単一分子蛍光イメージングの材料分析・評価への応用

ホスト材料中の蛍光ゲスト分子の並進・回転拡散を単一分子蛍光イメージングにより追 跡することで、材料内部の極めて微小な(分子レベルの)領域のホスト材料の物性やその 変化に関する情報を取得することができる。本稿では、単一分子イメージングの装置構成 や解析手法について概説し、応用例として高分子材料の評価について解説する。また、近 年開発された、蛍光スイッチ分子を用いた新たな単一分子追跡法についても紹介する。

伊都将司,宫坂博

1 はじめに

解

説

蛍光測定は、バックグラウンドフリー測定が可能であ り、単一分子レベルの極めて高感度な検出も比較的容易 に実現できる.このような蛍光検出の利点を活用し, 1980年代から蛍光測定による単一分子検出が報告され るようになった。例えば、1981年には複数の蛍光色素 で標識された単一 DNA 鎖の蛍光イメージングが報告さ れ¹⁾, 1990年には極低温の分子性結晶中の単一蛍光分子 の蛍光励起スペクトル測定も報告されている²⁾. 1990 年 代以降は、蛍光測定による単一分子検出がより一般的と なり、さまざまな単一分子のダイナミクスの計測も行わ れてきた. 例えばパルスレーザーを光源とした共焦点 レーザー顕微鏡に時間相関単一光子計数法を組み合わせ た顕微測定システムにより, psからnsの時間領域の単 一分子の励起状態(発光)ダイナミクスに関する情報も 取得されている³⁾. また溶液中の分子を対象とした蛍光 相関分光法では、共焦点顕微鏡のレーザー集光スポット にブラウン運動で出入りする単一分子の蛍光強度の自己 相関関数の解析から、分子の並進拡散係数やそれに関連 した溶液の温度、生体高分子の熱的な構造変化、非発光 状態(励起三重項など)への遷移ダイナミクスなどns から ms に渡る種々の分子ダイナミクスに関する情報が 取得可能となっている.

共焦点顕微鏡ベースの単一分子蛍光検出システムで は、蛍光励起用レーザーの集光スポットに存在する単一 分子の発光を検出するため、基本的に複数の単一分子を 同時に観測することはできない.一方、CCD 検出器に よる蛍光イメージングは、時間分解能は一般的に ms 程 度であり共焦点顕微鏡測定システムのように単一分子の 励起状態ダイナミクスを追跡することは一般には困難で あるが,数10 μm 四方程度の空間領域に存在する複数 の単一分子を同時に検出可能である.したがって位置選 択的な情報も含め,ms以降の時間スケールにおける単 一分子の回転緩和,並進拡散などの情報を取得すること ができる.本稿では特に単一分子蛍光イメージングに焦 点をあて,その測定系,得られる情報,超解像技術との 関連,材料評価への展開について解説する.

2 単一分子蛍光イメージング

2・1 単一分子蛍光イメージング装置の構成

単一分子蛍光イメージング装置(ワイドフィールド (広視野) 顕微鏡)の例を図1aに示す. 蛍光の励起光 源として連続発振(CW)レーザーを用い、落射配置で 試料を励起する. 試料中の分子を均一に励起するため. 通常は偏光補償板などを用いてレーザー光の偏光を円偏 光に変換して照射する.一方,励起の偏光依存性を検出 するときは直線偏光を用いる.数十 μm から 100 μm 四 方程度のイメージング領域全体をほぼ均一に励起するた め、対物レンズ透過後の光束がほぼ平行に試料に入射す る光学配置とする. そのために, 対物レンズの後側焦点 に励起用レーザー光を集光するよう顕微鏡外部のレー ザー入射用光学系を調整する. 試料の蛍光は同じ対物レ ンズで集められ CCD 検出器に導かれる. 検出器として は、単一の蛍光分子からの光子を検出可能な感度を有す る電子増倍 CCD (EMCCD) カメラや CMOS カメラな どが使用される.一般的な単一分子蛍光イメージングで は、可視域の量子収率が90%以上の検出器が用いられ る. 結象系の光路には励起光をカットする高性能の光学 ロングパスフィルター(励起光の波長における OD が 6 以上)が挿入され、試料の蛍光のみが EMCCD(あるい は CMOS) カメラにより検出され PC の記憶媒体に保存 される. イメージングの2次元動画データはスペクト ルなどの1次元データに比べて容量が大きく、そのた めデータ転送速度が十分高速で、かつデータ保存用記憶

Evaluation and Analysis of Materials by Using Single-Molecule Fluorescence Imaging Methods.



