った Contour plot。

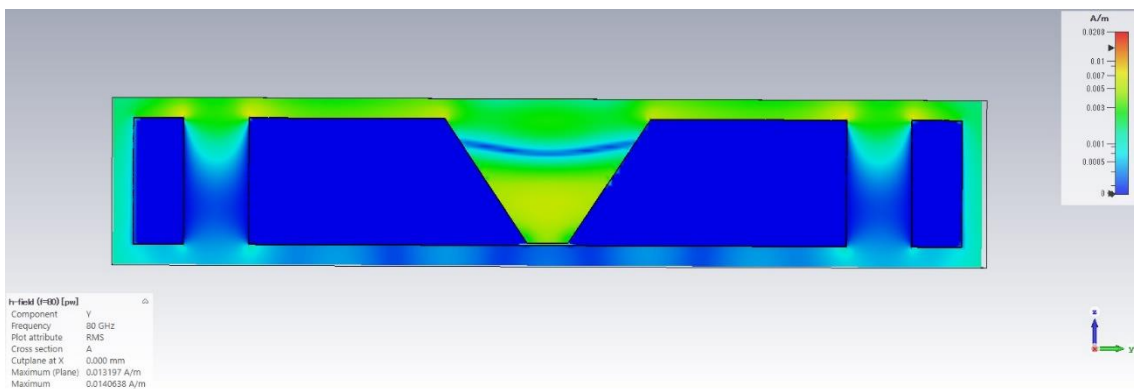


図 A6-4(d) 80 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル (電磁波の y 成分) の時間平均を取った Contour plot。

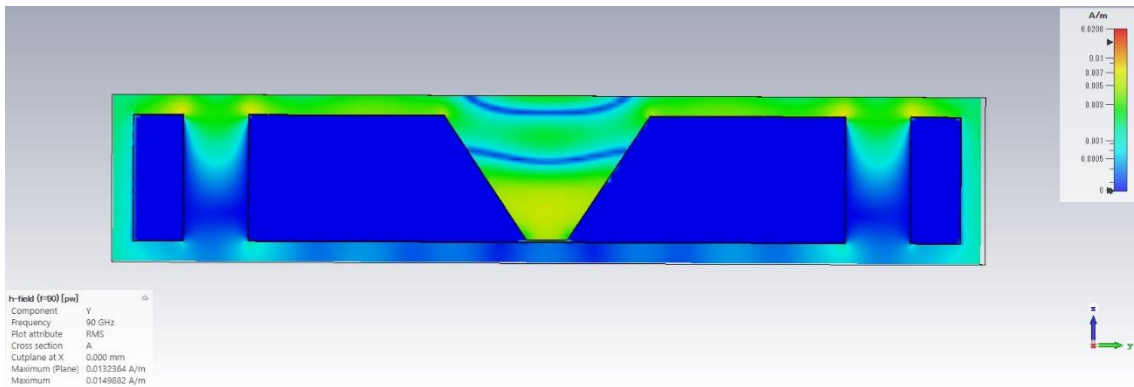


図 A6-4(e) 90 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、 $x$  軸方向から見た  $yz$  面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の  $y$  成分）の時間平均を取った Contour plot。

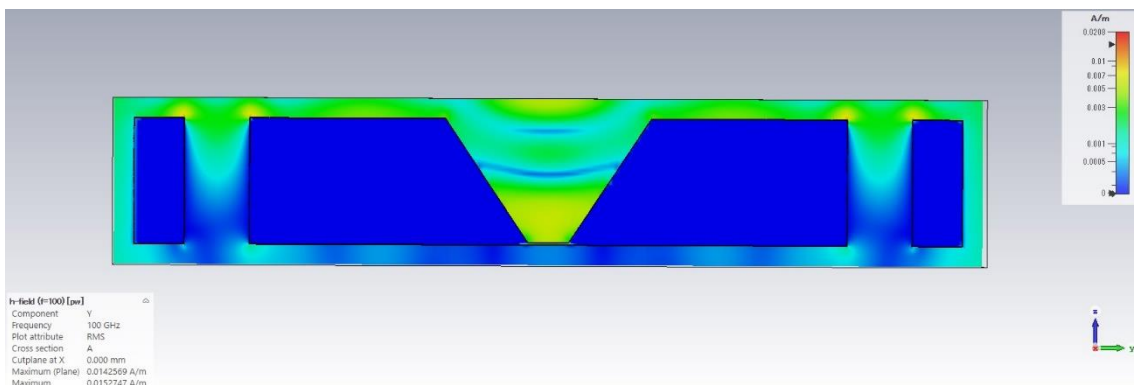


図 A6-4(f) 100 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、 $x$  軸方向から見た  $yz$  面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の  $y$  成分）の時間平均を取った Contour plot。

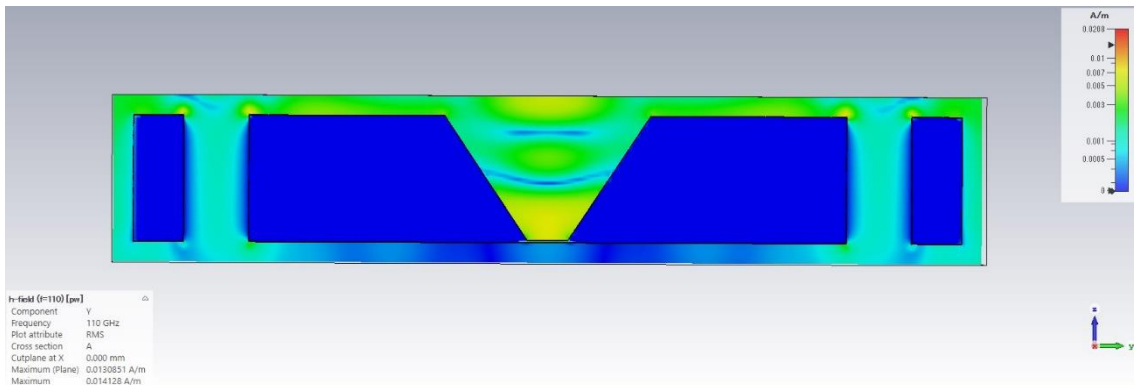


図 A6-4(g) 110 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の y 成分）の時間平均を取った Contour plot。

