

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24655207

研究課題名（和文）単一分子分光による高分子ダイナミクスの空間相関解析

研究課題名（英文）Spatial correlation of dynamics of polymer materials studied by single molecule spectroscopy

研究代表者

青木 裕之 (HIROYUKI AOKI)

京都大学・先端医工学研究ユニット・准教授

研究者番号：90343235

研究成果の概要（和文）：

ガラス転移の機構を明らかにする上で動的不均一性を理解することは不可欠である。本研究では分子運動性の空間分布について実空間での解析を行うことを可能にするため、分子一つ一つを直接観察することで、その運動の様子をリアルタイムで追跡可能な蛍光顕微鏡システムの開発を目的として研究を行った。マルチチャンネルのデフォーカス計測顕微鏡法および分子運動解析ソフトの開発により、分子間の運動状態の相関について評価可能なシステムを構築することができた。その結果、80 nm 以上の離れた分子同士について運動性の相関は見られないことが示された。

研究成果の概要（英文）：

Dynamics heterogeneity is a key concept to understand the glass transition phenomenon; however, it has been difficult to obtain the direct information on the spatial distribution of the mobility of the molecules. In this study, a novel fluorescence microscopy system was developed to observe the dynamics of a single molecule in real time and space. The spatial correlation analysis of the mobility of the molecule revealed that there was no correlation among the molecules at a distance of > 80 nm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野： 化学

科研費の分科・細目： 材料科学・高分子・繊維材料

キーワード： 高分子材料・単一分子計測・分子運動・蛍光顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

ガラス転移は高分子をはじめとして多く

の物質において古くから知られている現象である。液体（ゴム）状態から冷却すると、

ある温度を境に分子の熱運動が凍結されることでガラス状態へと転移するとされている。しかしながら、その分子論的描像は未だよく分かっていないのが実情である。ガラス転移においては空間的に不均一な動的性質を示すことが明らかになっている。しかしながら従来の実験的研究においては、多数の分子のアンサンブル平均を観測しているため、このような分子レベルのダイナミクスについて空間的な不均一性を直接評価することは難しい。そのため、個々の分子の運動相関・不均一性の直接評価を可能にする新たな実験手段の提案が望まれていた。本研究では、分子一つ一つの運動を直接観察することで、分子間のダイナミクスの空間的な相関を評価することが可能な新たな計測法を提案することを目的として研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では単一分子の分子運動の様子をリアルタイムで直接追跡可能な顕微鏡の開発を行い、分子運動性の空間分布を評価するための新しい方法論を提案し、動的不均一性や異なる分子間の相関を定量することで分子運動の協同性を明らかにすることを目的としている。

高分子材料中に分散した蛍光色素分子一個一個について位置座標(x, y, z)とともに配向方向(θ, φ)を同時に追跡することが可能な新たな顕微鏡光学系の開発を行うことを目的とした。また、これを用いて測定した複数の分子間の運動性の相関を評価するための手法を提案し、高分子材料内で起こる分子運動性の協同性について解析を行うことを目指した。

3. 研究の方法

単一分子計測には波長 532 nm および 635 nm のレーザー光源を励起光とする蛍光顕微鏡を用いた。CCD カメラによる観察ポートからの信号光をレンズによってコリメートした後、ビームスプリッターを配置することで分岐した。このビームスプリッターあるいは後段に設置されるフィルター類を適切に

選択することで、位置・配向の同時高精度計測やマルチカラー同時計測が可能な顕微鏡システムを作製する。

ポリブチルメタクリレート (PBMA、分子量 10 万) を試料高分子として用いた。ここに蛍光色素である N,N'-Bis(2,6-dimethylphenyl)perylene-3,4,9,10-tetracarboxylic diimide (PDI) および 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine (DiD)を混合して分散し、PBMA のガラス転移点 (20°C) より高温の 30°Cにおいて蛍光顕微鏡による観察を行った。

