

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03867

研究課題名(和文) 超解像単一分子イメージングによって明らかにする高分子ゲルのナノ構造・ダイナミクス

研究課題名(英文) Nano-structure and dynamics of polymer gels studied by super-resolution single molecule imaging

研究代表者

青木 裕之(Hiroyuki, Aoki)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 J-PARCセンター・研究副主幹

研究者番号：90343235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ゲルは高分子鎖が三次元的に架橋した溶媒を含んだネットワーク構造をとっているが、そのネットワーク構造は不均一であり、架橋点の分布や鎖セグメント濃度には粗密が存在していることが知られている。本研究は、超解像蛍光イメージングに基づく手法を高分子ゲルの計測に新たに導入し、ゲルに内在する網目鎖構造と力学特性の不均一性について実空間で直接評価する方法論を確立し、ゲルの不均一性について明らかにすることを目的としている。単一分子局在化顕微鏡によるナノ光学イメージングとマイクロレオロジー法を用いることで、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)ゲル中に存在するネットワーク鎖の構造と局所粘弾性の定量解析に成功した。

研究成果の概要(英文)：Polymer gels, which consists of three-dimensionally cross-linked polymer chains swollen with solvents, are known to have inhomogeneous structure. The structural inhomogeneity in polymer gels has been studied extensively by scattering methods in inverse space. However, it has been difficult to obtain the quantitative information on the chain segment density from the inverse-space techniques. The objective of the current study is the development of novel methodology for the real-space analysis not only of the network structure but also local physical properties in polymer gels. We introduced a single molecule localization microscopy with a particle-tracking micro-rheology method to observe poly(N-isopropyl acrylamide) gels and succeeded the quantitative analysis of the network chain structure and dynamic viscoelasticity in a nanometric local area.

研究分野：高分子物性

キーワード：ゲル 超解像顕微鏡 単一分子

## 1. 研究開始当初の背景

高分子鎖が互いに架橋することで三次元的なネットワーク構造をとり、溶媒で膨潤されたゲルは、ユニークな物性を示すことから様々な場面で応用され、機能性材料として様々な研究が展開されている。より高性能・高機能の材料を開発するためには、材料内部の構造およびダイナミクスと、マクロな物性との相関についての知見を得て、機能発現の基礎的なメカニズムを理解することが不可欠である。

高分子ゲルの構造は光や中性子線などを用いた散乱法を中心に研究されており、現実のゲル内部における高分子鎖のネットワーク構造は粗密のある不均一な構造をとっていることが知られている(図1)。しかしながら、散乱による逆空間の計測法ではバルク全体の平均的な構造評価しか行うことが出来ず、局所的なネットワーク鎖の空間分布などの情報を得ることは困難である。また、ネットワーク鎖および架橋の構造に合わせて局所的な物性評価を行い、ゲルの内部構造と物性の相関を評価することは不可能であった。そのため、直接的に実空間での構造とダイナミクスの評価を行うことの出来る新しい手法が必要とされている。

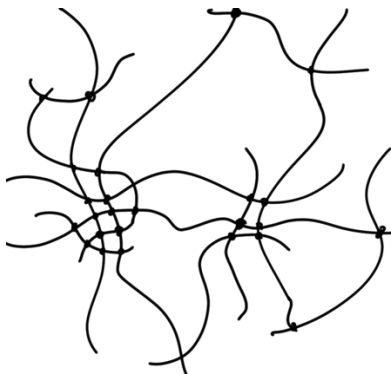


図1 高分子ゲル内部に存在する不均一構造の模式図

## 2. 研究の目的

ゲルにはナノメートルスケールの分子オーダーからマイクロメートルスケールに至る構造が存在しているため、バルク材料の内部をこのような広い空間スケールに渡って観察可能な手法が求められる。そのためには光学顕微鏡が最も適した手法となるが、従来の光学顕微鏡では空間分解能が波長によって制限さ