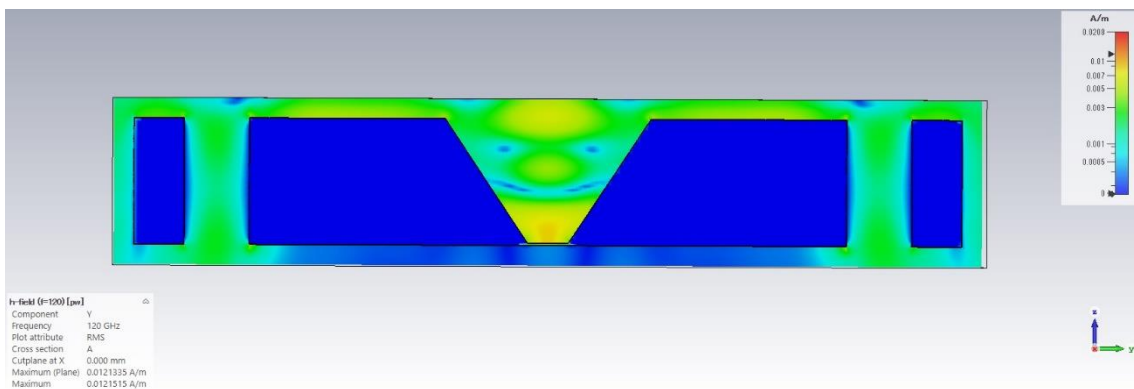


図 A6-4(h) 120 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の y 成分）の時間平均を取った Contour plot。

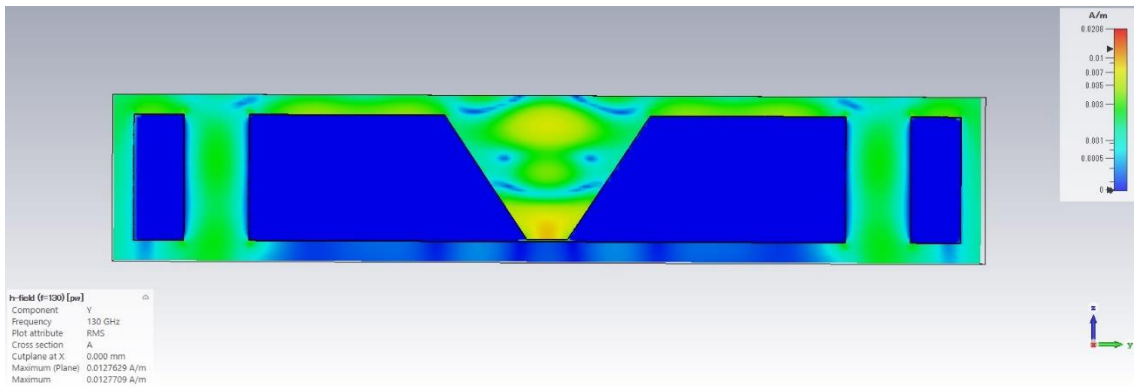


図 A6-4(i) 130 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、 $x$  軸方向から見た  $yz$  面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の  $y$  成分）の時間平均を取った Contour plot。

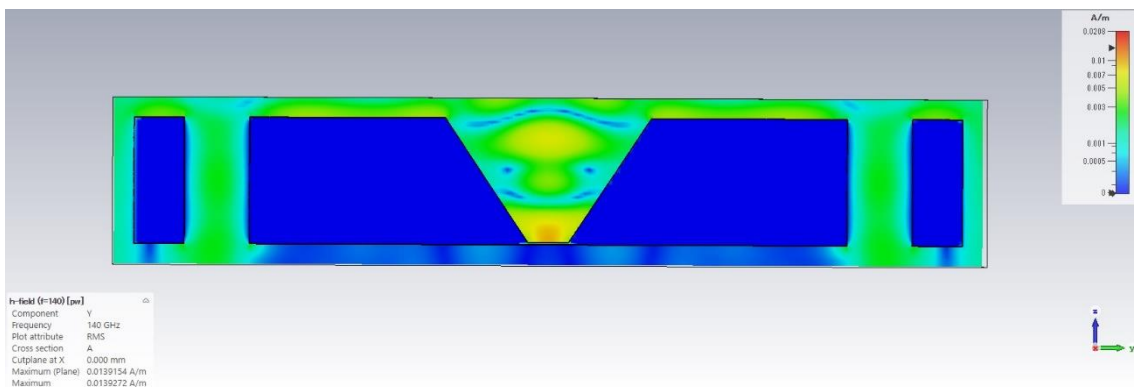


図 A6-4(j) 140 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、 $x$  軸方向から見た  $yz$  面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の  $y$  成分）の時間平均を取った Contour plot。