4. 研究成果

4. 1. マルチフォーカス顕微鏡

蛍光顕微鏡観察において分子一個は円形の輝点として観察され、その位置(x, y)は輝点の中心として 5 nm の精度で決定することができる。一方、深さ方向の z 座標と分子配向(θ, φ)は、合焦条件 (ピン트가合った状態) から対物レンズを 1 μm シフトさせたデフォーカス条件で得られるパターンの形状から得ることができる。このように分子一個の座標(x, y, z, θ, φ)を高精度に決定できるが、フォーカス条件が異なるため、5 つのパラメータを同時に決定することはできない。そこで図 1 のように光路を分岐することで、撮像条件の異なる蛍光画像を同時に取得可能なマルチチャンネル顕微鏡システムの構築を行った。カメラ手前に設置されたレンズで検出光をコリメートした後、ビームスプリッター (BS) を設置して光を 2 つに分岐した後、適当な光学素子を透過し、同一のカメラの異なる位置に結像される。まず(x, y, z, θ, φ)の同時計測を実現するために、ビームスプリッター (BS) として無偏光 BS を挿入した。ここでフィルター 1 として凸レンズを挿入すると (フィルター 2 は空)、2 つの光路で焦点距離が異なった画像が得られる。その結果、CCD カメラの左側に合焦状態の画像が、右にはデフォーカス画像を同時に記録することが可能となる。このようにして (x, y, z, θ, φ)の 5 次元のパラメータを同時に取得することを可能にした。

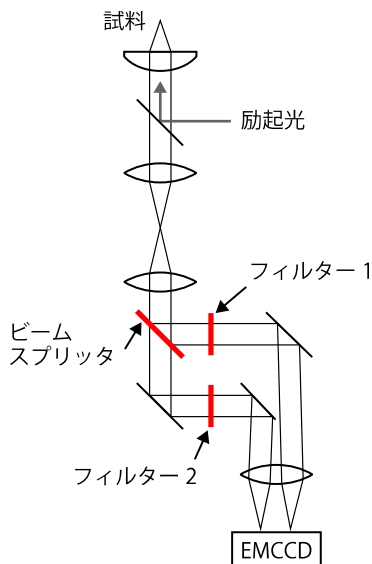


図 1. マルチチャンネル蛍光顕微鏡の光学系

4. 2. マルチカラー計測顕微鏡

蛍光顕微鏡観察において複数種の蛍光分子を同時に検出するために、波長を選別して、それぞれを独立に同時観察可能なマルチカラー顕微鏡を開発した。図 1 に示した顕微鏡の光学系において、BS を 600 nm 以下の波長を反射し、それ以上の波長を透過するダイクロイックミラーとした。フィルター 1 として透過帯域 550 - 580 nm のバンドパスフィルター (BPF) を、フィルター 2 として 650 - 720 nm の BPF を設置することで、PDI と DiD の蛍光画像を分離して同時計測することを可能にした。これにより PDI と DiD は互いに回折限界以下の距離にまで接近しても、それぞれ別の画像上に分離して観察されるため、それぞれの位置を高精度で決定することができる。

4. 3. 分子運動の相関解析

本研究で開発したマルチフォーカス顕微鏡によって分子一つの運動を追跡した。デフォーカスパターンは時々刻々と変化したことから、分子は回転運動を示すことが明らかとなった。一方、1 時間の測定時間および 20-30°C の測定温度範囲で分子の位置 (x, y, z) の変化は 10 nm 以下と小さく、分子の並進拡散はほとんど起こらないことが明らかになった。すなわち PBMA 中で分子は並進することなく回転運動していることが明らかと

