

機関番号：14301
研究種目：若手研究 (A)
研究期間：2008～2010
課題番号：20685016
研究課題名 (和文) 三次元超解像イメージングによる単一高分子鎖の立体構造・ダイナミクスの評価
研究課題名 (英文) Structure and Dynamics of Single Polymer Chain Studied by Three-dimensional Super-resolution Imaging Technique
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

研究成果の概要 (和文)：

高分子鎖一本のコンホメーションを直接観察するためのナノメートルスケールの空間分解能を示す光学イメージング技術の開発を行った。三次元空間において $15 \times 15 \times 80 \text{ nm}^3$ の空間分解能を達成する超解像顕微鏡 Photo-Activated Localization Microscopy (PALM) の構築を行うとともに、フォトクロミック蛍光色素によってラベルされたポリブチルメタクリレート (PBMA) の合成を行った。これにより高分子鎖一本のコンホメーションをナノメートルスケールの空間分解能で評価することに成功した。

研究成果の概要 (英文)：

A super-resolution microscopy technique was developed to enable the structural analysis of polymers at a nanometric scale. A single poly(butyl methacrylate) (PBMA) chain labeled by photochromic fluorescent dye molecules was observed by the photo-activated localization microscopy (PALM), which has the spatial resolution of $15 \times 15 \times 80 \text{ nm}^3$ in three dimensions. The PALM allowed us to directly examine the conformation of the individual PBMA chains.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	13,100,000	3,930,000	17,030,000
2009 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	20,200,000	6,060,000	26,260,000

研究分野： 高分子構造
科研費の分科・細目： 高分子・繊維材料
キーワード： 単一高分子鎖、表面・界面、蛍光顕微鏡、超解像

1. 研究開始当初の背景

高分子鎖は非常に高い内部自由度を有し、そのために一本の鎖は多様なコンホメーションをとることができる。この形態の多様性こそが高分子材料特有の諸物性を支配しており、鎖のコンホメーションを評価することは、その物性を理解する上で重要な課題の一つである。このとき一本一本の鎖の形態を直接可視化することが可能となれば高分子の本質を理解する上で強力な情報となるものと考えられる。バルク内における単一高分子鎖を観察するには、(1)複数のからみ合った鎖から一本のみを区別してイメージング可能であること、(2) $< 100 \text{ nm}$ 以下の空間分解能を実現することが要求される。単一分子観察のためには試料高分子を蛍光ラベルし、その発光を結像する蛍光イメージングが最も有効である。しかしながら従来の蛍光顕微鏡の空間分解能は回折限界によって $200 \sim 300 \text{ nm}$ に制限されている。これまでに近接場光学を用いることで分解能 100 nm 以下の蛍光イメージングが実現しているが、近接場顕微鏡では試料表面近傍のみの観察に限定されていた。そのためバルク内部の高分子鎖一本を直接的に検出し、その三次元構造を評価可能な手法が求められていた。

2. 研究の目的

本研究は一本一本の高分子鎖の構造とダイナミクスの評価を実現するための超解像光学顕微鏡法を開発することを目的としている。超解像法を利用することでナノメートルスケールの空間分解能での単一高分子鎖の蛍光イメージングを実現し、さらに三次元計測を実現することで、単一分子レベルでの鎖の立体構造観察を可能にすることを目指して研究を行った。

3. 研究の方法

本研究では PALM (Photo-Activated Localization Microscopy) と呼ばれる超解像法を応用することで単一高分子鎖の評価を試みた。蛍光顕微鏡測定において視野内に蛍光分子が