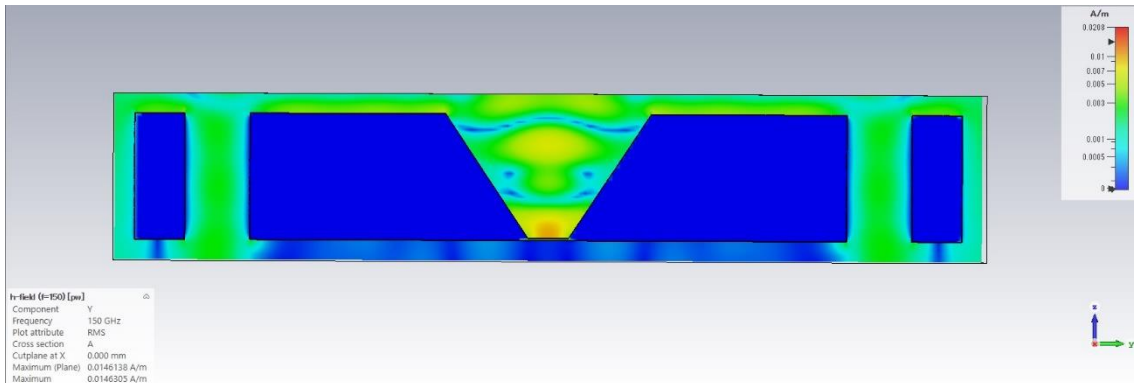


図 A6-4(k) 150 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、 $x$  軸方向から見た  $yz$  面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の  $y$  成分）の時間平均を取った Contour plot。

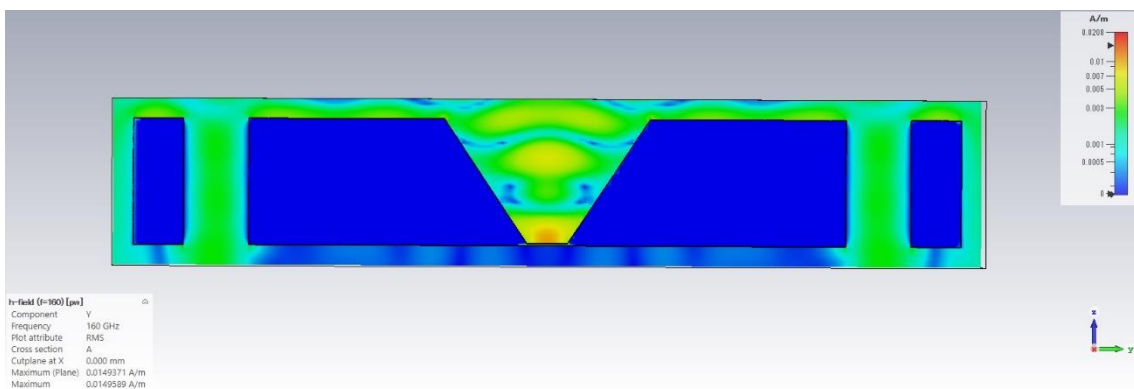


図 A6-4(l) 160 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、 $x$  軸方向から見た  $yz$  面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の  $y$  成分）の時間平均を取った Contour plot。

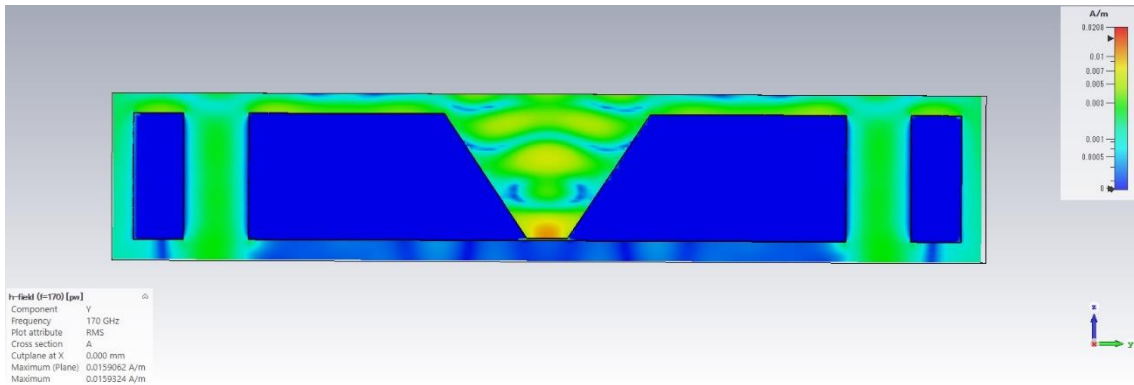


図 A6-4(m) 170 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の y 成分）の時間平均を取った Contour plot。

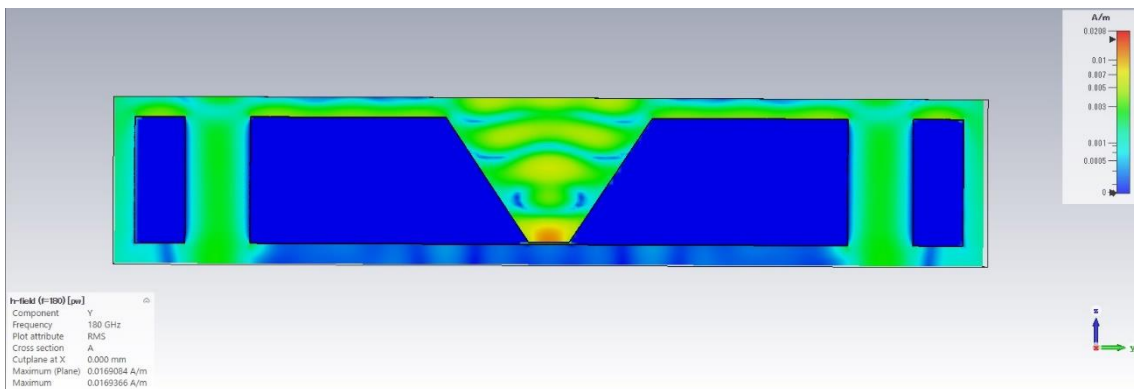


図 A6-4(n) 180 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の y 成分）の時間平均を取った Contour plot。



