単一分子計測による高分子薄膜の物性評価

青 木 裕 之

京都大学先端医工学研究ユニット ☎ 615-8510 京都府京都市西京区京都大学桂

(2011 年 10 月 22 日受付 ; 2011 年 11 月 8 日掲載決定)

Properties of Polymer Thin Films Studied by Direct Observation of Single Chains

Hiroyuki Aoki

Advanced Biomedical Engineering Research Unit, Kyoto University
Nishikyo, Kyoto 615-8510

(Received October 22, 2011 ; Accepted November 8, 2011)

Properties of polymer materials originate from the large degree of freedom of a single polymer chain. The direct observation of the conformation of single polymer chains would provide much information for the fundamental understanding of the properties of polymers. Fluorescence imaging techniques are suitable for the selective observation of individual molecules embedded in a bulk medium; however, the spatial resolution of conventional optical microscopy is limited to ~200 nm by the diffraction limit. This paper reviews the state-of-the-art optical imaging techniques that enable to obtain a fluorescence image with a nanometric spatial resolution and describes its application for the direct imaging of the conformation of individual polymer chains. The conformation of poly(alkyl methacrylate) chains in thin films and micro-phase separation structures of a block copolymer is discussed.

KEYWORDS : polymer, single molecule, near-field optics, super-resolution technique, fluorescence microscopy

1. は じ め に

高分子化合物は鎖状の巨大分子であり、その大きな分子内自由度のために様々な形態（コンホメーション）をとることができる。このような自由度の大きさが高分子特有の物性を示す起源となる。そのため、高分子鎖のコンホメーションについては古くから研究が行われてきた^{1,2)}。高分子材料の表面・界面、薄膜状態においてはバルクとは異なった物性が発現することが知られているが、これは界面の存在によって高分子鎖の自由度が空間的に制限されていることが大きな要因の一つであると考えられる。このような高分子材料の界面・薄膜物性を明らかにするにあたり、高分子鎖一本一本のコンホメーションを直接的に実空間観察し、またその時間変化を追跡することが可能となれば、材料の物性発現のメカニズムを理解するための重要な情報を与えるものと考えられる。実在の高分子材料は多数の高分子鎖で構成されてお

り、また鎖同士は互いに複雑に絡まり合っている。このような高分子鎖一本のコンホメーションを評価するためには、バルク中の複数の鎖の中から一本のみを選択的に観察する必要がある。このような計測を実現する手法としては蛍光ラベル法が最も有効であると考えられる。試料に微量の蛍光色素分子を導入（蛍光ラベル）し、その蛍光発光を顕微鏡観察することでラベルした試料のみの構造を選択的に実空間観察することができる。しかしながら従来の光学顕微鏡では空間分解能が回折限界によって制限されており、高々 100 nm 程度の拡がりしか持たない高分子鎖のコンホメーションを直接観察することは不可能であった。しかし、最近になって光を用いながらナノメートルスケールの空間分解能での光学イメージングを実現する近接場光学顕微鏡・超解像顕微鏡、また単一分子の三次元配向評価を可能にするデフォーカス観察法などが提案され、これまでにない情報を得ることができるようになっている。本稿ではこのような最近の蛍光顕微鏡技術の発展について紹介し、高分子の分子レベルでの物性評価への応用について述べる。

2. 回折限界を超える光学顕微鏡

2.1 近接場光学顕微鏡

光学顕微鏡は光をレンズによって集光することで画像を行っているが、回折の影響により光を無限小の点に集光することはできず、波長の半分程度のサイズに広がる（回折限界）。そのため可視光領域では 200 nm 以下に近接した二つの物体は重なって観察され、見分けることが不可能となる。一方、光を波長以下の微小構造に照射すると、その近傍にのみ束縛された近接場光が発生する。このような近接場光を用いて試料を照明するのが走査型近接場光学顕微鏡（SNOM）である^{3,4)}。SNOM は走査型プローブ顕微鏡の一種であり、Fig. 1 (a) に示すような微小開口を有する探針を用い、そこに発生した近接場光を照射し、試料からの信号光を検出する。その空間分解能は近接場光の局在によって決まり、概ね 50–100 nm となる。SNOM では信号光の検出に蛍光分光やラマン散乱分光、偏光測定など様々な分光法を適用することができ、回折限界を超える空間分解能で多彩な情報を得ることができる。

