

## 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 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23655010

研究課題名（和文）

光イオン化により生成したカチオン-電子対の単一分子レベル測定法の開拓

研究課題名（英文）

Cation-Anion Distance in the Charge-Separated State Produced by Photoionization:  
Single Molecule Fluorescence Detection

研究代表者

宮坂 博 (MIYASAKA HIROSHI)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授

研究者番号：40182000

研究成果の概要（和文）：光イオン化により生成したカチオン-電子対の詳細な知見を得るための単一分子測定装置の製作を目的とし、光検出とプローブ顕微鏡の同時計測システムの設計と構築の観点から研究を行った。これに関連し蛍光ブリンキングに対する光イオン化の寄与を明らかにするために、カチオン-電子対の再結合が非常に迅速に（ $\leq$  ps）進行する無極性微小液滴中の単一分子の蛍光挙動の測定を行い、ブリンキングがほとんど観測されないことを見出し、蛍光 OFF 状態の原因として光イオン化により生成した長寿命のカチオン-電子対の生成が重要な役割を果たしていることを示した。

研究成果の概要（英文）： To precisely elucidate the properties of electron-cation pair produced by the photoionization in the condensed phase, the detection system with a single molecular level was designed. In relation to this aim, the role of the photo-ionized state in the fluorescence blinking process was elucidated by using a single molecule fluorescence detection system of the guest dye molecule in the micro-droplet of the nonpolar solution.

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：物理化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学（4601）

キーワード：単一光子、単一分子計測、光イオン化、カチオン-電子対、再結合発光

## 1. 研究開始当初の背景

イオン化は多くの分光や分析法にも広く応用されている現象であり、そのダイナミクスについても多光子励起を利用した光イオン化やパルス放射線を用いた時間分解測定による多くの研究がなされてきた。また単一分子からの蛍光測定を行う場合にしばしば観測される蛍光のブリンキング（蛍光の ON 状態と OFF 状態のスイッチング：図 1）の機構としても光イオン化は主要な役割を果

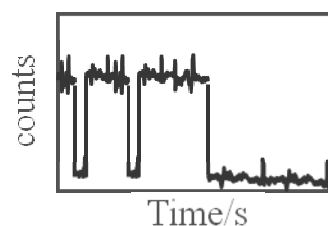


図1. 単一分子からの発光挙動の模式図。発光強度はデジタル的に ON と OFF 状態をくり返す。

たしていると考えられている。

一般に凝縮相で光イオン化が起こった場合には、媒体極性等の環境にも依存するが、イオン化直後のカチオン-電子対において、ジェミネート再結合とクーロン引力場内での熱振動によるイオン解離の競合が起こり、その後の時間領域でこれら解離したカチオンと電子の間での二分子的な再結合が進行すると考えられている。この解離収量を支配する最も重要な因子は、初期カチオン-電子ジェミネート対の対間距離分布である。たとえば高エネルギー放射線照射によってイオン化が起こった場合には、放出された電子が他分子のイオン化を引き起こす場合も多く、比較的遠距離(60-100Å)の平均対間距離を持つ広い分布になる。そのためイオンや電子が後続の反応に寄与する確率が高くなる。一方、せいぜい7-10eV程度までのエネルギーでの光イオン化では、カチオン-電子間の初期分布は $\delta$ 関数的な狭い幅を持ち、その平均値は30-40 Å程度であることが示されている。(例えば、申請者らの報例としては *Chem. Phys. Lett.*, 134 [5] (1987) 480-484; *Chem. Phys. Lett.*, 335 [3] (2001) 496、*Pulse Radiolysis*, Chap.8, pp.173-198., (1991), CRC Press など) したがって凝縮系における光イオン化の場合には、再結合収率が大きな値を持つ。上記のように初期対間距離分布は、イオン化過程とその後の挙動に影響を与える非常に重要なパラメーターではあるが、実験的にはこの分布を直接的に測定した例はなく、ジェミネートイオン対の再結合ダイナミクスの解析や電子スカベンジャーによる励起状態生成収量の測定などの間接的な測定から見積られてきた。

