

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26708016

研究課題名(和文) 多分子が関与する反応および相分離過程の電子顕微鏡イメージング

研究課題名(英文) Electron microscopic imaging of reaction and phase separation processes for molecules

研究代表者

原野 幸治 (Harano, Koji)

東京大学・総括プロジェクト機構・特任准教授

研究者番号：70451515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,300,000円

研究成果の概要(和文)：原子分解能透過電子顕微鏡および高分解能走査電子顕微鏡による有機材料および有機・無機複合体のナノレベル構造解析技術を確立し、本技術を用いて単一分子レベルの分子・クラスターなどの集合過程や分子重合機構など、複数の分子が関わり時空間展開する系を分子レベルで解析することに成功した。さらに得られた知見を元に、薬剤輸送担体やハイブリッド触媒など、自己組織化機能材料の合目的なデザインを実現した。

研究成果の概要(英文)：I established new techniques to analyze nano-level structure of organic materials and organic-inorganic composite using atomic-resolution transmission electron microscopy and high-resolution scanning electron microscopy. By the use of this technology, we revealed chemical processes of self-assembly such as formation of metal-organic hybrid vesicles and polymer-vesicle composites, at single molecule level. In addition to that, we succeeded in designing functions of self-organizing functional materials such as drug transport carriers and hybrid catalysts based on the knowledge obtained by the high-resolution microscopic analyses.

研究分野：電子顕微鏡化学

キーワード：電子顕微鏡 透過電子顕微鏡 走査電子顕微鏡 自己集合 ナノ粒子 カーボンナノチューブ ベシクル 重合反応

## 1. 研究開始当初の背景

物質のキャラクタリゼーション、構造解析はあらゆる化学の基本である。合成化学においては、生成物の構造を決めるため、通常マクロスケールの混合物として得られる粗生成物を精製したのち、それを構造解析に供するのが常識である。そのためには観察したい分子が十分量必要であるし安定でなくてはならない。特に、原子の空間配置情報を得るための強力なツールである X 線結晶構造解析は原理的に生成物が純品であることが求められる。混合物の分離、精製のプロセスにはしばしば多大な労力がかかり、タンパク質科学においてはその分析よりも精製、結晶化が律速となっていることは周知の事実である。そもそも、化学反応は物を混合して開始するものであり、化学反応系はすべからず混合物であるから、これらを一つ一つ分離することなく、系中から観察対象分子および中間体を取り出し一網打尽に分析できることは有機分析化学の究極の目標である。同時に、時々刻々と組成が変化する凝縮系の追跡も挑戦的課題である。過飽和状態の溶液からの物質の結晶化は我々の身の回りに普遍的にみられ、工業的にも重要なプロセスであるが、結晶化の初期過程の分子レベル機構は実験的には未解明である。これらの過程の理解は合目的な機能性固体設計の為に必須であるものの、相分離過程に対する分子レベル観察法の欠如がこれまでその理解を妨げてきた。

研究代表者は、単分子実時間 TEM イメージング (Single-molecule Atomic-resolution Real-time TEM Imaging; SMART-TEM Imaging) を用いて、有機物およびその集合体の 3 次元立体構造と時間変化を研究してきた。このイメージング法の鍵は観察対象分子のサンプリング方法にある。申請者は、カーボンナノチューブ集合体の一種であるカーボンナノホーンの先端に結合した単一有機分子を、実時間スケールかつほぼ原子分解能で観察可能であることを見いだした (*J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7808)。この単分子構造分析法を元にした展開として、カーボンナノホーンの先端に結晶核形成を誘起するテンプレート分子を結合し、これを種として有機分子の結晶化を行い、タネ分子の周りに形成した数分子から十数分子の結晶核前駆体クラスターを観察することに成功した (*Nat. Mater.* **2012**, *11*, 877)。これらの成果は、有機物は TEM の電子線照射で素早く分解すると

いう常識が孤立した分子には当てはまらないこと、および SMART-TEM 法が単一有機分子のみならず van der Waals 錯体のような弱い分子間力で集まった分子集合体すらも観察可能な極めてマイルドな構造分析手法であることを示している。共有結合で繋がった単分子という制限に観察対象が縛られないということはこの構造解析法が広い対象に適用可能であることを示している。

