

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23350054

研究課題名(和文) 単一分子七次元計測による高分子の動的特性の評価

研究課題名(英文) Dynamics of polymer chains revealed by a single molecule detection in 7 dimensions

研究代表者

伊藤 紳三郎 (ITO, SHINZABURO)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50127049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、高分子鎖一本一本の分子運動を直接的に評価可能な新しい顕微鏡システムの開発を行うことで、薄膜中のダイナミクスを評価することを目的としている。個々の分子の位置(x,y,z)および配向(θ, ϕ)を同時に検出可能な顕微鏡光学系を構築した。さらに分光検出によって分子の発光色を分離することで異なる蛍光分子を識別可能とした。このように分子一個の6つのパラメータ(x,y,z, θ, ϕ, λ)を時間tの関数として計測可能な顕微鏡の構築に成功した。この顕微鏡によってポリメチルアクリレート薄膜の分子運動を評価した。その結果、超薄膜中においては面外方向の回転拡散が著しく制限されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The current study developed a single molecule detection system, which allows the simultaneous observation of the position (x, y, z), orientation (θ, ϕ), and emission wavelength λ , as a function of time t. This system enables us to completely record the motion of a single fluorescent molecule.

The dynamics of poly(methyl acrylate) films was examined by the single molecule microscopy system developed here. The rotational motion in an ultra thin film with a thickness of 5 nm was suppressed compared to that in a three-dimensional bulk state. The detailed analysis of the molecular rotation revealed that the rotational relaxation time in the out-of-plane direction was 30-times longer than that in a bulk state and that the in-plane rotation in the ultra-thin film was almost the same as that in a bulk system. This indicates that the molecular rotation in an ultra-thin film is restricted only in the thickness direction.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：単一分子計測 蛍光顕微鏡 高分子薄膜 分子運動

1. 研究の背景

高分子材料はゴム弾性や粘弾性、ガラス転移などの特徴的な物性を示すが、これは高分子鎖の動的特性に由来するものであり、バルク材料中で高分子主鎖あるいは側鎖置換基がどのような運動をしているかが重要な問題となる。そのため高分子のダイナミクスに関する研究は古くから理論・実験の両面から精力的に行われてきた。高分子の動的特性を考える上での基本は“一本の鎖”であり、理論においては形態や鎖間の相互作用をモデル化することでマクロな物性を予測し、力学緩和や光散乱などの実験においては個々の鎖の性質の積分として現れた物理量を測定する。しかしながらこのような従来のアプローチにおいて、理論では一本鎖の性質からマクロ物性を導く間には様々な仮定によって鎖を単純化したモデルに基づいて構築されており、一方で実験的に観測されるのは多数の鎖の平均的な振る舞いの結果として表れる現象となっているため、現状では“高分子鎖一本”の直接的な情報を得ることは難しく、個々の高分子鎖の振る舞いは十分に理解されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、高分子鎖一本一本を直接的に観察し、時々刻々と変化する鎖のすがたをリアルタイムでとらえることで、その分子運動を詳細に評価することを目的としている。高分子鎖一本に蛍光分子を結合し、顕微鏡で直接観察する蛍光イメージング法は、バルク内の個々の高分子鎖を検出する最も有力な手法である。しかし通常の光学顕微鏡では得られる情報が限定されているために、詳細な分子のダイナミクスを評価することは困難である。そこで、高分子鎖一本の位置・配向など様々な状態を高精度に評価することのできる実空間・実時間観察の手法を確立することを研究目的としている。そして、新たに開発した手法を用いることによって高分子のダイナミクスの本質を明らかとすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 顕微鏡システムの構築

一つの分子の運動状態を完全に追跡するためには、その位置 (x, y, z) 、配向 (θ, ϕ) をリアルタイムで記録することが必要となる。本研究では (x, y, z, θ, ϕ) を同時にかつ高精度に検出可能な顕微鏡システムの構築を行った。さらに異なる 2 種の色素分子を用い、その波長 λ を分離して検出することで、複数種の分子を追跡可能なシステムの構築を目指した。このように複数分子それぞれについて位置及び配向状態すなわち $(x, y, z, \theta, \phi,$

$\lambda, t)$ の 7 つのパラメータを同時に検出可能な顕微鏡の構築を試みた。

(2) 高分子薄膜中のダイナミクス

色素分子としてペリレンジイミド誘導体を用いた。高分子薄膜中に色素分子を導入し、時々刻々と変化する色素分子の位置・配向を開発した顕微鏡システムによってリアルタイムで追跡することで、その分子運動性を評価した。