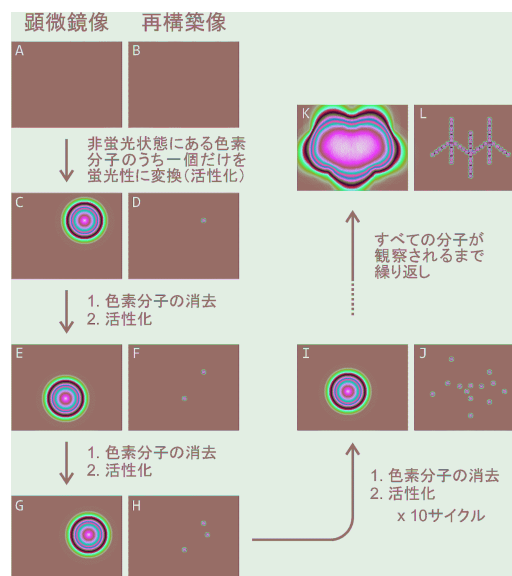


図 1. 超解像光学顕微鏡の原理

ただ一つのみ存在するとき、その位置はナノメートルスケールの精度で決定することができる (Fluorescence Imaging with One-Nanometer Accuracy; FIONA)。PALM では試料に導入された複数の色素分子に対して順に一個ずつ観察することで、全ての色素分子の位置座標を逐次決定し、これらを用いて画像構築を行う (測定プロセスを図 1 に模式的に示している)。FIONA では通常顕微鏡画像の面内における位置評価すなわち分子の (x, y) 座標のみを決定することができ、高さ (z) 方向の情報を高分解能で得ることができない。本研究では z 座標についても超解像計測が得られるよう顕微鏡光学系に改良を加えた。

PALM においてはフォトクロミック性蛍光色素分子によって試料の蛍光ラベルを行うことが必要となる。PALM において有効な色素の探索を行うとともに、高分子試料への導入法を確立した。このように顕微鏡システムの構築と試料合成を行うことで、単一高分子鎖の形態評価を行った。

4. 研究成果

4. 1 超解像顕微鏡の構築

超解像観察を実現するための顕微鏡の構築を行った (図 2)。PALM においては色素分

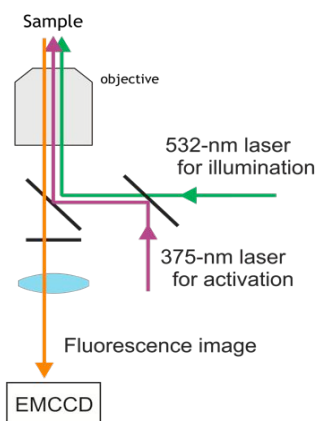


図2. 構築した PALM システムの模式図

子一個の蛍光画像を観察するため、高感度の EMCCD カメラを備えた蛍光顕微鏡を基本として構成される。前述のように観察試料はフォトクロミック色素によってラベルされ、図1に示したフォトクロミック色素分子の活性化、観察、消去のサイクルを繰り返すことで観察を行う。その非蛍光異性体から蛍光体への異性化反応を引き起こすための紫外レーザー（波長 375 nm）と、蛍光体を励起するための可視レーザー光源（波長 532 nm）を備えている。一方、蛍光体の消去は可視レーザーの照射による褪色反応を利用している。これらの光源からのビームはダイクロイックミラーによって重ねた上で試料に照射した。各レーザー光源およびカメラ露光はパルスジェネレータによって同期した。露光時間は 30 ms とし、励起可視光は露光の間のみ照射を行い、露光終了後のデータ転送の間に紫外光を照射した。このように PALM 計測可能な顕微鏡の構築を行うことができた。構築したシステムの空間分解能の評価したところ、最大で 3.1 nm の分解能での超解像計測が可能であることが分かった。

4. 2 フォトクロミック色素によってラベルされた高分子の合成

PALM 観察に使用することのできるフォトクロミック色素の探索を行った。ここでは図3に示されるスピロピラン誘導体 (SP) およびローダミンスピロアミド誘導体 (RSA) を評価した。これらはいずれも図に示した閉環

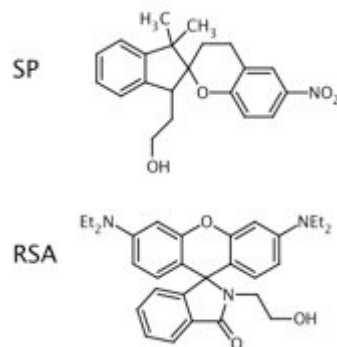


図3. スピロピラン色素 (SP) およびローダミンスピロアミド色素 (RSA) の化学構造

体では非蛍光性であるが、紫外光の照射によって開環体へ変換し、波長 532 nm の可視光を吸収して蛍光を発する。これらをポリメタクリレート (PMMA) 中に分散し、水銀ランプ（波長 365 nm）を照射することでフォトクロミック反応の追跡を行った。SP については高い効率で閉環体から開環体への変換を行うことができた。また可視光照射による閉環体への戻りも観察でき、さらに繰り返しフォトクロミック反応を行うことができた。しかしながら発光強度が低く、単一の SP 分子の蛍光を観察することは不可能であった。一方、RSA については SP と比較して変換効率は低いものの、開環体からの蛍光強度が大きく、単一分子のフォトクロミック反応を観察することができた。このように PALM において利用する色素分子として RSA が適切であることが分かった。