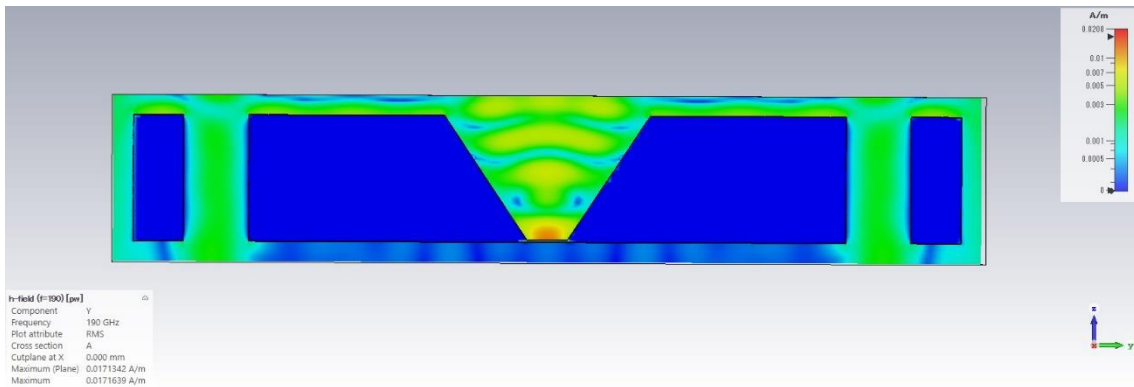


図 A6-4(o) 190 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の y 成分）の時間平均を取った Contour plot。

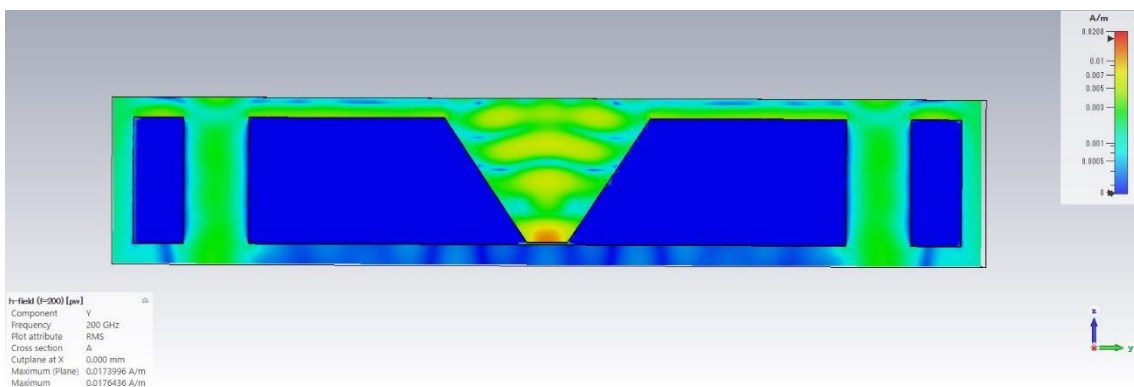


図 A6-4(p) 200 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の y 成分）の時間平均を取った Contour plot。

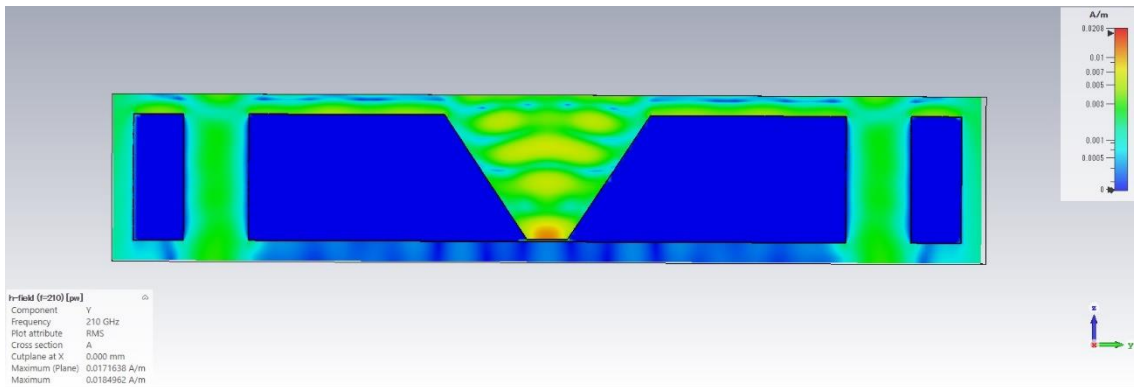


図 A6-4(q) 210 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、 $x$  軸方向から見た  $yz$  面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の  $y$  成分）の時間平均を取った Contour plot。