4. 研究成果

(1) 顕微鏡システムの構築

蛍光顕微鏡が像中で蛍光分子一個は 200 nm 程度に広がった輝点として観察される。その分子の位置 (x, y) は輝点の中心位置として見積もることができる。通常の顕微鏡観測においてもノイズの十分に少ない画像を取得できれば 3 nm 程度の精度で (x, y) を評価することができる (Fluorescence Imaging with One-Nanometer Accuracy: FIONA 法)。一方、 z 座標については通常の顕微鏡では数 100 nm 以下の精度が得られない。そこで本研究では顕微鏡の光路にシリンドリカルレンズを挿入した光学系を構築した。これにより導入された非点収差によって、焦点面からのわずかなずれによって輝点が楕円形に観測される。その形状を解析することで 50 nm の精度で分子の z 座標を評価することに成功した。

分子配向 (θ, ϕ) については、デフォーカス計測によって評価可能である。しかしながらデフォーカス像からは分子の位置 (x, y, z) を求めることができない。本研究は (x, y, z, θ, ϕ) の同時評価を実現するために、図 1a に示すような光学系を構築することで、試料からの信号を分岐し、一方の光路長を延長することで焦点距離を変えることによって FIONA 法とデフォーカス法の同時測定を可能

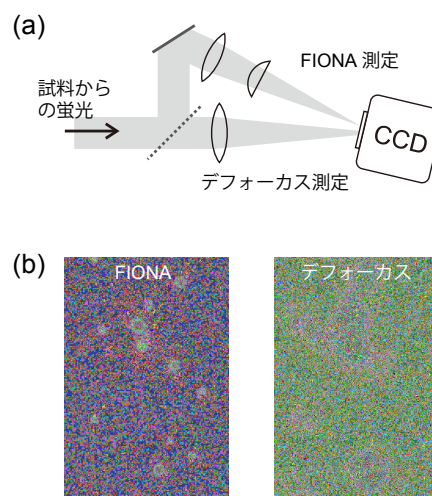


図 1 位置・配向同時測定のための顕微鏡光学系 (a) と得られた顕微鏡画像 (b)

にした。図 1b は PMMA 薄膜中に分散したペリレンジイミド分子について同時計測した FIONA 解析のための合焦状態での蛍光画像およびデフォーカス画像である。それぞれの画像の解析から (x, y, z, θ, ϕ) を得ることができた。固定した分子について多数回の測定を行い、得られた値の標準偏差を計測精度として見積もったところ、 (x, y, z, θ, ϕ) について、それぞれ 6.2 nm, 6.4 nm, 52 nm, 5.5° , 2.4° であり、高精度に分子の位置と配向を決定可能な顕微鏡システムを構築することができた。

次いで、波長分離を行うことによって異なる蛍光分子を識別可能な計測系の構築を行った。その光学系は図 1a に示すものと類似であるが、ビームスプリッターとしてダイクロイックスプリッターを使用した。本研究においてはペリレンジイミド誘導体に加えて、カルボシアニン系色素である DiD の同時観察を可能にするため、波長 650 nm より短波長の光を反射し、長波長を透過するダイクロイックビームスプリッターを用いた。これにより発光波長の異なる複数の分子を独立に同時計測することを実現した。一方、励起波長についても複数の波長を選択可能な光学系を構築した。光源としてスーパーコンティニュームレーザーを導入した。これは波長 450–800 nm を同時発振しているため、その中から任意の波長の光を選択可能な分光器を図 2 のように設計し、実装した。図中のスリットの位置と幅を調整することで任意の波長及び波長幅のビームを取り出すことができる。これによって任意の励起波長 λ_{ex} を選択し、発光波長 λ_{em} で分離した上で個々の分子の位置・配向を計測することが可能となった。

一回の分子の位置・配向計測には 50–100 ms 程度の積算時間が必要とされる。そのため 1 秒あたり 10–20 程度のフレームレートで分子

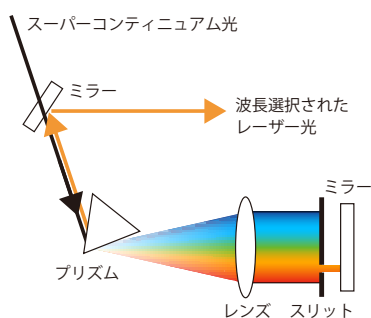


図 2 スーパーコンティニュームレーザー光源を用いた励起光学系の模式図。プリズムとスリットによって任意の波長・帯域幅の光を取り出すことができる。二重スリットを用いることで複数の波長を取り出すことも可能である。

運動を計測することができた。このように個々の分子について $(x, y, z, \theta, \phi, \lambda, t)$ の 7 つのパラメータを計測する高感度の顕微鏡システムの構築に成功した。

