

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23685050

研究課題名(和文) 高分子鎖一本の三次元コンホメーション計測を通して明らかにする高分子複合系の物理

研究課題名(英文) Three-dimensional observation of single polymer chains in polymer hybrid systems

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・特定准教授

研究者番号：90343235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 22,500,000円、(間接経費) 6,750,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、高分子複合材料中における高分子鎖一本一本の形態を三次元的に直接観察することを実現し、その特性を明らかにすることを目的としている。高分子複合系における高分子鎖の三次元計測を実現するためには、従来よりも広範囲の視野を実現する必要があった。そこで超短パルスレーザー光源を用いた多光子励起を実現する temporal focus 光学系を構築することによって、三次元の超解像観察を行うことができた。この超解像顕微鏡を用いて、ポリメチルメタクリレート(PMMA)鎖が様々な異種高分子とブレンドしたときのコンホメーションを解析した。その結果、PMMA鎖の形態はブレンドの相溶性に依存しないことが示された。

研究成果の概要(英文)：The objective of the current study is to clarify the properties of polymer hybrid systems at the single molecule level. We developed a novel super-resolution fluorescence microscopy system for the three-dimensional imaging. A temporal focus optics with an ultra-short pulse laser was implemented in the microscope system. Our microscope allows the three-dimensional imaging with nanometric spatial resolution for a large volume with  $10 \times 10 \times 10 \mu\text{m}$ . We examined the conformation of single chain of poly(methyl methacrylate) (PMMA) in blend systems with incompatible polymers: poly(butyl methacrylate), poly(vinyl acetate), and poly(vinyl formal). The direct observation of individual chains revealed that the chain dimension of the PMMA chain was not dependent on the polymers. This indicates that the compatibility of the blend systems has little influence on the conformation of the polymer chain.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学 ・ 高分子・繊維材料

キーワード：単一高分子鎖 超解像技術 蛍光顕微鏡 高分子ブレンド コンホメーション

### 1. 研究の背景と目的

高分子材料物性を制御するために、異種高分子とのブレンドやブロック共重合体を用いることで、複数成分から成る材料が現実的に用いられている。このような複合材料においては、各成分の単なる平均的な物性だけではなく、複合系特有の新たな物性が発現することが期待される。高分子の材料物性は鎖のエントロピー項の影響が大きいため、材料設計を行うためには高分子の化学構造だけでなく、高分子鎖がどのようなコンホメーションをとっているのか、またこれが他成分の影響をどのように受けているのかという情報が重要であり、このような単一高分子鎖レベルのパラメータがどのようにマクロ物性と相関しているのかを理解することが必要である。高分子のコンホメーションはこれまで様々な方法で行われてきたが、特に空間的に不均一な複合材料の場合、局所的な実空間観察が最も有効であると考えられる。三次元計測については近年、電子顕微鏡トモグラフィーの開発が目覚ましい進展を遂げているが、複合材料のバルク内部奥深くを直接観察し、また高分子鎖一本を見分けることは現状ではほぼ不可能である。一方、代表者が開発してきた超解像法は高分子鎖一本のコンホメーションの直接観察を可能にするものであるが、現状では複合系における計測を行うことが困難であり、複合材料の分子物性を評価することができなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、複合材料における単一高分子鎖観察を実現する超解像蛍光顕微鏡システムの開発を行うとともに、これを用いて高分子複合材料の物性を明らかにすることを目的としている。これまでに代表者が開発した超解像顕微鏡では三次元計測における視野が  $10 \times 10 \times 1 \mu\text{m}^3$  に制限されていた。特に深さ方向の計測範囲を拡大することで、広範囲にわたる高分解能三次元観察を実現することを目指した。さらにこれを用いて、高分子ブレンド材料中における鎖のコンホメーションを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

超解像顕微鏡においては、試料の蛍光ラベルにフォトクロミック色素であるローダミンスピロアミドを用いる。試料のラベルはその非蛍光異性体の状態で行われ、超解像測定の際に、一つずつ蛍光異性体に転換してイメージングが行われる。これまで、非蛍光体から蛍光体への異性化には紫外光照射によって行われてきたが、焦点面のみで選択的に異性化反応を引き起こすため、フェムト秒パルスレーザーによる多光子励起を試みた。また

長時間の三次元計測を安定して行うために、焦点維持機構の導入を行う。このようにして作製した顕微鏡システムを用いて高分子ブレンド系における個々の鎖のコンホメーションについて評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 超解像顕微鏡の開発