## 2. 研究の目的

本研究では、1. に述べたような研究背景を踏まえ、これまで研究対象とすることが難しかった錯体形成反応、生体分子の核形成過程や、触媒反応の中間体の分析に高分解能透過電子顕微鏡および走査電子顕微鏡を活用し、単一分子レベルの分子・クラスターなどの集合過程や反応機構の解明に役立てることを目指す。複数の分子が関わり時空間展開する系、例えば相分離や化学反応における「もののでき方」「ものの形の変化」の分子レベル情報を、独自のサンプリング方法及び高分解能電子顕微鏡を駆使して解析する新分析手法を提案し、機能性物質の合理的デザインに活用することを目的とする。多分子が関わる化学プロセスは無数にあり数多くの応用が考えられるが、本申請ではその中でも重要度が高く、TEM の長所を活かせる課題として、(1) 機能性物質の相分離過程における成長機構の理解、(2) 触媒反応の反応中間体の分析による反応機構解明、を研究目標とする。

## 3. 研究の方法

多成分系の電子顕微鏡観察に適した分子設計デザイン、具体的には担体、スパーサーと分子マーカーの最適化検討を進める。研究対象としては、マテリアル、生物化学で重要度の高い物質群を選び、これらの相分離過程の分子描像、および集合体の動的挙動の観察を実施する。

## 4. 研究成果

(1) 鎖状有機分子が構造変換する過程の実時間観察と制御：単分子実時間電子顕微鏡イメージング (SMART-TEM) により単一有機分子および集合体のダイナミックな動きを個々に観察することで、分子の平均構造のみが情報として得られる従来の分析方法では解明できなかった分子の動的機能を明らかにできる。しかしながら、顕微鏡観察条

件下において孤立化した単一分子がどのように周辺環境からエネルギーを受け取り分子運動が誘起されるか、その機構についてはこれまで不明であった。本研究では、同一分子の中で柔軟なオリゴエチレンオキシド鎖と剛直な芳香族連結部位をもち、末端にマーカーとしてビオチンを結合した長さ約4ナノメートルの鎖状分子を新たにデザインし、これをカーボンナノホーン表面に共有結合で固定化したのち、電子線の加速電圧を変えた複数の条件で動画を撮影した(図1)。相互相関係数を用いた動画の定量解析の結果、加速電圧を下げるほど分子の動きが活発になり、鎖状分子のダイナミックな配座変換が観察できることを明らかとなった。このことから、孤立分子の動きが個々の入射電子のエネルギーではなく、試料との散乱断面積と正の相関を持つことが示された。また、同じ分子の中でも柔軟な鎖状部位が剛直な芳香族部位よりも激しく運動することを実験的に明らかにした。これらの結果は、SMART-TEM法が分子の固さ、柔らかさという情報がまるで分子模型を扱うかのように目でみてわかるという画期的分析手段であることを示している。

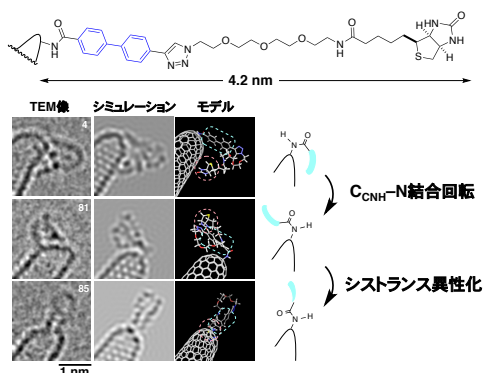


図1. カーボンナノホーンに結合した鎖状分子の配座変換. 加速電圧 80 kV で撮影. 図中の番号は撮影開始からのフレーム数 (1 フレーム=0.4 秒)

(2) フラーレン・金粒子ハイブリッドベシクルの自己集合過程解明と光機能: 金ナノ粒子は単独でも触媒能や光熱変換など数多くの機能を持ち、さらに粒子同士を空間的に近づけて集積化させることにより、粒子間のプラズモンカップリングに由来した長波長光吸収など更なる機能発現が可能である。この性質は薬剤輸送システムを志向した外部刺激応答性のナノカプセルを創製する上で重要である。これまで、脂質ベシクル表面への金ナノ粒子の集積を介した有機無機ハイブリッドナノカプセルの合成が試みられてきたが、ナノ粒子の結合による膜の不安定化、融合などの問題があった。本研究では、疎水表面をもつ水溶性フラーレン二重膜ベシクルを土台として、界面活性修飾を施した金ナノ粒子の集積化プロセスを、透過および走査電子顕微鏡を用いて追跡し、表面置換基の最適