図1 (a) 単一分子蛍光イメージング装置の構成例;(b) 単一 分子の蛍光像と2Dガウスフィットの結果の例;(c) 単一分子 のフォーカス像(i) とデフォーカス像(ii)の例.(iii)では (ii)のデフォーカス像に蛍光の遷移双極子の向きを矢印で追記 した;(d) 非点収差イメージングにより得られる単一分子蛍光 像の光軸方向位置による変化の例

媒体の容量が大きな PC(ワークステーションが望ましい)を用いる必要がある.

2・2 単一分子追跡とローカリゼーション法

通常の蛍光分子のサイズは 1~2 nm 程度であり,光 学顕微鏡の分解能(せいぜい 200 nm 程度)に比べて十 分小さい.したがって CCD カメラで検出される単一分 子の蛍光像は 200 nm 程度の発光スポットとして観測さ れる.このスポットは顕微鏡の結像光学系の点像関数 (PSF)と見なすことが可能であり,この蛍光像を 2次 元ガウス関数を用いて解析し光強度分布の重心の位置を 求めることで分子の位置が決定できる(図 1b).この精 密な位置決め手法はローカリゼーション法と呼ばれてい る⁴⁾.分子の位置決め精度は、単一分子の蛍光スポット の *S/N*比に依存するが、一般的な蛍光イメージングに おいては、数 nm から数十 nm である.時間的に連続し た多くの蛍光像をこの手法により解析した場合には、単 一分子の各時間における位置の時間発展,すなわち並進
拡散挙動をナノメートルの精度で追跡することができる.この単一ゲスト分子の拡散の軌跡からは,ホスト材
料内部の構造や不均一性に関する知見が得られる.

2・3 デフォーカスイメージング法

上述のように、単一分子の蛍光像は回折限界で決まる サイズの発光スポットとして検出される.しかしなが ら、単一分子の発光は双極子放射であり、厳密には単一 分子は球面波を発する点光源ではない.そこで、対物レ ンズの高さをわずかにずらしてデフォーカスし、焦点の ボケた像を取得すると、双極子放射の異方性を反映した 非同心円状の蛍光像が得られる(図1c)⁵⁾.このデフォー カス像は分子の回転緩和に対応して変化するため、単一 分子の並進及び回転運動を追跡することが可能となる.

2・4 非点収差イメージング法

光学顕微鏡は物体面上の2次元分解能は波長の半分 程度(可視光では200から300 nm)が達成可能である が,対物レンズの光軸方向の分解能は数µmであり,一 般に光学顕微鏡は2次元観察に用いられる.しかし,結 像光学系にシリンドリカルレンズを挿入し,非点収差を あえて導入することで観測対象である単一分子の光軸 (Z軸)方向のわずかな(<1µm)位置の変化に伴って, 蛍光像の縦横比が変化する(図1d)⁶⁾.あらかじめZ方 向の変位と蛍光像の形状との相関を取得しておくこと で,3次元の単一分子追跡が実現できる.分子のZ変位 に対する蛍光像の変化の度合いは挿入するシリンドリカ ルレンズの焦点距離に依存するため,観測対象のZ変 位の大きさに合わせて適当なシリンドリカルレンズを選 択する.

3 単一分子蛍光イメージングの応用例

3・1 高分子材料の重合・架橋反応の追跡

熱や光で重合・架橋を起こし、固体化する高分子材料 は、半導体微細加工用のフォトレジストやマイクロ 3D プリンティングなどの微細加工に広く用いられている. このような材料系では、重合・架橋反応のミクロな不均 一性が不均一なエッチング結果や、造形した微小構造の 部分的構造脆弱性などにつながるため、微小領域におけ る反応の進行具合を in situ で評価可能な分析手法は非 常に重要である.筆者らは、単一ゲスト蛍光分子の拡散 挙動を詳細に追跡することで、上記の反応性高分子材料 の重合・架橋反応に伴うミクロな粘性変化を評価した.