RSA 分子が有するヒドロキシル基に対してメタクリル酸クロリドを反応することで RSA を有するメタクリレートモノマーを合成し、これをメタクリル酸ブチルと共重合することで RSA によってラベルされたポリブチルメタクリレート (PBMA) を作製することができた。

超解像計測における空間分解能は、色素分子一個について検出することのできる光子数によって決定される。RSA については 2000 ~ 5000 個の光子を検出することができ、このときの空間分解能は 15 nm であった。

4. 3 単一高分子鎖の超解像観察

蛍光ラベルされた PBMA 鎖 (数平均分子量 215 万) を、蛍光ラベルされていない PBMA 中に極微量混合し、トルエン溶液を作製した。これを清浄なガラス基板上にスピんキャストすることで膜厚 200 nm のフィルムを作製し、PALM による測定を行った。PBMA 鎖に導入された個々の RSA 分子の位置を逐次測定し、それらを元に画像再構成を行った。図 4 は PALM によって得られた単一 PBMA 鎖の超解像顕微鏡画像である。個々の鎖のコンホメーションを明瞭に観測することに成功した。鎖一本の画像からその回転二乗半径や形態を解析したところ、PBMA 鎖のコンホメーションはガウス分布をとることが示された。

4. 4 三次元超解像計測

面内方向の超解像によって分解能 15 nm の高分子鎖の形態評価を行うことができた。さらに高さ方向に超解像計測を行うことで、三次元構造の計測を試みた。顕微鏡光学系にシリンドリカルレンズを挿入することで顕微鏡画像に対して非点収差を導入した。図 5 は単一のペリレンジイミド分子に対して高さ

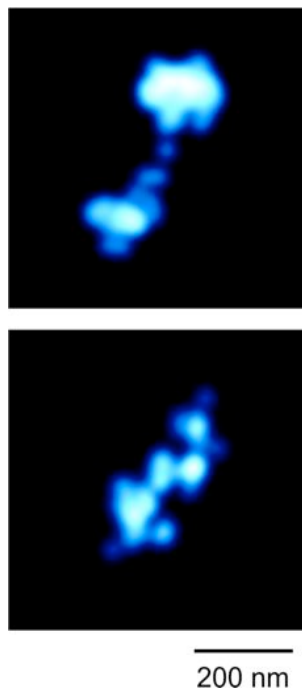


図 4. PBMA 鎖の超解像顕微鏡画像。

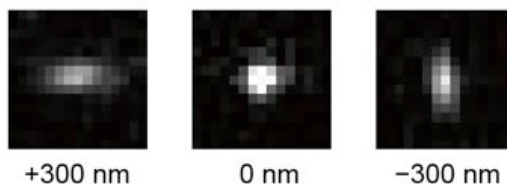


図 5. 三次元超解像顕微鏡における単一分子蛍光像の z 座標依存性

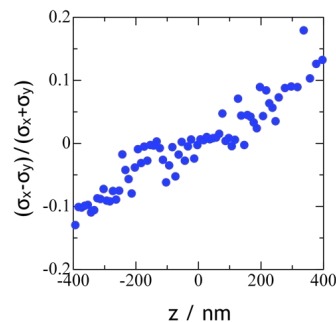


図 6. 非点収差測定による z 座標の超解像計測

を変えながら測定を行った蛍光画像である。観察された像の形状が分子の z 座標に依存していることが分かる。すなわち、分子が焦点面より上方に存在する際には x 方向を長軸とする楕円形に、z 座標が減少するに従って y 方向を長軸とする楕円形に変形するように観測されている。このように観察された輝点の形状から、分子の z 座標を得ることができる。図 6 は観察された輝点の x および y 方向の拡がり σ_x 、 σ_y を用いて $(\sigma_x - \sigma_y) / (\sigma_x + \sigma_y)$ で定義される形状パラメータを分子の z 座標に対してプロットしたものである。これより色素分子の z 座標を得ることができ、その分解能を 80 nm にまで向上させることに成功した。これにより三次元の超解像光学計測を行うことが可能となった。