化によりベシクル表面における金ナノ粒子の協同的自己集積化が実現できることを見だし、直径30ナノメートルの安定なハイブリッドベシクルを得ることに成功した(図2)。単粒子レベル分解能での電顕観察により、金粒子の自己集積化挙動は粒子表面のオリゴエチレンオキシド鎖長が大きく影響することが明らかとなった。すなわち、中程度の鎖長の場合はベシクル・粒子間相互作用と粒子・粒子間相互作用が同程度に強い場合、金粒子は協同的にベシクル表面に結合し、結果として安定なベシクルが得られた。一方で、より長い鎖長では親水性が増すため粒子間の相互作用が弱まるため、集積化は非協同的に起こり安定化への寄与が弱く、ベシクル同士の融合もみられた。協同的に集積化した金ナノ粒子・ベシクルハイブリッドについては、粒子単独の場合よりも高い酸化反応への触媒活性を示した。また、金錯体の添加によりベシクルに結合したまま金粒子のサイズを大きくすることが可能であることも見いだした。粒子径を大きくしたハイブリッドではプラズモンカップリングが増大し、緑色レーザー光に応答したベシクルの崩壊が観察された。

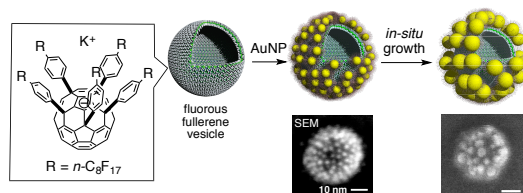


図2. フラーレン二重膜ベシクル表面への両親媒性金ナノ粒子の自発的集積化と生成物の高分解能走査電子顕微鏡像

(3) 人工二重膜・触媒ハイブリッドを用いたポリマー集合体のナノ形態制御: 細胞膜の機能に倣い、自己組織化分子膜の疎水性空間を反応場として利用し、重合反応生成物の形態や集合状態を制御する試みが長きに渡って行われている。しかし天然の脂質膜や脂質類似分子からなる柔軟な人工分子膜では、基質や触媒の担持、または反応の進行に伴い膜が不安定化し、また膜の集合構造のゆらぎが大きいため、生成物の形態をナノサイズで精緻に制御することは困難であった。

本研究では、水溶性フラーレンの自己集合により形成する剛直な分子二重膜を反応場として用い、重合生成物の集合形態をナノレベルで制御することに成功した(図3)。具体的には、当研究室で開発した直径約30ナノメートルのフラーレン二重膜ベシクルに開環メタセシス重合(ROMP)触媒を複合化し、フラーレン膜上の鎖状置換基と重合するモノマーの親和性に応じてナノ粒子、ナノカプセルを作り分けることができた。すなわち、脂溶性モノマーと親和性が低いフルオロアルキル鎖を持つ二重膜をテンプレートとした場合は生成物が速やかに相分離し、単一ポリ

マー鎖が折りたたんだ直径 5 ナノメートルの粒子状の生成物を与えた。一方で、親和性が高いアルキル二重膜の場合では、膜内で重合反応が進行し、ベシクルとほぼ同サイズである直径 30 ナノメートルの剛直なカプセル型集合体を得ることができた。フラーレンベシクル上におけるポリマー生成物の構造は走査電子顕微鏡観察により追跡され、二重膜上で相分離した粒子の形成がナノレベル分解能で明瞭に捉えられた (図 4)。