れており、数100 nm以下の構造を評価することが出来なかった。そこで本研究では、光を用いながら波長の限界を超えるナノメートルスケールの空間分解能を達成する超解像光学顕微鏡をベースとして高分子ゲルを計測するための新しい方法論を提案する。超解像光学顕微鏡技術としては、様々な手法が提案されているが、本研究ではその中で最も高い空間分解能を示す単一分子局在化顕微鏡法を採用する。さらに、系中に分散したナノ粒子の動態から周辺媒体の粘弾性的特性を評価するマイクロレオロジー法を超解像顕微鏡と融合することで、ゲルのネットワーク構造と局所粘弾性を同時評価可能な方法論を開発することを目指して研究を行った。このように、高分子ゲル内部の高分子鎖のネットワーク構造をナノメートルスケールで実空間観察するとともにゲル内部の局所的な力学物性を評価可能な計測システムを開発することを目的としている。

## 3. 研究の方法

ゲルの構造・局所物性計測のための顕微鏡システムは、ニコン社製倒立型顕微鏡 Ti-E をベースとして自作した。光源として波長 532 nm のレーザーを用い (CNI 社製 MGL-III-532)、1~10 kW/cm<sup>2</sup> のパワー密度で試料の照明を行った。検出器として EMCCD カメラ (Andor 社製 iXon+) あるいは sCMOS カメラ (Andor 社製 Zyla) を用いた。試料としてはポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAM) を用いた。2枚のカバーガラスで作製した 10 mm のチャンネル間で、蛍光ラベル分子および蛍光ナノ粒子を導入した N-イソプロピルアクリルアミドモノマー水溶液を重合することで顕微鏡観察用試料を調製した。

## 4. 研究成果

### 4. 1. PNIPAM ゲルの構造

単一分子局在化顕微鏡では、蛍光色素分子によって染色された試料を高分解能で蛍光イメージングする手法である。通常の蛍光顕微鏡では、個々の蛍光分子は回折限界によって光の波長の 1/2 程度に広がって観察されるため、試料上に導入された多数の色素分子が互いに重なって観察され、結果として本来の試料の構造よりも 200-300 nm 程度ぼやけて観

察される。一方、単一分子局在化顕微鏡は試料上の多数の色素分子を同時に光らせるのではなく、個々の色素分子を別々に計測する手法である。それぞれ色素分子一つのみが観察された蛍光画像からは分子の位置座標が 10 nm の精度で決定できるため、多数の色素分子について得られた座標データから、分子の空間分布すなわち試料の形態を再構築画像として得ることができる。蛍光分子を別々に計測する手法として幾つかの方法が提案されているが、本研究では dSTORM 法と呼ばれる手法を用いる。これは、蛍光色素を含む試料中に還元剤（メルカプトエタノール）を添加し、励起状態にある色素分子の大部分を可逆的な非発光状態に転換することで蛍光分子の明滅状態を制御するものである。本研究では色素分子としてローダミン誘導体を採択し、PNIPAM ゲルの染色を試みた。蛍光色素分子をアクリルアミドモノマーに導入し、これを重合することでゲルのネットワーク鎖のイメージングを試みたが、色素導入モノマーの合成が当初の想定よりも困難であり、ゲルの作製を行うに十分な量のモノマーを得ることができなかった。そこで、ネットワーク鎖を直接イメージングするのではなく、ネットワーク鎖の疎な領域すなわち溶媒で満たされたボイド領域をイメージングすることによって、間接的にネットワーク鎖セグメントの粗密構造を評価することを試みた。これはローダミン B 分子を溶解した水によって膨潤した PNIPAM ゲルを観察することで行った。図 2 に PNIPAM の超解像顕微鏡画像を示す。溶媒中に分散する蛍光分子の観察された領域は観察領域内で不均一に分布しており、PNIPAM ゲル内部の溶媒分布は不均一であることが直接的に示された。