## 2. 研究の目的

上述のようにイオン化直後の初期対間距離分布は解離収量やその後の反応に対して重要な影響を与えるとともに、イオン化の機構そのものとも深く関わる因子である。この対間距離を空間-時間分解単一分子計測により直接測定する手法を探索・確立することが目的である。特に、本研究では単一分子の蛍光測定とプローブ顕微鏡の技術を組み合わせて、上記目的を達成することを計画している。そのため、蛍光のブリンキング現象の機構として光イオン化が重要な役割を果たしている事を明らかにすることを最初の目的とし、次いでプローブ顕微鏡と単一分子光計測を

組み合わせた測定装置を構築することを、第二の目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では単一分子レベルの蛍光検出およびプローブ顕微鏡の測定を応用する。そのために、(1) 蛍光分子のブリンキング現象に対する光イオン化過程の寄与の解明、(2) プローブ顕微鏡を用いた距離分布測定のための装置構築の2点から研究を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 蛍光分子のブリンキング現象に対する光イオン化過程の寄与の解明

無極性溶媒中で光イオン化により生成したカチオン-電子対は、通常非常に短い時間( $\leq$ ps)に再結合し、励起状態を生成する。したがって、無極性溶媒中における単一分子からの蛍光にはブリンキングが観測されないことが期待できる。しかし、単一分子からの蛍光測定のためには、被観測分子を顕微鏡の視野内に閉じ込める必要がある。そのため溶媒として n-オクタンを用いたゲル中に微小液滴( $\leq$   $\mu$ m)として固定した試料を作製した。その透過像(図2(a))と蛍光像を(図2

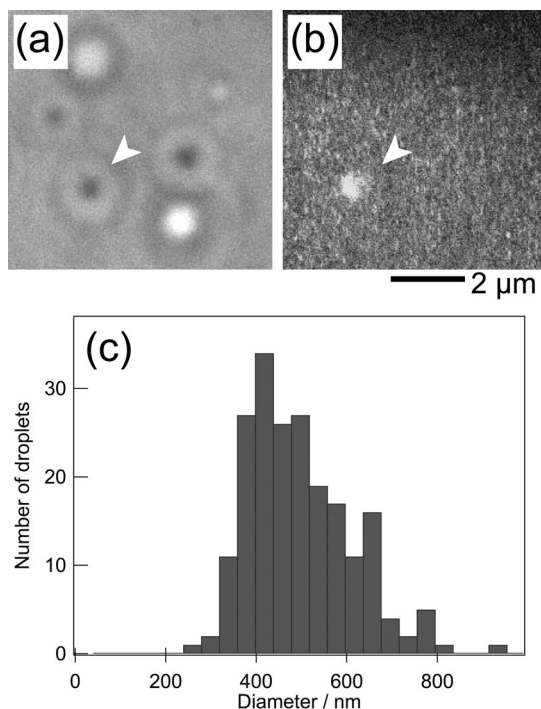


図2. ゲル中に固定された n-オクタン微小液滴の透過像 (a)、および蛍光像(b)。微小液滴の1つにのみ蛍光分子が内包されていることを示す。(c) 204 個の液滴の粒径のヒストグラム。

(b) 示した。蛍光色素には光退色しにくく蛍光収量の大きなペリレンビスイミド(PBI)誘導体を用いた。

透過像からは視野内に5-6個の液滴が存在することが確認できるが、蛍光像からはその中の1つのみに蛍光色素 PBI が内包されていることがわかる。透過像から求めた 204 個の液滴の粒径(直径)の平均値は約 400nm であった(図2(c))。

PBI を内包する微小液滴からの蛍光の時間依存性を測定するために、図3に示す共焦点顕微鏡システムを用いた。励起光源には高くり返し(8 MHz)ピコ秒 YAG レーザーの第二高調波(532nm)を用い、対物レンズで試料に集光する。試料からの蛍光は同じ対物レンズで集めた後、ダイクロイックミラーを透過し、ハーフミラーで分け2つの APD で受光する。検出された光子はその検出時間と検出器番号などの情報のタグをつけて PC に保存する。一回のパルス励起では、高々1つの光子が観測されるだけであると考え、ハーフミラーで蛍光光子が反射され APD2 で検出された場合には、APD1 では同時には光子は観測されない。逆にこのミラーを透過した場合には、APD1 では光子が観測されるが APD2 では観測されない。したがって、単一分子(単一光子源)から蛍光が発せられている場合、APD1 と APD2 で光子を観測した時間差( $\Delta T$ )に対する事