図2aにポリ2-ヒドロキシエチルアクリレート(PHEA) を主材とし,架橋剤と重合開始剤を含む熱架橋性高分子 材料(薄膜)中のゲスト蛍光分子(ペリレンジイミド (PDI)誘導体)の並進拡散挙動を室温(22~23℃)下 で単一分子追跡した結果を示している⁷⁾. PHEA のガラ



図2 (a) ゲスト蛍光分子 (PDI 誘導体)の構造と熱処理前後 の熱架橋(硬化)性高分子薄膜中の PDI の単一分子追跡結果 (拡散の軌跡); (b)熱処理前後の PDI 誘導体の並進拡散係数 のヒストグラム; (c)熱処理前,200℃で3分及び5分熱処理 した熱硬化高分子材料中 PDI 誘導体のデフォーカス像; (d) 熱処理に伴う高分子鎖あたりの架橋点数の変化(IR スペクト ル測定より導出)

ス転移温度は約16℃であり,加熱前の試料ではPDIは ブラウン運動による回転・並進運動を呈している. 200℃で3分間加熱後室温まで冷却しイメージングし た試料では,並進拡散係数が明らかに低下していること が拡散の軌跡から確認でき,並進拡散係数のヒストグラ ム(図2b)にも明瞭に表れている.このとき40%程 度の分子は並進拡散がほぼ停止していた.図2cは各加 熱条件での蛍光デフォーカス像である.未熱処理の試料 中ではPDIは自由に並進・回転拡散し,露光時間に比 ベ回転緩和が高速なためデフォーカス像は平均化され ドーナツ状となる.200℃で3分間加熱した試料では, 上述のように約40%の分子はほぼ並進拡散が止まって いるが,デフォーカス像ではほぼすべての分子が同心円

ぶんせき 2024 7

状の当方的な形状を示している.これは並進運動がほぼ 停止するほど重合・架橋が進んだ場合でも,低分子量の ゲスト分子が回転拡散できる程度の微小なスペースが存 在していることを意味する.さらに加熱すると図に示す ように並進,回転拡散ともに停止する.FTIR による赤 外吸収スペクトル測定の結果(図2d)と併せて議論す ると,並進運動のみが停止するのは約86%の架橋剤が 反応し高分子鎖あたり平均14.8個の架橋点が形成され たときで,さらに91%以上反応が進み15.7個の架橋 点が形成されるとゲスト分子の並進・回転拡散が完全に 停止する.このように,ゲスト分子の動きを一分子ずつ 追跡することで材料の局所的な反応の進み具合を評価す ることができる.

3・2 薄膜材料中ゲスト分子の膜の厚さ方向の分布評価

上述の非点収差蛍光イメージング法を用いると, 膜厚 1 µm 以下の非常に薄い薄膜中の, 膜の厚さ方向のゲス ト分子の空間分布や拡散挙動を評価することもでき る⁸⁾. 図 3 には測定結果の一例として, ガラス基板状に 製膜した膜厚1μmのポリメタクリル酸メチル(PMMA), ポリアクリル酸メチル (PMA), ポリスチレン (PSt) 及び PHEA 薄膜中のペリレンジイミド誘導体 (BP-PDI, 構造は図 3bのインセットに示した)の Z 方向(膜厚及 びイメージング光学系の光軸と並行方向)の空間分布を 示す.興味深いことに、高分子ごとに膜厚方向のゲスト 分子の分布が異なることが分かる。特に PHEA はゲス ト分子がガラスと高分子界面付近には全く存在せず,界 面から数百 nm 離れた領域に局在している. この理由は 明確には解明されていないが、界面近傍の高分子がバル クとは異なるネットワーク構造を有し、ゲスト分子の溶 解度が界面付近で異なることを示唆している. このよう な分析手法は、種々の低分子量分子を添加した材料系の 内部構造や反応性を理解し目的の性能を実現する上で重 要な情報を与えると期待される.