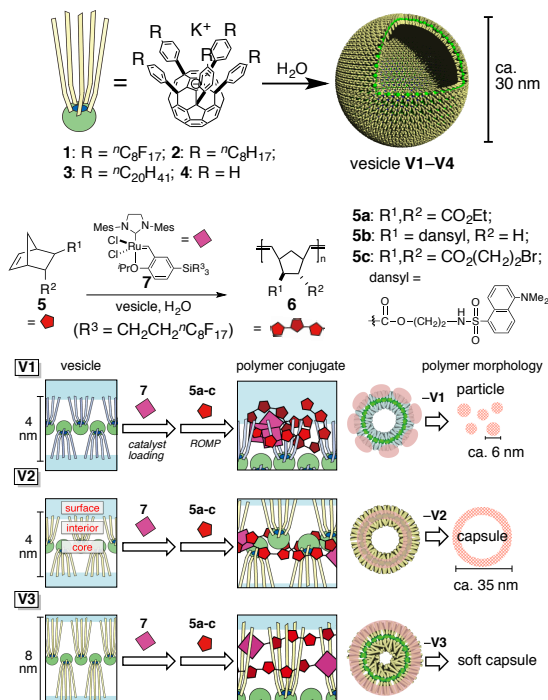


図 3. 両親媒性フラーレン 1-4 の自己集合により形成する二重膜ベシクルをテンプレートとした、触媒的開環メタセシス反応による重合生成物の形態選択的合成

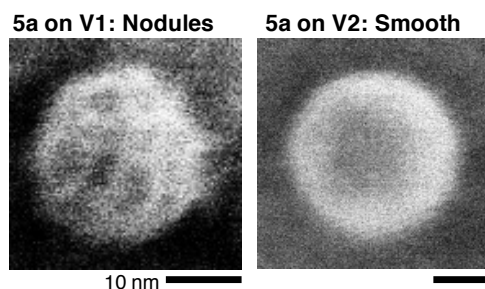


図 4. ベシクル上に生成したポリマー集合体の高分解能走査電子顕微鏡像。パーフルオロアルキル鎖を持つベシクル V1 上では生成物は膜から相分離して粒子状になるのに対し、アルキルベシクル V2 では膜内で均一重合しカプセル状となる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

- ① Nanoscale Control of Polymer Assembly on a Synthetic Catalyst-Bilayer System,

R. M. Gorgoll, K. Harano, E. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, 138, 9675-9681, 査読有

DOI: 10.1021/jacs.6b05414

- ② 結晶はどのようにしてできるか, 原野幸治, *化学と教育*, 2015, 63, 384-387. 査読有

<http://edu.csj.jp/chemedu/kakyo.html>

- ③ Cooperative Self-Assembly of Gold Nanoparticles on the Hydrophobic Surface of Vesicles in Water, R. M. Gorgoll, T. Tsubota, K. Harano, E. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.* 2015, 137, 7568-7571, 査読有

DOI: 10.1021/jacs.5b03632

- ④ Electron Microscopic Observation of Selective Excitation of Conformational Change of a Single Organic Molecule, R. M. Gorgoll, E. Yücelen, A. Kumamoto, N. Shibata, K. Harano, E. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.* 2015, 137, 3414-3417, 査読有

DOI: 10.1021/jacs.5b00511

- ⑤ DNA Binding of Pentaamino [60]fullerene Synthesized using Click Chemistry, H. Niita, K. Minami, K. Harano, E. Nakamura, *Chem. Lett.* 2015, 44, 378-380, 査読有

DOI: 10.1246/cl.141092

- ⑥ High-Density Display of Protein Ligands on Self-Assembled Capsules via Noncovalent Fluorous Interactions, K. Harano, J. Yamada, S. Mizuno, E. Nakamura, *Chem. Asian J.* 2015, 10, 172-176, 査読有

DOI: 10.1002/asia.201403144

〔学会発表〕 (計 50 件)

- ① 原野幸治, 高分解能電子顕微鏡で切り開くナノ・メゾ分子集合体科学, 日本化学会第 96 春季年会 (招待講演), 2016

- ② Koji Harano, Ricardo M. Gorgoll, Eiichi Nakamura, Synthetic Catalyst-Bilayer System for Nanoscale Folding Control of Metathesis Polymerization iCeMS International Symposium "Hierarchical Dynamics in Soft Materials and Biological Matter" (invited lecture), 2015.

- ③ 原野幸治, 精密分子設計を駆使した界面有機化学の探求-身近で難解なナノ・メゾ世界に挑む-, 神奈川大学講演会 (招待講演), 2015.

他 4 7 件

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/users/commom/NakamuraLab.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原野 幸治 (HARANO, Koji)

東京大学・総括プロジェクト機構・特任准教授

研究者番号：70451515