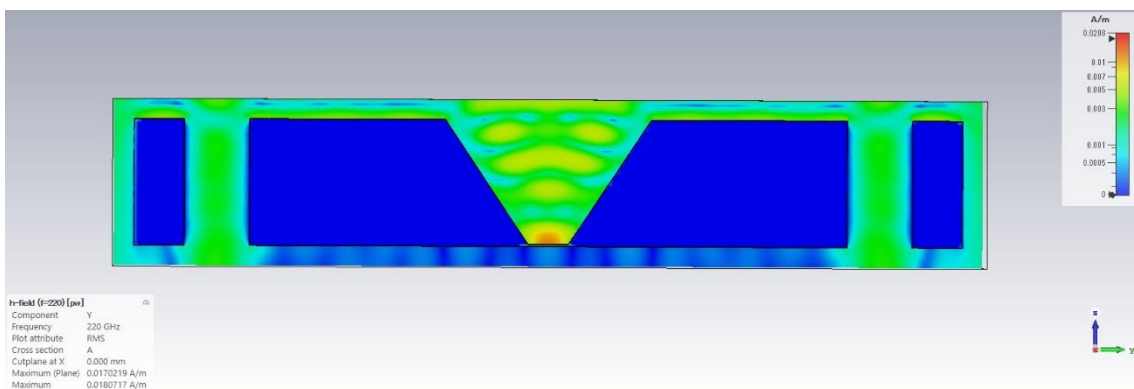


図 A6-4(r) 220 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、 $x$  軸方向から見た  $yz$  面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の  $y$  成分）の時間平均を取った Contour plot。

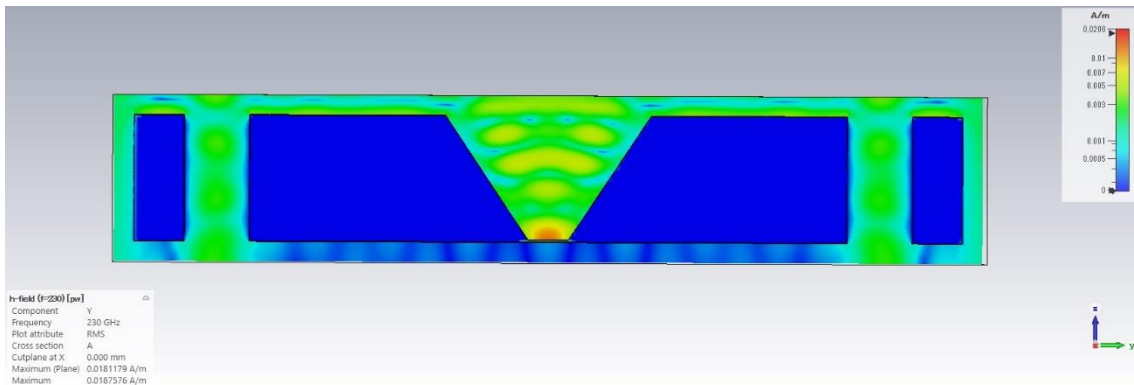


図 A6-4(s) 230 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、 $x$  軸方向から見た  $yz$  面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の  $y$  成分）の時間平均を取った Contour plot。

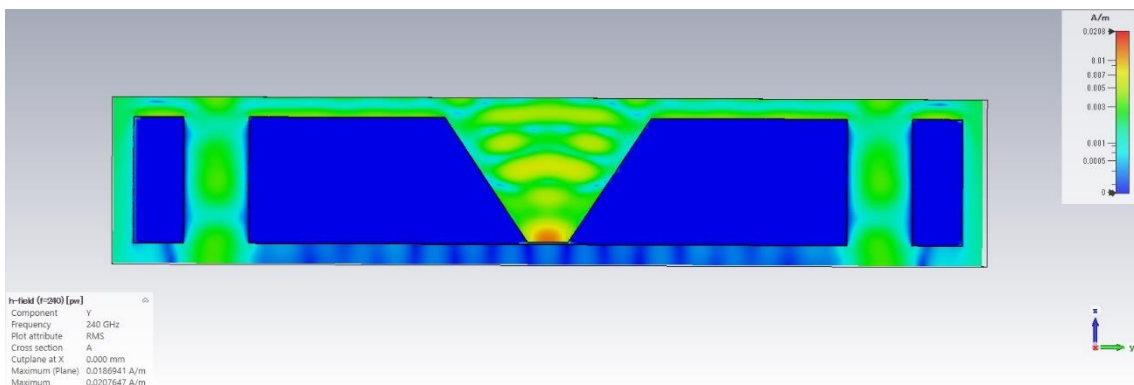


図 A6-4(t) 240 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、 $x$  軸方向から見た  $yz$  面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の  $y$  成分）の時間平均を取った Contour plot。

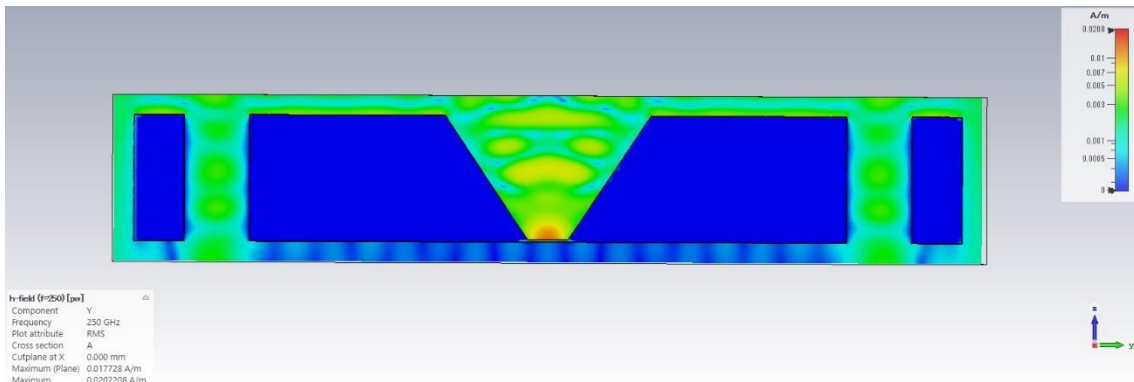


図 A6-4(u) 250 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル (電磁波の y 成分) の時間平均を取った Contour plot。