(2) 高分子薄膜中のダイナミクス

高分子薄膜中においては、鎖は界面の存在によって空間的に拘束されており、その分子運動性は制限を受けるものと考えられる。本研究では分子量 10 万のポリメチルアクリレート (PMA) を試料として、分子運動性を評価した。プローブとなる蛍光色素分子として N, N' -Bis(2,6-dimethylphenyl)-3,4,9,10-perylenetetra-carboxylic diimide (PDI) を PMA 中に分散し、5 nm と 120 nm のスピコート膜を作成した。ここで PMA の分子量は PDI 分子の位置と配向パラメータ (x, y, z, θ, ϕ) を 100 ms の時間分解能で蛍光顕微鏡観察によって評価した。

15–30°C の測定温度範囲内において、PMA 中の PDI 分子の位置 (x, y, z) には測定精度 (約 6 nm) 以上の変化が見られず、PDI 分子の並進拡散はほとんど見られないことが分かった。一方、分子の配向角 (θ, ϕ) は 10 分の測定時間内に時々刻々変化する様子が観察され、PDI 分子が回転運動していることが示された。その運動の速度を評価するため、PDI 分子の配向自己相関関数 $\Phi(\tau)$ を次式に従って算出した。

$$\Phi(t) = \left\langle \frac{3\{\mathbf{M}(t+\tau) \cdot \mathbf{M}(t)\}^2 - 1}{2} \right\rangle_t$$

ここで $\langle \rangle_t$ は時間 t についての平均を表し、 $\mathbf{M}(t)$ は時間 t における分子の向きを表すベク

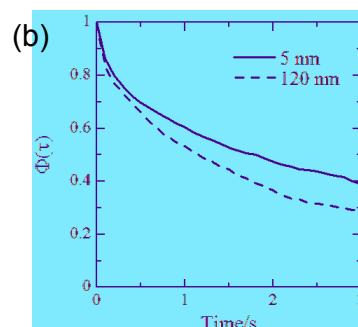
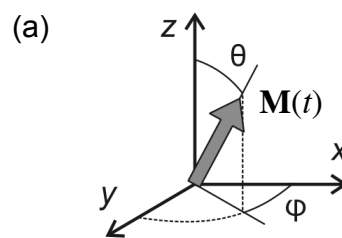


図 3 分子配向の座標系 (a) と PMA の配向自己相関関数 $\Phi(\tau)$ (b)

トル (図 3a) である。図 3b に膜厚 5 nm 及び 120 nm の試料についての $\Phi(\tau)$ を示す。PMA 中では数秒の緩和時間スケールの回転運動を示していることが分かる。ここで $\Phi(\tau)$ の減衰速度に膜厚依存性が見られ、薄膜中では運動性が低下していることが分かった。ここで 5 nm の薄膜では、膜厚が PMA の回転半径と同程度であるのに対し、120 nm の試料では膜厚は PMA 鎖のサイズに対して十分大きい。そのため 5 nm の薄膜中では PMA は高さ方向に空間的拘束がかかっていると見なすことができる。このような薄膜中での分子運動性を詳細に検討するため、膜面内の回転運動を表す ϕ の自己相関関数 $\Phi_{\phi}(\tau)$ 、および面外の運動を表す θ の自己相関 $\Phi_{\theta}(\tau)$ を評価した。図 4 に面内、面外の分子運動成分の自己相関関数を示す。面内の分子運動については 5 nm および 120 nm の膜厚で緩和時間がそれぞれ 14.8 s および 6.1 s であり、超薄膜中では分子運動性が 2 倍程度低下していることが分かった。一方、面外の運動については緩和時間は膜厚 120 nm の試料が 5.6 s と面内回転とほぼ同じ緩和時間を示しているのに対して、超薄膜状態では 150 s と運動性が大きく制限されていることが分かった。このように超薄膜中では高さ方向の空間的拘束によって、面外方向の分子回転が阻害されることが、顕微鏡による直接観察によってはじめて明らかになった。