多光子励起を実現するためには時間的にも空間的にも高い光子密度が要求されるため、超短パルスレーザーを集光することが求められる。そこで図1に示すようにパルス幅 100 fs のレーザー光を対物レンズによって試料上の1点に集光した。本研究で用いた色素であるローダミンスピロアミドは、非蛍光異性体に波長 760 nm のパルス照射によって二光子励起され、蛍光体への異性化を引き起こすことが可能であった。本光学系においては試料内の1点のみしか照明することができないため、視野内を隈無く照明するために、ガルバノミラーによる走査を行った。その結果、 $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  の領域を均一に照明し、色素分子の異性化を行うことが可能となった。このような多光子励起は焦点面付近  $1.2 \mu\text{m}$  の領域のみで行うことができた。焦点面を逐次上下に走査することで広い領域で三次元測定を行うことにも成功した。しかしながら、1フレームの測定時間に1秒の時間を要した。超解像顕微鏡測定においては1回の測定で数万フレーム以上の照明と撮像を繰り返す必要があるため、このような長時間のフレームレートでは現実的な超解像画像測定は不可能であると考えられる。

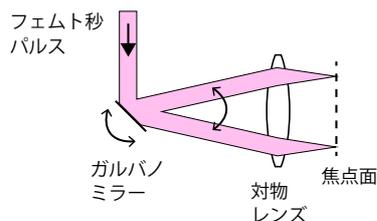


図1 多光子励起光学系の模式図

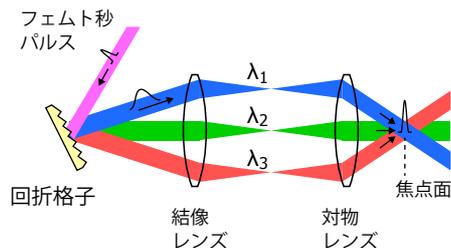


図2 Temporal focusによる多光子照明光学系の模式図

多光子励起の手段として、temporal focus 法による照明を検討した。これは図 2 に示す光学系を有するものである。超短パルスレーザー光を顕微鏡の結像レンズの焦点面に設置された回折格子に入射する。レーザーパルスは波長によって異なる角度に分散するが、結像レンズと対物レンズを通して再び試料上に結像される。この手法では視野内を均一に、かつ焦点面のみで尖頭出力の高いパルス照明を行うことが可能となる。このような光学系を構築することで、励起光を走査することなく均一な多光子励起を実現することができた。Temporal focus では  $8 \times 8 \times 1.6 \mu\text{m}^3$  の領域を励起できるようになった。焦点面以外では励起が起こらないため、対物レンズをシフトすることで励起領域を上下に走査し、 $15 \mu\text{m}$  までの領域を三次元計測することができた。また本手法では 1 フレームを 100 ms で計測することが可能となり、ガルバノミラーによる手法に対して大幅に高速化することができた。

超解像測定は 1 つの試料の測定のために 30 分程度の時間を要する。その間のフォーカスのずれは測定精度に大きな影響を与える。そこで焦点維持のためのフィードバック機構を導入した。顕微鏡観察の励起光とともに近赤外（波長 830 nm）のレーザー光をプローブ光として入射し、試料表面からの反射光を分割フォトダイオードで検出した。試料-対物レンズ間の距離が変化する、すなわちフォーカスがずれるとプローブ光の反射角が変化するため、これを分割フォトダイオードで検出できる。対物レンズをアクチュエーター上にマウントし、試料-対物レンズ間の距離が一定に保たれるようフィードバック制御した。これにより 10 時間以上にわたって、フォーカスのずれを 100 nm 以内に抑制することができた。

## (2) 高分子ブレンド中における高分子鎖のコンホメーション解析

高分子鎖はバルク状態においてランダムコイルコンホメーションをとることが知られているが、本研究では異種高分子の中に孤立した鎖のコンホメーションに着目した。試料としてローダミンスピロアミドで蛍光ラベルされたポリメチルメタクリレート (PMMA、分子量 270 万) を用いた。これを蛍光ラベルを施していない PMMA (分子量 210 万)、ポリブチルメタクリレート (PBMA、分子量 280 万)、ポリ酢酸ビニル (PVAc、分子量 10 万) 及びポリビニルフォルマール (PVF、分子量 11 万) 中に分散し、スピコート法によってフィルム状試料を作製した。ラベル PMMA のコンホメーションは超解像顕微鏡によって観察を行った。各成分の相溶性の指標として溶解度

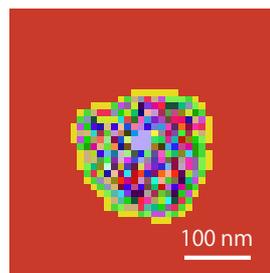


図 3 PBMA 中に分散した PMMA 鎖の超解像顕微鏡画像

パラメータがしばしば用いられる。ここで PMMA と各高分子の溶解度パラメータの差は、PBMA で 0.65、PVAc で 0.95、PVF で 1.95 となっている。