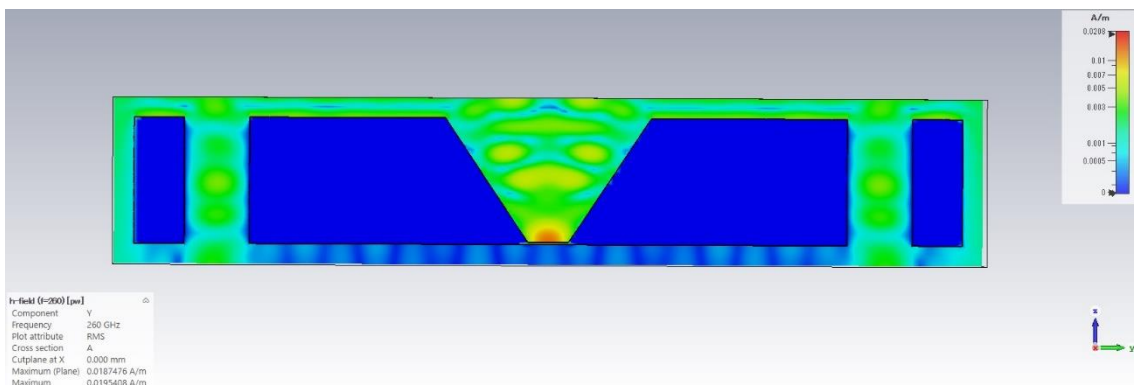


図 A6-4(v) 260 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル (電磁波の y 成分) の時間平均を取った Contour plot。

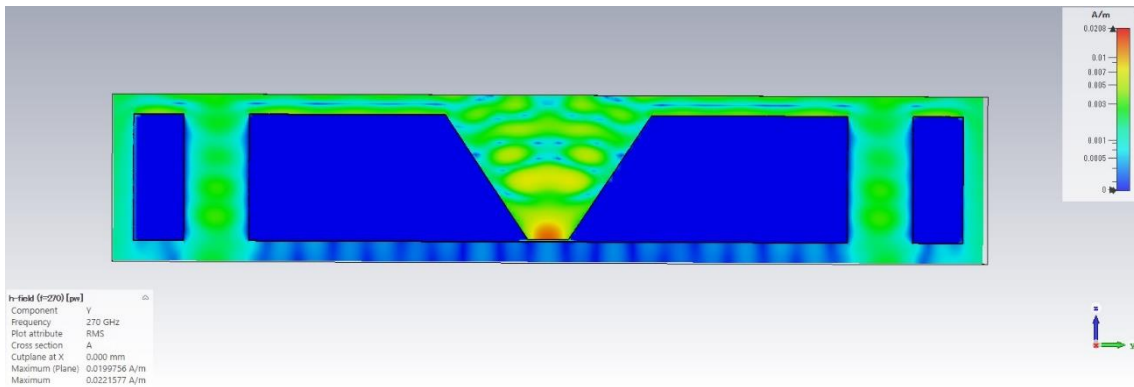


図 A6-4(w) 270 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の y 成分）の時間平均を取った Contour plot。

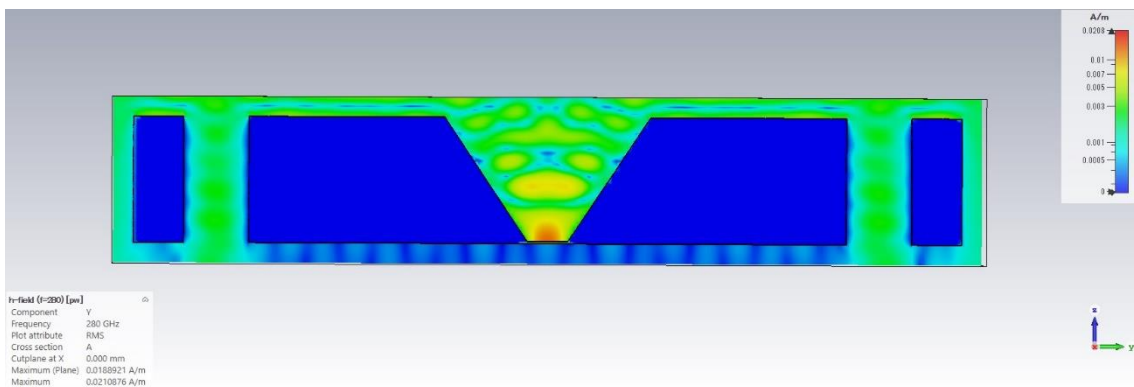


図 A6-4(x) 280 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の y 成分）の時間平均を取った Contour plot。

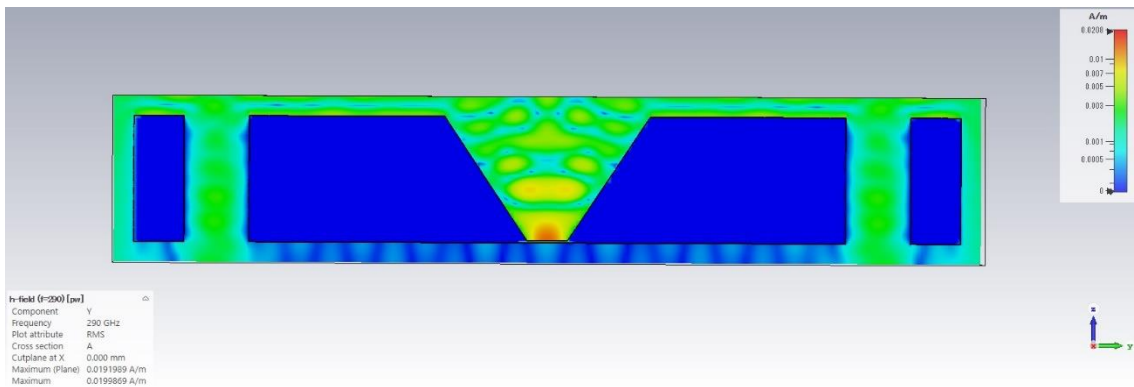


図 A6-4(y) 290 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の y 成分）の時間平均を取った Contour plot。