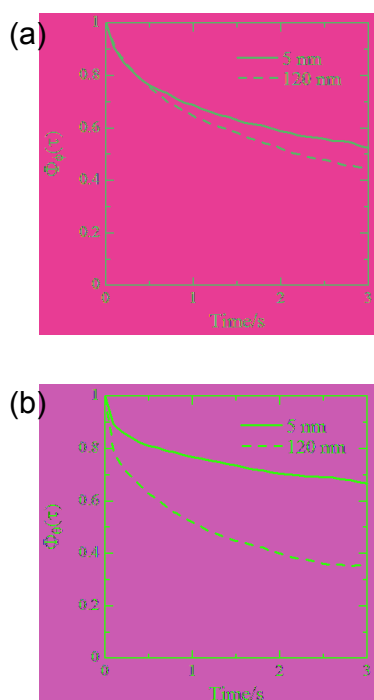


図 4 PMA フィルムにおける分子運動の面内成分(a)と面外成分(b)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① [Hiroyuki Aoki](#), Kazuki Mori, Toshiaki Takahashi, [Shinzaburo Ito](#), "Quantitative Analysis of End-to-end Distance of Single Polymer Chain in Ultra-thin Film by Super-resolution Fluorescence Imaging", Chem. Phys., 419, 54-58 (2013), DOI: 10.1016/j.chemphys.2012.12.026.
- ② Toru Ube, Akihiko Shin, [Hiroyuki Aoki](#), [Shinzaburo Ito](#), "Conformation of Single Polymer Chain in Rubbed Thin Film Observed by Fluorescence Imaging", Langmuir, 28, 13871-13876 (2012), DOI: 10.1021/la302513c.
- ③ Hiroyuki Aoki, Kazuki Mori, [Shinzaburo Ito](#), "Conformational Analysis of Single Polymer Chains in Three Dimensions by Super-resolution Fluorescence Microscopy", Soft Matter, 8, 4390-4395 (2012), DOI: 10.1039/C2SM07227K.
- ④ Toru Ube, [Hiroyuki Aoki](#), [Shinzaburo Ito](#), Jun-ichi Horinaka, Toshikazu Takigawa, "Relaxation of Single Polymer Chain in Binary Molecular Weight Blends Observed by Scanning Near-field Optical Microscopy", Soft Matter, 8, 5603-5611 (2012), DOI: 10.1039/C2SM25272D.
- ⑤ Toru Ube, [Hiroyuki Aoki](#), [Shinzaburo Ito](#), Jun-ichi Horinaka, Toshikazu Takigawa, Toshiro Masuda, "Relaxation of Single Polymer Chain in Poly(methyl methacrylate) Films under Uniaxial Extension Observed by Scanning Near-field Optical Microscopy", Macromolecules, 44, 4445-4451 (2011), DOI: 10.1021/ma2004986.
- ⑥ [Hiroyuki Aoki](#), Jun-ichi Kakuta, Tomoyuki Yamaguchi, Satoshi Nitahara, [Shinzaburo Ito](#), "Near-infrared Fluorescent Nano-particle of Low-bandgap π -conjugated Polymer for in vivo Molecular Imaging", Polym. J., 43, 937 - 940 (2011), DOI: 10.1038/pj.2011.86.
- ⑦ Li-Ting Lee, Toru Ube, Hiroyuki Aoki, [Shinzaburo Ito](#), "Characterization of Surface Compositions of Phase-Separated Structures in Conjugated Poly(phenylene vinylene) Blends by Scanning Near-Field Optical

Microscopy”, Polymer, 52, 5897-5903
(2011) , DOI:
10.1016/j.polymer.2011.10.043.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 黒田泰樹, 青木裕之, 伊藤紳三郎, “スピ
ンコート膜中における単一高分子鎖
の配向:超解像顕微鏡による直接観察”,
第 15 回高分子表面研究討論会 (東京理
科大森戸記念館), 2013/2/1.
- ② 黒田泰樹, 青木裕之, 伊藤紳三郎, “ス
ピンコート法により作製した PMMA 薄膜
中の単一高分子鎖の形態評価”, 第 61
回高分子討論会 (名古屋工業大学),
2012/9/20.
- ③ 青木裕之, 黒田泰樹, 伊藤紳三郎, “ス
ピンコート薄膜中における単一高分子
鎖のコンホメーション”, 第 62 回高
分子討論会 (金沢大学), 2012/9/13.
- ④ 進章彦, 宇部達, 青木裕之, 伊藤紳三
郎, “せん断変形下における単一高分子
鎖の形態変化の評価 -超解像光学顕微
鏡による直接観察-”, 第 61 回高分子年
次大会 (パシフィコ横浜), 2012/5/31.
- ⑤ 青木裕之, 森一樹, 伊藤紳三郎, “超解
像光学三次元イメージングによる単一

高分子鎖の形態評価”, 第 60 回高分子
討論会 (岡山大学), 2011/9/28.

[図書] (計 2 件)

- ① 青木裕之, “近接場光”, 高分子ナノテ
クノロジーハンドブック, 西敏夫 編,
第 3 章, 第 5 節, pp. 715-722, エヌ・
ティー・エス, 2014.
- ② 青木裕之, “光学顕微鏡”, 高分子ナノ
テクノロジーハンドブック, 西敏夫 編,
第 4 章, 第 2 節, pp. 732-740, エヌ・
ティー・エス, 2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 紳三郎 (ITO, Shinzaburo)
京都大学・工学研究科・教授
研究者番号: 50127049

(2) 研究分担者

青木 裕之 (AOKI, Hiroyuki)
京都大学・先端医工学研究ユニット・特定
准教授
研究者番号: 90343235