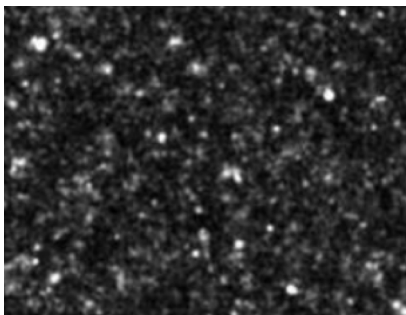


図 2 PNIPAM ゲルの膨潤領域の超解像顕微鏡画像。視野は 1000 x 780 nm<sup>2</sup>。

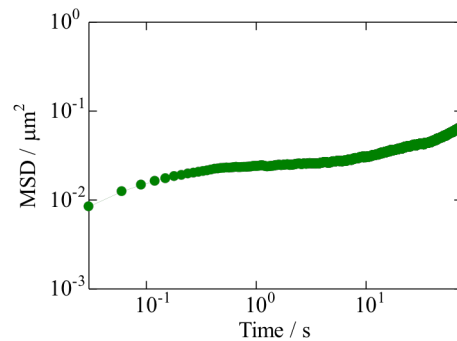


図 3 PNIPAM ゲル中に分散した蛍光粒子 (200 nm) の平均二乗変位の時間依存性。

#### 4. 2. PNIPAM ゲルの局所粘弾性

ゲル内部の局所的な力学特性を評価するため、マイクロレオロジー法を導入した。微粒子のブラウン運動は媒質の粘性および弾性に影響を受けるため、粒子の運動状態を解析することで粒子近傍の媒質の粘弾性を評価することが可能である。そこで PNIPAM ゲル中に直径 200 nm の蛍光ビーズを分散し、そのブラウン運動を観察した。図 3 は粒子の平均二乗変位 (MSD) の時間依存性である。粘性流体中における MSD は全領域で時間に比例するが、PNIPAM 中においては時間 0.5 秒以下及び 5 秒以上では時間に比例し、0.5–5 秒で時間に依存しないプラトー領域が見られる。これは媒体が粘弾性を有することを示している。ここで粒子の感じる複素弾性率  $G^*$  は MSD のラプラス変換  $\Delta\langle r^2 \rangle$  と次式によって関係づけられる。

$$G^* = \frac{k_B T}{\pi a s \langle \Delta r^2(s) \rangle}$$

ここで  $a$  は粒子の半径、 $k_B$  はボルツマン定数、 $T$  は絶対温度である。ここで  $s = i\omega$  とすることで、角周波数  $\omega$  に依存した粘弾性特性を評価することができる。図 4 は、図 3 の MSD から得られた動的粘弾性特性であり、1 個の粒子近傍の局所的な力学特性を評価可能であることが分かる。図 5 に PNIPAM ゲル中に分散した多数のプローブ粒子について得られた 1 Hz における貯蔵弾性率  $G'$  の分布を示す。ここで赤、青、緑のヒストグラムは架橋密度 0.1, 0.2, 0.3% の PNIPAM ゲル、グレーのヒストグラムは PNIPAM 線形鎖の 35% 水溶液についてのデータである。溶液系ではシャープな分布を示しており、空間的に概ね均一な力学

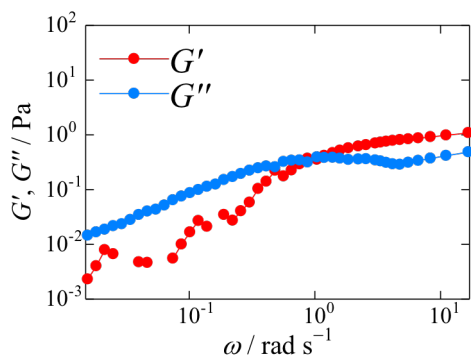


図4 マイクロレオロジー法によって得られた1個の粒子の近傍の動的粘弾性特性

特性を示しているが、PNIPAM ゲルについてはいずれの架橋密度においても  $G'$  は2桁近い広い分布を示しており、ゲル内部の力学特性は極めて不均一であることが示された。架橋密度の増加とともに  $G'$  の平均値は大きくなっており、これはマクロな弾性率の傾向と一致する。しかしその分布状態に注目すると、 $G'$  の最低値は1~2 Pa 程度でありながら架橋密度の増大とともに分布が高弾性率側へ広がっていく傾向が見られた。これは低弾性率の領

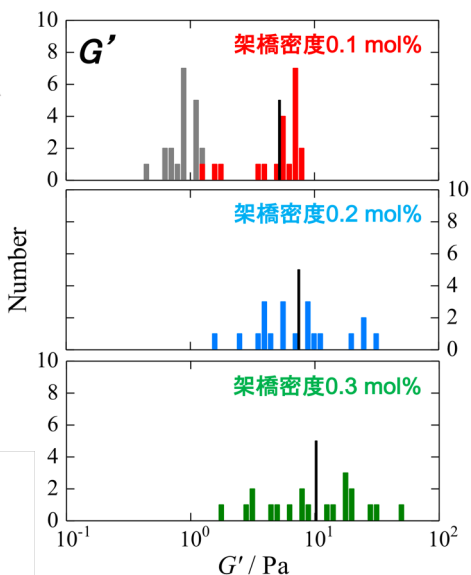


図5 マイクロレオロジー法によって得られたPNIPAM ゲル中の1 Hzにおける貯蔵弾性率のヒストグラム。赤、青、緑のヒストグラムは架橋密度0.1, 0.2, 0.3%のゲル、グレーのヒストグラムは線形PNIPAM 鎖の35%水溶液についてのデータを示している。