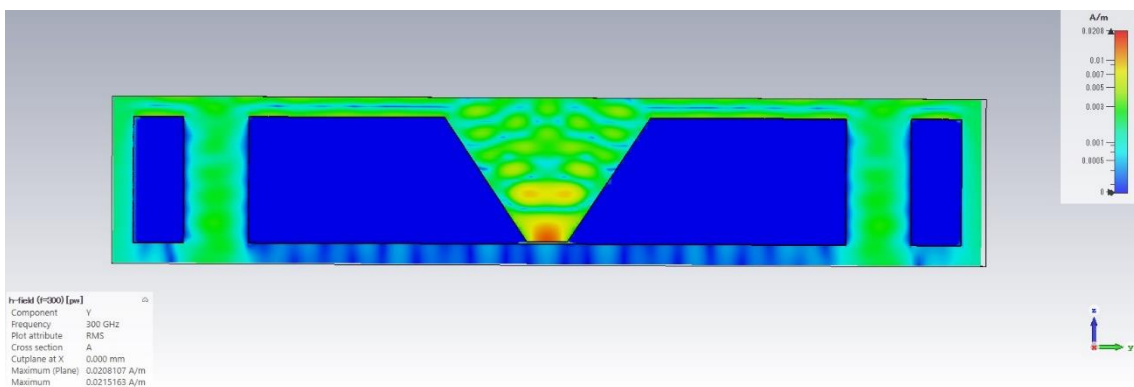


図 A6-4(z) 300 GHz の電磁波を上方から照射したと仮定した場合の、x 軸方向から見た yz 面 ( $x = 0$ ) における振動磁場ベクトル（電磁波の y 成分）の時間平均を取った Contour plot。

## Appendix-7

### 熱的磁化変調を表す 7-9 式の導出

7-8 式に示した次の微分方程式を解くことで 7-9 式を導出する。

$$\frac{d}{dt}\Delta T = -\frac{1}{\tau_{th}}\Delta T + p(1 - \sin \omega_{AM}t) \quad (7A-1)$$

ここで、 $p = \frac{P_a}{2C}$  とした。これらの式は一階非線形方程式なので、まずは次の同次方程式、

$$\frac{d}{dt}\Delta T = -\frac{1}{\tau_{th}}\Delta T \quad (7A-2)$$

を解く。変数分離形に直すと、

$$\frac{1}{\Delta T}d\Delta T = -\frac{1}{\tau_{th}}dt \quad (7A-3)$$

と書ける。両辺を不定積分すると、

$$\log|\Delta T| = -\frac{t}{\tau_{th}} + C_1 \quad (7A-4)$$

$$\Delta T = C_1^a e^{-\frac{t}{\tau_{th}}} \quad (7A-5)$$

となり、特殊解が得られる。ここから計算が煩雑になるため、7A-1 式を次の二つの式、

$$\frac{d}{dt}\Delta T = -\frac{1}{\tau_{th}}\Delta T + p \quad (7A-6)$$

$$\frac{d}{dt}\Delta T = -\frac{1}{\tau_{th}}\Delta T - p \sin \omega_{AM}t \quad (7A-7)$$

に分けて考える。まずは 7A-6 式を解く。ここから、 $C_1^a \rightarrow C_{11}^a(t)$  と置き換える。

7A-5 式の両辺を  $t$  で微分すると、

$$\frac{d}{dt}\Delta T = \frac{d}{dt}C_{11}^a(t)e^{-\frac{t}{\tau_{th}}} - \frac{1}{\tau_{th}}C_{11}^a(t)e^{-\frac{t}{\tau_{th}}} \quad (7A-8)$$

と書ける。7A-5 式と 7A-8 式を 7A-6 式に代入すると、

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}C_{11}^a(t)e^{-\frac{t}{\tau_{th}}} - \frac{1}{\tau_{th}}C_{11}^a(t)e^{-\frac{t}{\tau_{th}}} &= -\frac{1}{\tau_{th}}C_{11}^a(t)e^{-\frac{t}{\tau_{th}}} + p \\ \frac{d}{dt}C_{11}^a(t)e^{-\frac{t}{\tau_{th}}} &= p \\ \frac{d}{dt}C_{11}^a(t) &= pe^{\frac{t}{\tau_{th}}} \end{aligned} \quad (7A-9)$$

と書ける。両辺を不定積分すると、

$$C_{11}^a(t) = \tau_{th}pe^{\frac{t}{\tau_{th}}} + C_{21} \quad (7A-10)$$

が得られる。7A-10 式を 7A-5 式に代入すると、7A-6 式の解は、

$$\Delta T(t) = \tau_{th}p + C_{21}e^{-\frac{t}{\tau_{th}}} \quad (7A-11)$$

となる。

次に 7A-7 式を解く。ここから、 $C_1^a \rightarrow C_{12}^a(t)$  と置き換える。7A-5 式と 7A-8 式を 7A-7 式に代入すると、