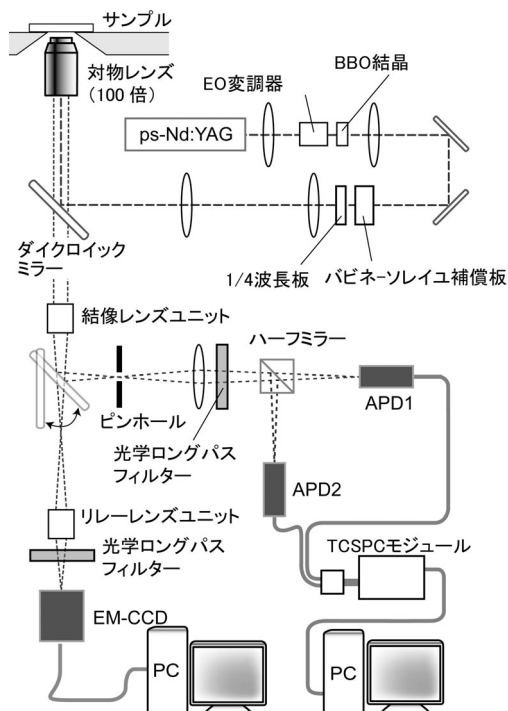


図3. 単一光子測定システム概念図。

象数のヒストグラムにおいて、 $\Delta T=0$ では事象数が0となる(アンチバンチング挙動)。

なおこの測定装置には EM-CCD も搭載しており、試料からの蛍光を EM-CCD に導いた場合には広視野蛍光像を取得することも可能である。本研究課題では、若干の光学部品などを購入して装置の向上を行った。

図4には、この装置を用いて測定したオクタン微小液滴中の PBI 色素からの蛍光のトラジェクトリーの一例を示す。(a)のトラジェクトリーは若干の蛍光強度の変動が見られるが(約 6 秒と 8 秒)、測定開始後 25 秒までほとんどブリンキングを示さず、その後一段階的に蛍光が観測されなくなった。この OFF 状態は色素の退色によると考えられる。(b)には 2 台の APD の光子検出時間差  $\Delta T$  と事象数のヒストグラムを示した。励起レーザーのくり返し周波数 8MHz に対応した 125ns(の倍数)に対応した  $\Delta T$  に信号が観測されるが、 $\Delta T=0$ ではほとんど信号は現れない。一段階の退色とこのアンチバンチング挙動から、この液滴には PBI 一分子が内包されていると結論できる。

一方、(c)に示すトラジェクトリーも若干の蛍光強度の変動が見られるが、約7秒後に蛍光強度が約半分に減少し、その後 21 秒後に完全に蛍光が観測されなくなった。この 1-7 秒までの検出光子に対するヒストグラムを(d)に示す。(b)とは異なり、 $\Delta T=0$ の箇所にも信号が検出されており、その値は他のピークの約1/2-1/2.5の値となった。この 2 段階の蛍光強度の退色と、光子到達時間の相関のヒストグラムからこの液滴には最初に PDI 二分子が内包されていたことがわかる。いずれにせよ、これらの液滴ではほとんどブリンキングは観測されなかった。他の数 100 個程度の液

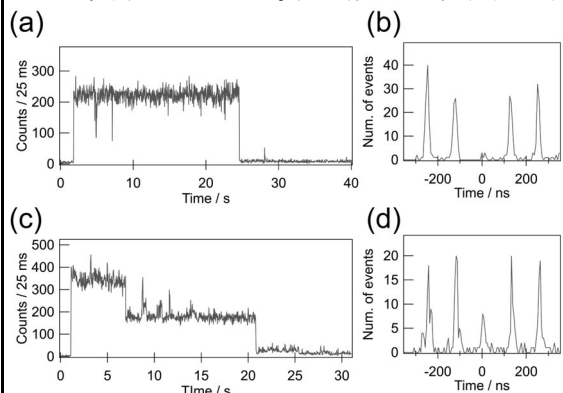


図4. (a)、(c) PBI 分子を内包したオクタン微小液滴からの蛍光強度の時間トラジェクトリーの例。(b)、(d) それぞれのトラジェクトリーに対応した光子相関ヒストグラム。

滴も観測したが、どの液滴でもほとんどブリンキングは観測されなかった。

一方、同条件で測定した PMMA ポリマーフィルム中の PBI 分子からの蛍光のトラジェクトリーには蛍光の ON-OFF が激しく観測されている(図 5)。このようなブリンキングはほぼ全ての PMMA 中の PBI 分子に観測された。