4 蛍光スイッチ分子を用いた単一分子追跡

4・1 単一分子追跡に基づく材料評価の課題と解決法

上述のように、蛍光イメージング法を用いて単一分子 の挙動を詳細に追跡することで、非常に微小な(観測す る単一分子周囲の)領域の材料物性やその変化に関する 情報が取得できる.しかし、単一分子追跡のためには、 回折限界で決まる単一分子の蛍光スポット(200~300 nm 程度)同士が互いに重ならない程度の、非常に薄い 濃度でのイメージングが必要である.また比較的高強度 の励起光照射による蛍光分子の光褪色のため、一個の蛍 光分子を追跡可能な時間は数秒からせいぜい数十秒程度 であり、時間と共に発光スポットの数が減少する.この ような理由から、観測領域全域をゲスト分子が隈なく拡 散するような条件でのイメージングは難しく、観測領域



図 3 (a) 種々のポリマー薄膜中の PDI 誘導体 (BP-PDI, bの インセットに構造を示す)の非点収差イメージ;(b) 膜厚 1 µm の PHEA, PMMA, PMA, PSt 薄膜中の BP-PDIの膜の厚 さ方向の空間分布

(a) 中の蛍光像は参考文献⁸⁾の Fig. 1, (b) 中のヒストグラム
は参考文献 8) の Fig. 2 を改変掲載.

全体の材料評価は困難な課題であった.

しかし近年筆者らは,光照射などの外部刺激によって 非蛍光性の異性体と強い蛍光を示す異性体間を相互変換 する分子系を用いることで,上記の課題を克服し,非常 に長時間にわたる単一分子追跡とそれによる観測領域全 域にわたるゲスト分子の拡散挙動の詳細な情報取得に成 功した⁹.

4・2 単一波長の可視光照射により実現されるジア リールエテン誘導体の自発的蛍光スイッチング

図4aに示すジアリールエテン(DAE)誘導体は,非 蛍光性の開環体と強い蛍光を示す閉環体の2種類の異



図4 (a) 蛍光スイッチ特性を示す DAE 誘導体の構造と異性化 反応,それぞれの異性体の吸収スペクトルと閉環体の蛍光スペ クトル⁹;(b) CW 532-nm レーザー照射下の DAE 誘導体の単 ー分子蛍光スイッチの様子;(c) DAE 誘導体の蛍光 ON 状態 の持続時間のヒストグラム;(d) 532-nm レーザー光照射直後, 1時間後,3時間後の PHEA 中 DAE 誘導体の蛍光イメージ; (e) 1 分間及び 63 分間の単一分子イメージングで得られた PHEA 薄膜中の DAE 誘導体の並進拡散の軌跡のオーバーレイ

性体の間で光異性化を行う. 図に示すように開環体は紫 外域のみに吸収帯を持つが, 閉環体は紫外から可視域に も吸収帯を持つ. 開環体に紫外光照射すると蛍光性の異 性体が生成し, 一方閉環体に可視光を照射すると量子収 率 70~80 % 程度で蛍光を発すると共に, 低い(収率 10⁻³~10⁻⁵)確率で開環体への逆異性化を示す. 一般に はこの分子系の蛍光スイッチングには紫外光及び可視光 を用いるが, 開環体の非常に微弱な吸収体の長波長側の 裾(ホットバンド, あるいは Urbach tail として知られ る)と閉環体の吸収バンドを同時に励起可能な可視レー ザー光をこの分子に照射すると、単一波長照射下で自発 的な蛍光 ON-OFF スイッチングが実現できる⁹⁾.

図 4 b は高分子 (PHEA) 薄膜中の DAE の蛍光像の 4 秒間の時間変化であり、マークされた DAE 誘導体は、 3秒ほど蛍光 ON 時間が続いた後蛍光が消失している. 蛍光 ON 状態の持続時間は置換基により異なるが、図 4cのヒストグラムで示されているように、この系の場 合波長 532 nm の光照射下で ON 時間は中央値で 4 秒ほ どである. 個々の DAE はランダムに ON-OFF を繰り返 すが、 蛍光 ON 状態にある DAE の数は、単一分子追跡 が適用可能な濃度に保たれる.また,光褪色と競合して 戻りの異性化反応が起こるため光退色が幾分抑制され る. さらに添加された DAE のうち一部のみが ON 状態 となるため、たとえ褪色が起こっても OFF 状態の DAE 分子が ON 状態となり蛍光イメージで追跡が可能とな り、この系では3時間以上にわたって単一分子追跡が 可能であった(図4d). 63分の単一分子追跡の結果が 図4eであり、観測視野全域が単一分子の並進拡散の軌 跡で埋め尽くされていることがわかる. この測定手法に より、場所ごとの並進拡散係数の 2D マップが作成でき る. ゲスト分子の並進拡散係数は、周囲のホスト分子の 環境に強く依存するので、この 2D マップはホスト高分 子の不均一性を示す.