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}C_{12}^a(t)e^{-\frac{t}{\tau_{th}}} - \frac{1}{\tau_{th}}C_{12}^a(t)e^{-\frac{t}{\tau_{th}}} &= -\frac{1}{\tau_{th}}C_{12}^a(t)e^{-\frac{t}{\tau_{th}}} - p \sin \omega_{AM}t \\ \frac{d}{dt}C_{12}^a(t)e^{-\frac{t}{\tau_{th}}} &= -p \sin \omega_{AM}t \\ \frac{d}{dt}C_{12}^a(t) &= -pe^{\frac{t}{\tau_{th}}} \sin \omega_{AM}t \end{aligned} \quad (7A-12)$$



と書ける。両辺を不定積分すると、

$$C_{12}^a(t) = -p \int e^{\frac{t}{\tau_{th}}} \sin \omega_{AM} t dt \quad (7A-13)$$

と表される。ここで次の二つの関係

$$\int e^{\frac{t}{\tau_{th}}} \sin \omega_{AM} t dt = \tau_{th} e^{\frac{t}{\tau_{th}}} \sin \omega_{AM} t - \omega_{AM} \tau_{th} \int e^{\frac{t}{\tau_{th}}} \cos \omega_{AM} t dt \quad (7A-14)$$

$$\int e^{\frac{t}{\tau_{th}}} \cos \omega_{AM} t dt = \tau_{th} e^{\frac{t}{\tau_{th}}} \cos \omega_{AM} t + \omega_{AM} \tau_{th} \int e^{\frac{t}{\tau_{th}}} \sin \omega_{AM} t dt \quad (7A-15)$$

を用いると、

$$(\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1) \int e^{\frac{t}{\tau_{th}}} \sin \omega_{AM} t dt = \tau_{th} e^{\frac{t}{\tau_{th}}} (-\omega_{AM} \tau_{th} \cos \omega_{AM} t + \sin \omega_{AM} t) \quad (7A-16)$$

が得られる。よって、7A-13 式は、

$$C_{12}^a(t) = -\frac{\tau_{th} p}{\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1} (-\omega_{AM} \tau_{th} \cos \omega_{AM} t + \sin \omega_{AM} t) e^{\frac{t}{\tau_{th}}} + C_{22} \quad (7A-17)$$

が得られる。7A-17 式を 7A-5 式に代入すると、7A-7 式の解は、

$$\Delta T(t) = -\frac{\tau_{th} p}{\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1} (-\omega_{AM} \tau_{th} \cos \omega_{AM} t + \sin \omega_{AM} t) + C_{22} e^{-\frac{t}{\tau_{th}}} \quad (7A-18)$$

となる。7A-11 式、7A-18 式より、7A-1 式の解は、

$$\Delta T(t) = \tau_{th} p \left( 1 - \frac{\sin \omega_{AM} t - \omega_{AM} \tau_{th} \cos \omega_{AM} t}{\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1} \right) + C_2 e^{-\frac{t}{\tau_{th}}} \quad (7A-19)$$

となる。初期条件  $\Delta T(t) = 0$  より、

$$0 = \tau_{th} p \left( 1 - \frac{0 - \omega_{AM} \tau_{th}}{\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1} \right) + C_2$$

$$C_2 = -\tau_{th} p \left( 1 + \frac{\omega_{AM} \tau_{th}}{\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1} \right) \quad (7A-20)$$

が得られる。ここで、 $\tan \varphi = \omega_{AM} \tau_{th} > 0$  と置く。  $1 + \tan^2 \varphi = \frac{1}{\cos^2 \varphi}$  より、

$$\cos^2 \varphi = \frac{1}{\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1}$$

$$\cos \varphi = \frac{1}{\sqrt{\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1}} \quad (7A-21)$$

が得られ、さらに、 $\tan \varphi = \frac{\sin \varphi}{\cos \varphi}$  より、

$$\sin \varphi = \frac{\omega_{AM} \tau_{th}}{\sqrt{\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1}} \quad (7A-22)$$

が得られる。7A-19 式左辺のカッコ内の第二項は、

$$-\frac{\sin \omega_{AM} t - \omega_{AM} \tau_{th} \cos \omega_{AM} t}{\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1}$$

$$= \frac{1}{\sqrt{\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1}} \cdot \frac{\sin \omega_{AM} t - \omega_{AM} \tau_{th} \cos \omega_{AM} t}{\sqrt{\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1}}$$

$$\begin{aligned}
&= \frac{1}{\sqrt{\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1}} \cdot \left( \sin \omega_{AM} t \cdot \frac{1}{\sqrt{\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1}} - \cos \omega_{AM} t \cdot \frac{\omega_{AM} \tau_{th}}{\sqrt{\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1}} \right) \\
&= \frac{1}{\sqrt{\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1}} \cdot (\sin \omega_{AM} t \cdot \cos \varphi - \cos \omega_{AM} t \cdot \sin \varphi) \\
&= \frac{1}{\sqrt{\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1}} \cdot \sin(\omega_{AM} t - \varphi) \tag{7A-23}
\end{aligned}$$

と変形出来るので、7A-19 式は、7A-20 式と 7A-23 式を用いて、

$$\Delta T = \tau_{th} p \left\{ 1 - \frac{\sin(\omega_{AM} t - \varphi)}{\sqrt{\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1}} - \left( 1 + \frac{\omega_{AM} \tau_{th}}{\omega_{AM}^2 \tau_{th}^2 + 1} \right) e^{-\frac{t}{\tau_{th}}} \right\} \tag{7A-24}$$

が得られる。よって、7-9 式が導出された。