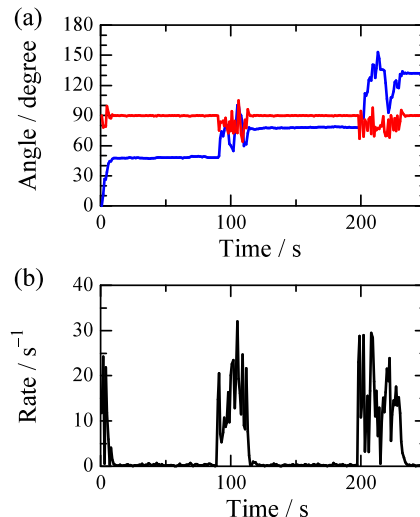


図 2. 回転運動する分子の極角 θ (青) と方位角 φ (赤) の時間発展 (a) と回転速度定数 k の時間発展 (b)。

なった。そのため以降の運動性の評価にはデフォーカス測定による (θ, φ) の時間変化のみを解析した。

分子の配向座標 (θ, φ) の時間発展の例を図 2a に示す。これは、分子は連続的に運動しているのではなく、ある一定時間ランダムな運動を示した後に静止し、再び動き出すという間欠的な運動をしていることを示している。ここで、ある時刻 t における分子運動の速度 $k(t)$ を次のように定義した。

$$k(t) = \frac{\text{Cos}^{-1}(\mathbf{M}(t) \cdot \mathbf{M}(t + \Delta t))}{\Delta t}$$

ここで $\mathbf{M}(t)$ は時刻 t での分子の配向方向に一致する単位ベクトル、 Δt は測定時の露光時間である。図 2a のような運動を示す分子についての分子運動速度の時間発展は図 2b のようになり、運動の速度が変化している様子が分かる。このように 1 つの分子の運動を直接追跡することで、時間的に間欠的な運動を示すことが明らかとなった。

分子が時刻 t において運動しているかあるいは静止しているかを表すパラメータとして次式の $\tilde{k}(t)$ を定義する。

$$\tilde{k}(t) = \begin{cases} 1 & (k(t) \geq k_{th}) \\ 0 & (k(t) < k_{th}) \end{cases}$$

ここで k_{th} は運動状態と静止状態を判定する閾値である。ここで分子 A および B の運動性の相関を評価するために次式の相関係数 C_{AB} を定義した。ここで $\langle \rangle$ は時間 t についての

平均を表す。

$$C_{AB} = \langle \tilde{k}_A(t) \tilde{k}_B(t) \rangle$$

分子 A と B が同時に運動している場合 C_{AB} は 1 となり、分子運動の協同性を示す指標となる。 $k_{th} = 2 \text{ \%s}$ として様々な分子の組み合わせについて相関係数 C_{AB} を求めた。その結果、いずれの分子の組み合わせについても、相関係数は 0.1 以下であり、明確な相関が見られなかった。ここで有意な観察を行うことのできた分子の組み合わせはいずれも分子間距離にして 80 nm 以上離れたものであった。これは単一分子計測においては色素分子を低濃度で分散しなくてはならないためである。さらに接近した分子同士についての相互相関解析が必要とされるが、今回の実験で用いた PDI および DiD 分子を混合してランダムに分散する試料作製法では十分に近接した分子の組み合わせを得ることが困難であった。この点については PDI と DiD を適当な鎖長の高分子鎖で連結した試料を合成するなど新たな試料作製が必要であるものと考えられる。

本研究の結論としては以下の通りである。マルチチャンネル蛍光顕微鏡を構築することで、分子一つ一つの運動をリアルタイムで追跡することを可能にし、複数の分子同士について運動性の相関を評価できるシステムを構築できた。その結果、80 nm 以上の空間スケールでは分子運動の空間的な相関は見られないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 1) 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
- 2) 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

- 3) 青木裕之, "回折限界を超える蛍光イメージング法による高分子材料の物性解析", *光化学*, 44, 26-30 (2013).
- 4) 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.*, in press. DOI: 10.1016/j.chemphys.2012.12.026

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) 青木裕之, 進章彦, 黒田泰樹, "超解像光学顕微鏡による高分子の配向評価", 2012 年光化学討論会 (2012/9/12-14, 東京工業大学)
- 2) Hiroyuki Aoki, "Conformation of single polymer chain at interface studied by state-of-the-art optical microscopy", *Soft-interfaces Mini-symposium 2013 -Physical Chemistry and Characterization of Soft-interfaces-* (SIMS2013) (2013/3/13-15, Fukuoka)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 裕之 (AOKI HIROYUKI)

京都大学・先端医工学研究ユニット・准教授

研究者番号 : 90343235