4・3 蛍光スイッチングに基づく長時間単一分子追跡 によるポリマーブレンドの評価

上で述べた DAE の蛍光スイッチングに基づく多数分 子の長時間追跡手法を用いてポリマーブレンドのナノ構 造と局所拡散係数を評価した応用例について紹介す る¹⁰⁾.ホスト材料は、PHEA と多分岐シリコンポリマー の混合膜で、海島構造のミクロ相分離を示す. 図5aは その光学透過像で、図5bは原子間力顕微鏡(AFM)像 である. このポリマーブレンドにおいては、PHEA が海 を、シリコンポリマーが島を形成している. DAE は選 択的に PHEA 相に存在し、シリコンポリマー相には進 入しない.

図5cは60分の蛍光イメージングデータに対してロー カリゼーション法により解析した DAE の存在位置の空 間分布である. これは超解像顕微鏡法の一つである光活 性化局在顕微鏡法 (PALM, photoactivated localization microscopy)で得られる超解像イメージと本質的に同じ ものであり、ポリマーブレンドの海島構造が高い空間分 解能で可視化されている.一方,図5dは拡散係数の空 間マップであり、ゲスト分子の DAE が場所に依存した 拡散係数を呈していることが分かる.図5eは試料の一 部を拡大した PALM 像と対応した場所の拡散係数マッ プである.

興味深いことに、球状のシリコンポリマー周囲の

(a) b (d) 拡散係数分布 (c) PALM像 200 South 200 So 140 -15 0 100 -16 um (e) バルクPHEA 領域 相境界近傍 1 µm (f)_{0.1} (g) (h) Fraction 0.001 0.0 0.2 0.4 Diff. coef. $/\mu m^2 s^{-1}$

図5 (a, b) PHEA と多分岐シリコンポリマーの混合固体膜の 光学透過像(a)とAFM(高さ)像(b);(c) PHEA 相に選択 的に存在する DAE 誘導体の検出位置の分布;(d) DAE 誘導体 の並進拡散係数の空間分布;(e)(c)及び(d)の赤い四角部 分の拡大図;(f) PHEA バルク相と PHEA と多分岐シリコンポ リマーの相境界近傍の拡散係数分布. (g,h) PHEA と多分岐シ リコンポリマーの混合固体膜の AFM 高さ像(g) と位相像(h)

1 µm

PHEA 相においては、PHEA のバルク相に比べて拡散係 数が大きくなっており、相界面に特異的な物性(粘性、 あるいは拡散係数)の変調が可視化されている.この結 果は、本手法では材料のナノ構造の可視化に加えて、物 性の空間分布に関する情報も同時に取得可能であること を示している.図5fはPHEAバルク相と相界面付近の 拡散係数のヒストグラムである.上述のように、従来の 単一分子イメージングでは観測可能な分子数が制限され ていたため、同一のイメージング領域でこれほど多数個 の統計情報を取得することは困難であった.一方,本手 法では数千から数万分子の測定が可能となり、さまざま な統計的解析に足るデータ量を取得できることを示して いる

また, 図 5 g, h はこの試料の AFM 測定の結果であり, 左は高さ像、右は位相像である. 位相像の信号強度は材 料の粘弾性に関する情報を含んでおり、PHEA バルク相 である領域(i)と相境界近傍の領域(ii),(iii)では明 らかに異なる信号強度を示していることから,相境界近傍と PHEA バルク相とで異なる拡散係数を示した単一分子追跡の結果を支持している.