一般にオクタンのような無極性溶媒中で光イオン化により生成したカチオン-電子対の再結合時間は数 ps 以内であるが、PMMA のような高分子中では数  $\mu$  秒から数時間にも及ぶことが知られている。これは放出された電子が無極性溶媒中では、ほとんど溶媒和により安定化されず、高い移動度を有するのに対して、ポリマー中では種々のトラップサイトに捕捉され安定化されることに起因するためと考えられている。これらの知見と今回の実験結果を合わせて考えると、ブリンキングの主要な原因として、光イオン化による蛍光 OFF 状態の生成が重要な役割を果たしていると考えられる。

なお、図 4(a),(c)のトラジェクトリーにはブリンキングは観測されなかったが、バースト状に短時間だけ蛍光強度が強くなったり弱くなったりする現象が観測された。これは液滴界面への蛍光分子の吸着によると考えられる。吸着された場合には、分子の回転拡散が抑制される。溶液中の回転緩和は数 ps から数 10ps の時間スケールで進行するので、25ms 程度の bin time の時間スケールでは完全に平均化されているが、吸着時間が bin time と同程度かそれ以上に長くなると、光吸収の確率は平均化されず、溶液中とは異なる値を示し、そのため蛍光の強度も変化すると考えられる。

実際に液滴の蛍光像を観測すると、図 6(a)や(c)に示すように液滴全体がぼんやりと光っている場合も観測されるが、(b)のように界面に局在した

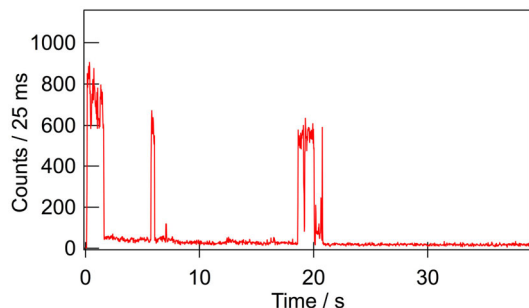


図 5. PMMA ポリマーフィルム中の PBI 一分子からの蛍光強度時間トラジェクトリーの例。

蛍光像も得られている。液滴全体が光っているのは、露光時間(500 ms)の間に PBI が並進拡散により液滴内の種々の位置で発光していることを示している。一方界面で強い蛍光が観測されている場合は、界面において PBI が吸着されていることを示している。事実、このような場合には蛍光強度に対して偏光依存性も観測された。

更に、種々のサイズの液滴を対象に吸着の頻度と光退色の相関を解析した結果、吸着時の光イオン化が退色に対しても重要な役割を果たすことが判明した。

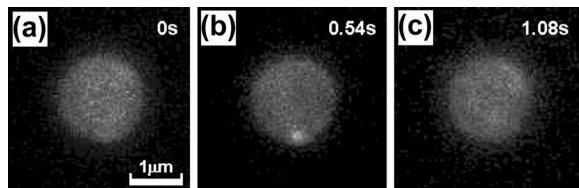


図 6. オクタン微小液滴の蛍光像の時間変化。

(2) プローブ顕微鏡を用いた距離分布測定のための条件の設定と装置構築

いくつかの条件でイオン化を検討した結果、表面に分子を吸着させた試料に光照射を行い、STM のようなプローブ顕微鏡で測定を行った場合にも何らかの信号は得られるが、正確な分子の空間位置と、イオン化状態の確認を行うことが必要であることが判明した。

前節までに述べたように光イオン化はブリンキングに対して重要な役割を果たしていることから考えると、プローブ顕微鏡下での測定が可能な表面の単一分子に対しても、蛍光が OFF 状態になった場合にはイオン化が進行している可能性が高いと考えられる。したがって、蛍光測定を合わせて行い OFF 状態を確認しつつ、高精度に位置を特定しイオン化の距離分布を測定することが可能なプローブ顕微鏡装置を構築する必要がある。また、光計測に対しても、X,Y のみならず、Z 方向に対する空間分解能も有する計測が必要であるが、このための装置改造は比較的大がかりなものになる。そのため、当初は学内共用のプローブ顕微鏡を使用する予定であったが、研究室に導入されている AFM に対して STM ユニートを購入し STM 測定を可能とするとともに、この STM ユニートを更に改造し対物レンズを組み合わせることとし、ヘッドの設計から行う事とした。図 7にはこのヘッド及び STM と単一分子蛍光の同時計測を可能とするシステムの概念図を示す。