Fig. 1 (b) にポリメタクリル酸メチル（PMMA）鎖の単一分子鎖を観察した SNOM 像を示す⁵⁾。これは PMMA 鎖の側鎖メチル基の 0.8% に蛍光色素であるペリレンで置換することでラベルした鎖を、蛍光ラベルしていない PMMA のマトリックス中に分散した試料を測定したものである。このような試料を用いることで PMMA のバルクの中でラベルした PMMA 鎖のみを選択

的に観察することができる。通常の光学顕微鏡では明確に捉えることが不可能なサイズの高分子鎖のコンホメーションを、SNOM では明瞭に観察できていることがわかる。以上のように蛍光ラベル法と高分解能の光学イメージングを用いることでバルク内の高分子鎖一本のコンホメーションを実空間で評価することができるようになった。

2.2 超解像蛍光顕微鏡

超解像光学はナノメートルスケールの分解能を達成する手法の一つとして近年注目を集めている。上に述べたように近接場光学顕微鏡は光そのものをナノメートルスケールの空間に閉じ込めることで、直接的に光学像の分解能を高めようとするものである。これに対して超解像光学顕微鏡は回折限界によって制限された従来の光学系を用いながら、測定法やデータ解析によって高解像の情報を抽出するものである。ここでは単一分子検出に基づく超解像顕微鏡法について述べる。

近年の高感度 CCD カメラを用いることにより、強い蛍光を発する色素であれば分子一個を蛍光顕微鏡によって容易に観察できるようになった。このとき単一分子の蛍光画像は回折限界によって広がった輝点として観察されるため、近接した二つの分子を識別可能であるか否かという基準においては光学顕微鏡の分解能は 200 nm 程度と見なされる。しかし視野内に一つの分子しか存在しない場合、その中心の位置を決定する精度は非常に高いことが知られており、その位置決定の分解能は 10 nm 以下にも及ぶ。このような手法はしばしば FIONA（Fluorescence Imaging with One-Nanometer Accuracy）と呼ばれる⁶⁾。

蛍光イメージングにおいては、観察対象となる構造物に対して蛍光色素分子を複数結合し、それらの空間分布を画像として観察する。従来の蛍光顕微鏡観察では全ての分子を同時に発光させ、これを結像するため近接した分子同士を解像できない。しかし色素分子のうち、ただ一個だけを発光させて、その位置を FIONA によって取得すれば、色素分子の座標を数 nm の分解能で決定できることになる。そしてこのプロセスを繰り返して、全ての色素分子について位置座標を一つ一つ順番に測定し、それらの座標データを一枚の面内にプロットすることで、再構築画像を作成することができる。このようにして得られる蛍光画像の空間分解能は分子の位置決定精度すなわち数 nm によって決定され、非常に高い分解能での蛍光イメージングを実現することが可能となる。その測定プロセスを Fig. 2 に模式的に示す。このような測定を実現するためには、発光状態を任意に制御することができる色素分子が必要であるが、そのためにしばしばフ

Fig. 1. (color online). Schematic illustration of SNOM probe emanating optical near-field (a) and SNOM image of a single chain of poly(methyl methacrylate) (b).

Fig. 2. Schematic process of photo-activated localization microscopy. The left-hand side (a) indicates the fluorescence image of individual dye molecules. The right-hand side (b) indicates the reconstruction images, which shows the position of the dye molecules analyzed from the fluorescence image. The panel 7a is a superimposition of fluorescence images of individual dye molecules, which corresponds to a conventional fluorescence image. The panel 7b indicates the super-resolution image.