5 おわりに

本稿では、単一分子の蛍光イメージング手法と関連技 術、ローカリゼーション法と単一分子追跡について概説 し、その高分子系材料評価への展開に関して、研究例を 紹介した.また、一般的な蛍光分子をゲストとした単一 分子追跡を広く材料評価へ展開する際に障壁となってい た観測可能分子数及び観測時間の制限について述べ、近 年筆者らが開発した、一波長蛍光スイッチングに基づく 多数の「単一分子」追跡手法による上記制限の超克への アプローチを紹介した.多数分子の独立追跡手法の原理 を解説し、それを用いたポリマーブレンドのミクロ相分 離構造の可視化と拡散係数分布の同時計測についても紹 介した.

単一分子は、イオンや原子を除けば、最も微小なナノ 発光体である.本稿で紹介したように、その発光挙動、 拡散挙動は分子周囲の極めて微小な領域のホスト材料の 物性に関する情報を与えてくれる.本稿で紹介したよう に、従来は困難であった「極めて多数個の単一分子の拡 散挙動を同一イメージング視野内で観測」することが近 年可能となり、それにより非常に多くの単一分子に関す る測定データが取得できるようになった.今後は、イン フォメーションサイエンス、データサイエンスやケモメ トリクスなどとの融合により、分子レベルのミクロ物性 とマクロな物性との階層を繋ぐ新たな知見、概念の創出 が期待される.

謝辞 本稿で紹介した成果は,立教大学入江正浩教授・森本 正和教授,富山県立大学竹井 敏教授,東京農工大学花崎逸雄 准教授,また大阪大学基礎工学研究科の研究室の学生諸氏との 共同研究の成果である.ここに謝意を表する.

文 献

- 1) K. Morikawa, M. Yanagida : J. Biochem., 89, 693 (1981).
- 2) M. Orrit, J. Bernard : Phys. Rev. Lett., 65, 2716 (1990).
- J. J. Macklin, J. K. Trautman, T. D. Harris, L. E. Brus : Science, 272, 255 (1996).
- E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess: *Science*, **313**, 1642 (2006).
- 5) M. Böhmer, J. Enderlein : J. Opt. Soc. Am. B, 20, 554 (2003).
- 6) L. Holtzer, T. Meckel, T. Schmidt : *Appl. Phys. Lett.*, **90**, 053902 (2007).
- S. Ito, T. Kusumi, S. Takei, H. Miyasaka : Chem. Commun., 2009, Issue 41, 6165 (2009).
- S. Ito, K. Hiratsuka, S. Takei, H. Nishi, D. Kitagawa, S. Kobatake, H. Miyasaka : *Photochem. Photobiol. Sci.*, 21, 175 (2022).
- Y. Arai, S. Ito, H. Fujita, Y. Yoneda, T. Kaji, S. Takei, R. Kashihara, M. Morimoto, M. Irie, H. Miyasaka : *Chem. Commun.*, 53, 4066 (2017).
- 10) S. Ito, M. Funaoka, I. Hanasaki, S. Takei, M. Morimoto, M. Irie, H. Miyasaka : *Polym. Chem.*, 13, 736 (2022).



伊都 将司 (Iro Syoji)

大阪大学大学院基礎工学研究科(〒560-8531大阪府豊中市待兼山町1-3).大阪大 学大学院工学研究科博士後期課程.博士 (工学).《現在の研究テーマ》レーザーと 顕微鏡を駆使した新規メゾスコピック光応 答の開拓と応用.《趣味》釣り、トレイル ラン,自転車.

E-mail : sito@chem.es.osaka-u.ac.jp

宮坂 博(MIYASAKA Hiroshi)

大阪大学エマージングサイエンスデザイン R3 センター(〒560-8531大阪府豊中市 待兼山町1-3).大阪大学大学院基礎工学 研究科博士後期課程修了.工学博士.《現 在の研究テーマ》超高速時間計測による光 化学反応の機構解明と新規光応答の開拓. 《主な著書》"光化学フロンティア未来材 料を生む有機光化学の基礎",(化学同人). 《趣味》写真撮影,料理,ワイン,ビール. E-mail: miyasaka@chem.es.osaka-u.ac.jp