図 3 は PBMA 中に孤立した PMMA 鎖の超解像顕微鏡画像である。一本の PMMA 鎖のコンホメーションが明瞭に観測されている。ここで超解像顕微鏡では、高分子鎖の輪郭に沿って導入された複数の色素分子の位置座標を記録しているため、次式から個々の鎖の慣性半径  $R_g$  を見積もることができる。

$$R_g = \frac{1}{N} \sum_i (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_0)^2$$

$$\mathbf{r}_0 = \frac{1}{N} \sum_i \mathbf{r}_i$$

ここで  $\mathbf{r}_i$  は  $i$  番目の色素分子の位置座標、 $N$  は色素分子の総数である。このような測定から各ポリマー中でのラベル PMMA 鎖の  $R_g$  を見積もったところ、PMMA 中すなわち均一成成分のバルク系においては 42 nm であった。一方、異種高分子である PBMA、PVAc、PVF 中ではそれぞれ 40 nm、43 nm、42 nm であり、その広がりには大きな差は見られなかった。このように、非相溶な異種高分子中に孤立した PMMA 鎖の広がりには、PMMA バルク内のそれとほぼ同じであることが示された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① [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., 419, 54-58 (2013), DOI: 10.1016/j.chemphys.2012.12.026.
- ② 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.
- ③ Hiroyuki Aoki, Kazuki Mori, Shinzaburo Ito, “Conformational Analysis of Single Polymer Chains in Three Dimensions by Super-resolution Fluorescence Microscopy”, *Soft Matter*, 8, 4390-4395 (2012), DOI: 10.1039/C2SM07227K.
- ④ 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.
- ⑤ Toru Ube, Hiroyuki Aoki, Shinzaburo Ito, Jun-ichi Horinaka, Toshikazu Takigawa, Toshiro Masuda, “Relaxation of Single Polymer Chain in Poly(methyl methacrylate) Films under Uniaxial Extension Observed by Scanning Near-field Optical Microscopy”, *Macromolecules*, 44, 4445-4451 (2011), DOI: 10.1021/ma2004986.
- ⑥ Hiroyuki Aoki, Jun-ichi Kakuta, Tomoyuki Yamaguchi, Satoshi Nitahara, Shinzaburo Ito, “Near-infrared Fluorescent Nano-particle of Low-bandgap  $\pi$ -conjugated Polymer for in vivo Molecular Imaging”, *Polym. J.*, 43, 937 - 940 (2011), DOI: 10.1038/pj.2011.86.
- ⑦ Li-Ting Lee, Toru Ube, Hiroyuki Aoki, Shinzaburo Ito, “Characterization of Surface Compositions of Phase-Separated Structures in Conjugated Poly(phenylene vinylene) Blends by Scanning Near-Field Optical Microscopy”, *Polymer*, 52, 5897-5903 (2011), DOI: 10.1016/j.polymer.2011.10.043.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 黒田泰樹, 青木裕之, 伊藤紳三郎, “スピコート膜中における単一高分子鎖の配向: 超解像顕微鏡による直接観察”, 第 15 回高分子表面研究討論会 (東京理科大森戸記念館), 2013/2/1.
- ② 黒田泰樹, 青木裕之, 伊藤紳三郎, “スピコート法により作製した PMMA 薄膜中の単一高分子鎖の形態評価”, 第 61 回高分子討論会 (名古屋工業大学), 2012/9/20.
- ③ 青木裕之, 黒田泰樹, 伊藤紳三郎, “スピコート薄膜中における単一高分子鎖のコンホメーション”, 第 62 回高分子討論会 (金沢大学), 2012/9/13.
- ④ 進章彦, 宇部達, 青木裕之, 伊藤紳三郎, “せん断変形下における単一高分子鎖の形態変化の評価 -超解像光学顕微鏡による直接観察-”, 第 61 回高分子年次大会 (パシフィコ横浜), 2012/5/31.
- ⑤ 青木裕之, 森一樹, 伊藤紳三郎, “超解像光学三次元イメージングによる単一高分子鎖の形態評価”, 第 60 回高分子討論会 (岡山大学), 2011/9/28.

[図書] (計 2 件)

- ① 青木裕之, “近接場光”, 高分子ナノテクノロジーハンドブック, 西敏夫 編, 第 3 章, 第 5 節, pp. 715-722, エヌ・ティー・エス, 2014.
- ② 青木裕之, “光学顕微鏡”, 高分子ナノテクノロジーハンドブック, 西敏夫 編, 第 4 章, 第 2 節, pp. 732-740, エヌ・ティー・エス, 2014.

## 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・特定  
准教授  
研究者番号: 90343235