域が、ゲル内部に存在しているネットワーク鎖密度の低いボイド領域に対応しており、架橋密度を上げて、このボイド領域が存在していることを示唆している。このことを実証するため、超解像イメージングとマイクロレオロジー測定を対応させることで、ネットワーク鎖の密な領域で  $G'$  が大きく、疎な領域で小さくなる傾向が観察された。試料調製において想定外の時間を要したことからこの点について期間内に十分に検討することはできなかったが、ゲルの新しい構造・物性計測手法の確立という目的は達成することができた。今後、これを活用した局所構造-物性相関についての研究の展開を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) Ryuji Maruyama, Dai Yamazaki, Kazuhiro Akutsu, Takayasu Hanashima, Noboru Miyata, Hiroyuki Aoki, Masayasu Takeda, Kazuhiko Soyama, "Development of high-polarization Fe/Ge neutron polarizing supermirror: Possibility of fine-tuning of scattering length density in ion beam sputtering", Nucl. Inst. Methods Phys. Res. A, 888, 70-78 (2018).
- 2) Hiroyuki Aoki, "Conformation and dynamics of single polymer chain studied by optical microscopy techniques beyond the diffraction limit", Microscopy, 66, 223-233 (2017).

[学会発表] (計 9 件)

- 1) Hiroyuki Aoki, "Segmental dynamics of poly(alkyl methacrylate) in spin-cast films probed by defocus fluorescence microscopy", EMN Polymer 2018 (2018/1/22-26, Kuala Lumpur, Malaysia)
- 2) Hiroyuki Aoki, "Application of localization microscopy for single-molecule analysis in polymer materials", Single Molecule Localization Microscopy Symposium 2017 (SMLMS 2017) (2017/8/30-9/1, London, UK)
- 3) Hiroyuki Aoki, "Structure and Dynamics of Polymer Materials at the Single Molecule Scale Studied by Novel Fluorescence Microscopy Techniques", Material Congress

- 2017 (2017/6/12-14, Rome, Italy)
- 4) 青木裕之, "高分子材料の単一分子計測：ラベル法を用いた分子鎖の形態とダイナミクスの解析", 平成 28 年度ソフトマター中性子散乱研究会 (2016/11/17, エッサム神田ホール)
  - 5) Hiroyuki Aoki, "Conformational analysis of single polymer chain in thin films by super-resolution fluorescence microscopy", IUPAC-PSK 40 (2016/10/4-6, Jeju, Korea)
  - 6) 鈴木啓介, 青木裕之, "粒子追跡マイクロレオロジーによる架橋ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)の局所粘弾性評価", 第 65 回高分子討論会 (2016/9/14-16, 神奈川大)
  - 7) Hiroyuki Aoki, "Structural Analysis of Single Macromolecule in Polymer Thin Films by Super-resolution Fluorescence Microscopy", Single Molecule Localization Microscopy Symposium 2016 (SMLMS 2016) (2016/8/28-30, Lausanne, Switzerland)
  - 8) 青木裕之, "ナノ光学イメージングによるバルク材料中における単一高分子鎖のコンホメーション評価", 16-1 高分子基礎物性研究会 (2016/7/25, 京都テルサ)

- 9) Hiroyuki Aoki, "Properties of Polymer Materials Studied by Super-resolution Optical Microscopy", International Symposium of Spectroscopical Society of Japan 2016 (2016/5/25, Osaka)

[その他]

ホームページ：

<http://www.nano-imaging.org>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青木裕之 (AOKI, Hiroyuki)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 J-PARC センター・研究副主幹

研究者番号：90343235

### (2) 研究分担者

高島義徳 (TAKASIMA, Yoshinori)

大阪大学・理学研究科・講師

研究者番号：40379277