フトクロミック性色素が用いられる⁷⁾。フトクロミック色素は二つの異性体を持ち、一方は蛍光性、他方は非蛍光性である。異性体間の変換は紫外光の照射によって行われ、まず最初に全ての分子を非蛍光体に変換し、蛍光画像内に色素分子が観察されない状態とする (Fig. 2 中 1 (a))。ここに弱い紫外光を照射することで、色素分子のうち一個だけが蛍光体へと変換され、Fig. 2 中 2 (a) のように蛍光画像として観察される。その画像から色素分子の位置を解析し、その座標を再構築画像中に記録する (Fig. 2 中 2 (b))。一度観察した分子は、強い励起光で褪色あるいは再び非蛍光体へ変換することで消去する。その後、再び紫外光を照射することで別の分子を観察・座標解析を行う (Fig. 2 中 3 (a), (b))。このようなプロセスを繰り返すことで、最終的には Fig. 2 の 7 (b) のような高分解能の蛍光画像を得ることが可能となる。このような手法は PALM (Photo-Activated Localization Microscopy) あるいは STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) と呼ばれ^{8,9)}、特に生物分野での応用が盛んに研究されているが、近年では単一高分子鎖の形態観察への展開も行われている¹⁰⁾。

2.3 単一分子の三次元配向イメージング

単一分子観察において得られるのは、分子の位置情報であった。しかし観察法を工夫することで、個々の分子の三次元配向すなわち極角 θ と方位角 φ (Fig. 3 (a)) を得ることもできる。分子一個の配向状態は蛍光強度の角度依存性から見積もることができるが、放射角分布は顕微鏡測定において焦点位置をシフトさせることで容易に計測することができる¹¹⁾。Fig. 3 (b) は単一のペリレンジイミド分子の蛍光顕微鏡画像であり、回折限界程度の大きさ 200 nm の円形に観察されている。これは焦点の合った状態の画像であるが、この状態から顕微鏡対物レンズを 1 μm シフトさせて撮影した蛍光画像が Fig. 3 (c) である。このようにデフォーカス条件で観察された分子は配向角に依存した特有のパターンを示しているこ

Fig. 3. (color online). Coordinate system of single molecule (a), the fluorescence microscope images of a single perylene diimide dye molecule in the in-focus (b) and out-of-focus conditions (c), and the calculated defocus pattern (d). The red arrow in the panel (a) indicates the transition moment.

とがわかる。このデフォーカスパターンは理論計算によって生成することができ、実験データに対してフィッティングを行うことで分子の三次元配向パラメータ (θ , ϕ) を見積もることができる。これにより高分子鎖のコンホメーションだけでなく、単一のセグメントの配向状態を計測できるようになった¹²⁾。このように近年のナノ光学イメージング技術の発展により、高分解能かつ分子配向の直接計測などこれまでにない情報が得られるようになっている。

3. 単一高分子鎖のコンホメーション解析

3.1 薄膜中の高分子鎖

薄膜中における高分子鎖は、空気と接する表面とガラス基板との二つの界面の間で空間的拘束を受けている。このような鎖のコンホメーションについては、これまでも中性子散乱などによって研究されてきたが、その実体は十分に明らかにはなっていなかった。そこで高分解能の光学イメージングによる実像観察によって直接的に薄膜中のコンホメーション評価を行う試みがなされた⁵⁾。

PMMA を試料として用い、分子鎖の回転半径よりも十分に小さい超薄膜から三次元バルクとみなせる厚膜の試料を作製し、その中での PMMA 鎖一本の形態を直接評価した。SNOM による観察を行うため、PMMA の側鎖メチル基の約 0.8% を蛍光色素であるペリレンによって置換した高分子を合成した ($M_n = 4.16 \times 10^6$, PDI = 1.23)。これを蛍光ラベルを施していない PMMA に極微量混合し、スピんキャスト法により膜厚 7–100 nm の薄膜試料を作製した。また鎖が二次元状態で広がった系として Langmuir-Blodgett 法による単分子膜を作製した。