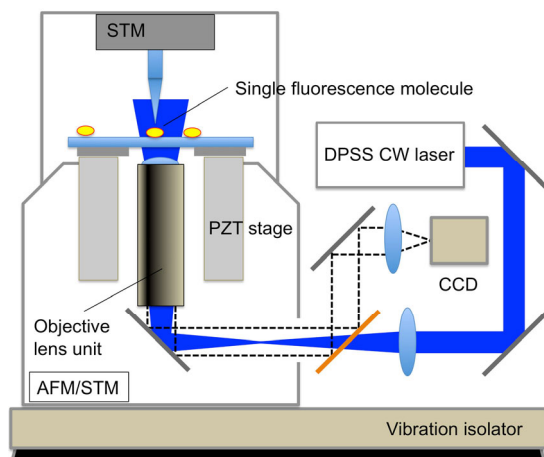


図 7 単一分子蛍光イメージ・STM 同時検出システムの概要。

設計したシステムでは試料の光励起及び蛍光測定に、レーザーを励起光源とした落射配置の蛍光顕微鏡を用いる。その光学系構築のために、STM 本体を改造し励起用レーザー光導入用のための入射ポートを設置すると共に、STM 本体内部にミラー及び対物レンズを設置する。この場合、市販の対物レンズをそのまま使用することは寸法上不可能であるため、STM の試料捜査用ピエゾステージとして比較的内径の広い円筒状ステージを用い、かつ対物レンズは外部の筐体を外し、レンズユニットのみを用いる。外部トリガを用いることで蛍光イメージと STM 測定を同期させるとともに、CCD カメラで検出した単一分子の蛍光イメージと STM イメージを比較することで、どの分子を STM で計測しているかを確認し、STM のデータと蛍光発光挙動との相関を取得できるような設計となっている。

また PBI を基板に物理吸着させた試料を用いた場合には、表面拡散などの影響を除去しにくいことも判明した。そのため、適当なリンカーを持つ誘導体を用いることとし、化学合成を行った。

以上のように、実際の測定までには至っていないが測定に必要な条件に関する知見の獲得と、装置開発は順調に進んでおり、今後の本格的な発展に対する基盤を得ることができた。

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

① M. Yasuda, A. Iida, S. Ito, H. Miyasaka, Fluorescence Detection of Single Guest Molecules in Ultrasmall Droplets of Nonpolar Solvent, *Phys. Chem. Chem. Phys.* (査読有), 2012, 14[1], 345-352. DOI: 10.1039/c1cp22207d

〔学会発表〕 (計 5 件)

- ① 宮本瑠子、伊都将司、宮坂 博、2 波長同時観測単分子追跡装置の開発と性能評価、2011 年光化学討論会、宮崎市河畔コンベンションエリア、2011/9/6-8、2P017
- ② 多賀悠平、伊都将司、竹井 敏、宮坂 博、単分子蛍光イメージングを用いた高分子薄膜のミクロな物性の三次元的評価、日本化学会第 92 春季年会、慶應義塾大学日吉キャンパス、2012/3/25-28、3A3-44
- ③ 多賀悠平、伊都将司、竹井 敏、宮坂 博、高分子薄膜中ゲスト蛍光分子の並進拡散運動の三次元単分子追跡、2012 光化学討論会、東工大大岡山キャンパス、2012/09/12-14、3P019
- ④ Y. Miyamoto, S. Ito, H. Miyasaka, Development of a Dual-color Single Molecule Tracking System, 7th Asian Photochemistry Conference 2012 (APC2012), Osaka, Japan, 2012/11/12-15, PII-49
- ⑤ 多賀悠平、伊都将司、竹井 敏、宮坂 博、高分子薄膜内ゲスト蛍光分子の三次元単分子追跡、日本化学会第 93 春季年会(2013)、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、2013/3/22-25、2PB-071

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.laser.chem.es.osaka-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮坂 博 (MIYASAKA HIROSHI)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授

研究者番号:40182000

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 研究協力者

伊都 将司 (ITO SYOJI)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教

研究者番号:10372632