以上のように、超解像法を用いることによって xyz の三次元空間において $15 \times 15 \times 80 \text{ nm}^3$ の空間分解能を有する蛍光顕微鏡を構築し、高分子鎖一本一本のコンホメーションを計測することに成功した。バルク内の単一高分子鎖の直接観察を実現する本手法は、高分子材料の分子レベルでの物性を評価する上で重要な手段となるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Hiroyuki Aoki, Toshiaki Takahashi, Shinzaburo Ito, "Segmental Orientation of Single Polymer Chain in Langmuir-Blodgett Film Studied by Defocus Fluorescence Imaging", *Polym. J.*, 43, 218-221 (2011).
- ② Hiroyuki Aoki, Ryojun Sekine, Tatsuya Iwamoto, Shinzaburo Ito, "Conformational Relaxation of Single Polymer Chains Confined in Two-Dimensional Plane Studied by Scanning Near-Field Optical Microscopy", *Polym. J.*, 42, 124-130 (2010).
- ③ Hiroyuki Aoki, Toshiaki Takahashi, Ryojun Sekine, Yasunari Tamai, Shinji Aoki, Keita Tani, Shinzaburo Ito, "Poly(methacrylate)s Labeled by Perylene Diimide: Synthesis and Applications in Single Chain Detection Studies", *Polym. J.*, 41, 778-783 (2009).
- ④ Ryojun Sekine, Hiroyuki Aoki, Shinzaburo Ito, "Conformation of Single Block Copolymer Chain in Two-Dimensional Microphase-Separated Structure Studied by Scanning Near-Field Optical Microscopy", *J. Phys. Chem. B*, 113, 7095-7100 (2009).
- ⑤ Toru Ube, Hiroyuki Aoki, Shinzaburo Ito, Jun-ichi Horinaka, Toshikazu Takigawa, Toshiro Masuda, "Affine Deformation of Single Polymer Chain in Poly(methyl methacrylate) Films under Uniaxial Extension Observed by Scanning Near-Field Optical Microscopy", *Polymer*, 50, 3016-3021 (2009).
- ⑥ Yasunari Tamai, Ryojun Sekine, Hiroyuki Aoki, Shinzaburo Ito, "Conformation of Single Homopolymer Chain in Micro-Phase Separated Block Copolymer Monolayer Studied by Scanning Near-Field Optical Microscopy", *Macromolecules*, 42, 4224-4229 (2009).
- ⑦ Ryojun Sekine, Hiroyuki Aoki, Shinzaburo Ito, "Chain End Distribution of Block Copolymer in Two-dimensional

Microphase-Separated Structure Studied by Scanning Near-Field Optical Microscopy", *J. Phys. Chem. B*, 113, 12865-12869 (2009).

- ⑧ 青木裕之, "近接場光学顕微鏡による高分子のナノ構造解析", *高分子論文集*, 66, 312-320 (2009).

[学会発表] (計 16 件)

- ① 森一樹, 青木裕之, 伊藤紳三郎, "単一分子の超解像観察による高分子鎖の構造解析", 第 59 回高分子討論会, 北海道大学, 2010/9/17.
- ② 青木裕之, 森一樹, "超解像光学顕微鏡による高分子材料の構造評価", 2010 年光化学討論会, 千葉大学, 2010/9/8.
- ③ Hiroyuki Aoki, Toru Ube, Shinzaburo Ito, Jun-ichi Horinaka, "Conformation of Single Polymer Chain under Tensile Deformation Studied by Near-Field Optical Microscopy", International Symposium on Non-Equilibrium Soft Matter 2010, Nara, 2010/8/18.
- ④ Hiroyuki Aoki, Toshiaki Takahashi, Shinzaburo Ito, "Dynamics of Single Polymer Chain Studied by Defocus Fluorescence Imaging Technique", 5th Pacific Rim Conference on Rheology (PRCR-5), Sapporo, 2010/8/5.
- ⑤ Toru Ube, Hiroyuki Aoki, Shinzaburo Ito, Jun-ichi Horinaka, "Conformation of Single Polymer Chain under the Uniaxial Extension Studied by Scanning Near-Field Optical Microscopy", 5th Pacific Rim Conference on Rheology (PRCR-5), Sapporo, 2010/8/3.
- ⑥ 青木裕之, "単一分子観察による高分子鎖の構造とダイナミクスの評価", 09-2 高分子表面研究会, 東京理科大森戸記念館, 2010/1/15.
- ⑦ Toru Ube, Hiroyuki Aoki, Shinzaburo Ito, Jun-ichi Horinaka, "Conformation of single polymer chain in uniaxially stretched film studied by scanning near-field optical microscopy", 11th Pacific Polymer