SNOM 測定により、Fig. 2 (b) に示すような個々の PMMA 鎖のコンホメーションが観察されるが、定量的に鎖の拡がりを評価するため、SNOM によって観察された個々の鎖について、次式で定義される鎖の拡がり R_{xy}^2 を見積もった。

$$R_{xy}^2 = \frac{\sum I_i (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_{cm})^2}{\sum I_i}$$

$$\mathbf{r}_{cm} = \frac{\sum I_i \mathbf{r}_i}{\sum I_i}$$

ここで $\mathbf{r}_i$, I_i はそれぞれ SNOM 像中 i 番目の画素の位置ベクトルおよび蛍光強度であり、 $\mathbf{r}_{cm}$ は重心の位置ベクトルを表している。このようにして見積もられる R_{xy}^2 は、高分子鎖の薄膜平面上への射影についての回転二乗半径に相当する。様々な膜厚の試料に対して鎖一本一本の回転半径を算出した結果を Fig. 4 のヒストグラムに示す。SNOM によって個々の PMMA 鎖を直接観察するこ

Fig. 4. Histograms of the chain dimension of the PMMA chain in thin films.

とで、鎖の拡がりの分布関数を直接的に得ることが可能である。ここでは膜厚 15, 50, 80 nm についての R_{xy} を示しているが、この図から PMMA 鎖の R_{xy} の分布関数の形状は膜厚に依存しておらず、その平均値 $\langle R_{xy} \rangle$ は約 140 nm で一定であることがわかった。さらに鎖が二次元に束縛された単分子膜についても同様に測定を行ったところ、 $\langle R_{xy} \rangle$ は 139 nm であった。このように膜厚が鎖の非摂動状態でのサイズと同程度以下の超薄膜領域において $\langle R_{xy} \rangle$ が膜厚に依存しないことが示された。そこで鎖の拡がりに対して十分に膜厚が大きく、バルク状態と見なすことが可能な試料について同様の測定を行ったところ、その拡がりには 138 nm と見積もられ、超薄膜状態と比較してもほぼ同程度の R_{xy} を示すことがわかった。この結果、高分子鎖はバルク状態から高さ方向の空間的制限を受けた超薄膜状態になっても、Fig. 5 に示すように薄膜面内方向の拡がりを変化しないことが明らかとなった。バルク状態では高分子鎖は三次元的に拡がったコンホメーションをとっており、周囲の鎖との絡み合いを形成している。高さ方向の拘束下においても高分子鎖が水平方向に拡がらないということは、鎖が収縮した形態をとることを意味しており、Fig. 5 (b) に示されるように超薄膜中において高分子鎖は他の鎖との絡み合いを形成しないものと考えられる。これは de Gennes によって予測された二次元平面における高分子鎖のコンホメーションの描像を支持するものであり¹⁾、このようなモデルによって薄膜の巨視的な物性もうまく説明することができる^{13, 14)}。このように SNOM を用いて高分子鎖一本一本を直接観察することで、超薄膜中における特徴的な分子鎖の形態が明らかとなった。

Fig. 5. Schematic illustration of the conformation of polymer chains in a three-dimensional bulk state (a) and an ultra-thin film (b).

3.2 ミクロ相分離構造内の高分子鎖

ブロック共重合体が見出すミクロ相分離構造中における高分子鎖も、薄膜と同様に空間的に自由度を制限された状態にあると考えることができる。ミクロ相分離構造中の鎖のコンホメーションについてはこれまでに理論的、実験的に精力的に研究が行われてきたが、そのコンホメーションを実空間において評価した例はない。本節では、A-B 型ブロック共重合体のミクロ相分離構造中に分散した A ホモポリマーについて、その形態を評価した研究について述べる¹⁵⁾。

試料としてポリスチレン (PS) および PMMA のブロック共重合体 (PS-PMMA) を用い、ここに極微量の PMMA ホモポリマー鎖を混合し、溶媒キャストの後に十分にアニーリングすることでミクロ相分離構造を形成した。PS-PMMA のそれぞれの成分の分子量は $M_{n,PS} = 8.68 \times 10^5$, $M_{n,PMMA} = 8.57 \times 10^5$ とほぼ同じであり、ラメラ型のミクロ相分離構造を示した。この系中に蛍光ラベルを施した分子量 1.7×10^6 の PMMA ホモポリマーを分散し、その単一分子鎖を SNOM によって観察することで、ミクロ相分離構造内における位置と配向を評価した。