- Conference (PPC11), Cairns, Australia, 2009/12/8.
- ⑧ Yasunari Yamai, Ryojun Sekine, Hiroyuki Aoki, Shinzaburo Ito, "Scanning near-field optical microscopy study for single homopolymer chain location and orientation in microphase-separated block copolymer monolayer", 7th Asia-Pacific conference on Near-Field Optics (APNFO-7), Jeju, Korea, 2009/11/26.
- ⑨ 宇部達, 青木裕之, 伊藤紳三郎, 堀中順一, "近接場光学顕微鏡でみる絡み合い系における単一高分子鎖の伸長と緩和", 第 57 回レオロジー討論会, 宇部全日空ホテル, 山口, 2009/10/7.
- ⑩ 青木裕之, 森一樹, 高橋利明, 伊藤紳三郎, "超解像蛍光観察による単一高分子鎖の拡がりの解析", 第 58 回高分子討論会, 熊本大学, 2009/9/18.
- ⑪ 青木裕之, 森一樹, 高橋利明, 伊藤紳三郎, "単一分子イメージングによるポリメタクリレート高分子鎖の構造評価", 2009 年光化学討論会, 桐生市市民文化会館, 2009/9/16.
- ⑫ 青木裕之, "固-液界面における高分子ブラシの分子運動", 08-1 高分子表面研究会, 東京工業大学百年記念館, 2008/10/17.
- ⑬ 青木裕之, "単一分子計測による高分子鎖の形態とダイナミクスの評価", 第 55 回関西レオロジー研究会例会, キャンパスプラザ京都, 2008/8/29.
- ⑭ 玉井康成, 關根良潤, 青木裕之, 伊藤紳三郎, "近接場光学顕微鏡による高分子単分子膜のミクロ相分離構造と分子鎖形態の評価", 第 54 回高分子研究発表会(神戸), 兵庫県中央労働センター, 2008/7/18.
- ⑮ 關根良潤, 青木裕之, 伊藤紳三郎, "近接場光学顕微鏡による二次元ミクロ相分離中における単一ブロックコポリマー鎖の形態観察", 第 57 回高分子年次大会, パシフィコ横浜, 2008/5/29.
- ⑯ 宇部達, 青木裕之, 堀中順一, 伊藤紳三郎,

"近接場光学顕微鏡でみる一軸伸長および応力緩和過程における単一 PMMA 鎖の形態", 第 57 回高分子年次大会, パシフィコ横浜, 2008/5/28.

[図書] (計 4 件)

- ① 青木裕之, "近接場光学顕微鏡", 高分子分析入門, 第 16 章, pp. 404-412, 講談社サイエンティフィク, 2010.
- ② 青木裕之, "近接場光学顕微鏡による高分子材料の構造評価", 近接場光のセンシング・イメージング技術への応用 —最新のバイオ・化学・デバイス分野への展開—, 民谷栄一, 朝日剛 監修, 第 10 章, pp.113-123, シーエムシー出版, 2010.
- ③ Hiroyuki Aoki, "Structure and Dynamics of Confined Polymer Chains Studied by Spatially and Temporally Resolved Fluorescence Techniques", Molecular Nano Dynamics: Vol. I: Spectroscopic Methods and Nanostructures, Ed. by H. Fukumura, M. Irie, Y. Iwasawa, M. Masuhara, K. Uosaki, Chap. 4, pp. 55-70, Wiley-VCH, Weinheim, 2009.
- ④ 青木裕之, 伊藤紳三郎, "近接場光学顕微鏡による高分子薄膜・表面領域のナノ空間観察", 高分子の表面・界面分析法の新展開, 西岡利勝, 黒田孝二, 遠藤一央編, pp.164-175, シーエムシー出版, 2009.

[その他]

本研究によって得られた成果は下記ホームページにて公開している。

<http://photo.polym.kyoto-u.ac.jp/aoki/>

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