Fig. 6 に PS-PMMA の SNOM 像を示す。Fig. 6 (a) は励起光の散乱強度をマッピングすることで得られた SNOM 像であり、PS-PMMA のラメラ状ミクロ相分離構造が観察され、その周期は 160 nm であることがわかった。図中の明暗の領域はそれぞれ PMMA および PS ドメインに相当する。Fig. 6 (b) は同時に得られたペリレン蛍光像であり、ミクロ相分離ドメイン内に分散した単一の PMMA ホモポリマーが観測されている。両者の画像を比較すると、PMMA ホモポリマーは PS-PMMA 相分離構造の PMMA ドメイン内に存在していることがわかる。より詳細な解析を行うために個々の鎖について得られた SNOM 画像を楕円によって近似し (**Fig. 7** (a)),

Fig. 6. (color online). SNOM images of the micro-phase separation structure of PS-PMMA containing small amount of homo-PMMA. The panel (a) was acquired by collecting the scattered light. The bright and dark parts indicate the PMMA and PS domains, respectively. The panel (b) is the fluorescence image, where the single chain of homo-PMMA was selectively observed.

Fig. 7. Schematic drawing of the homo-PMMA chain doped in the micro-phase separation structure of PS-PMMA (a) and the plot of the conformational orientation against the chain position (b). The position x is defined as the distance between the center of mass (CM) of the chain and the middle of the PMMA domain. The chain orientation θ indicates the angle between the normal of the phase boundary and the long axis of the fitted ellipse for the homopolymer chain.

その重心位置および相分離界面に対する鎖の配向角 θ を見積もった。ミクロ相分離構造内における PMMA ホモポリマーの重心位置を詳細に検討したところ、PMMA ホモポリマー鎖のほぼ全てが PMMA ドメイン内に局在しており、特にドメイン中央部に偏在していることが明らかとなった。次に相分離界面に対するホモポリマー鎖の配向を評価するため、Fig. 7 (b) に PMMA ドメイン中心からホモ PMMA 鎖までの距離 x と配向角 θ の関係を示す。この図から PMMA ドメイン中央に位置する PMMA ホモポリマー鎖は相分離界面に対して平行な配向を示す傾向があることがわかった。

A-B ブロック共重合体/A-ホモポリマー混合系の相分離構造内におけるホモポリマー鎖の分布はブロック共重

合体中の A 鎖および A ホモポリマーの分子量に依存することが知られており、ホモポリマーの分子量がブロック鎖よりも大きな場合、A ホモポリマーが A ドメインから排斥されることが知られている。ここで用いた PMMA ホモポリマーはブロック鎖に対して二倍の分子量を持つため、ラメラ PMMA ドメインから排除され中央に偏在する。その結果、ドメイン界面に対して平行に伸張したコンホメーションをとるものと考えられる。一方、相分離界面近傍に存在するホモポリマー鎖も少数ながら存在するが、このような鎖は界面に対して垂直に伸張したコンホメーションをとることが明らかとなった。ブロック共重合体鎖は相分離界面に対して垂直に伸張した形態をとっていることが知られているが、界面近傍において PMMA ホモポリマー鎖はブロック共重合体鎖の影響を受けて界面垂直方向に配向するものと考えられる。またホモポリマーだけでなくブロック鎖のコンホメーションの直接観察も行われている^{16,17)}。このように個々の鎖を直接観察することにより、ミクロ相分離構造中に拘束された高分子鎖の形態について詳細な情報を得ることが可能となった。

4. ま と め

回折限界を超える新しい光学イメージングによる単一分子蛍光観察法が開発され、表面・界面での高分子鎖のコンホメーションを直接的に評価することができるようになった。このような実空間観察法に時間軸を加えることで、高分子鎖の運動の様子を直接とらえることも可能になっている^{18,19)}。これまでに確立された分光法や散乱法にあわせて、このような高分解能光学イメージングによる単一高分子鎖の実空間観察が加わることで高分子のすがたをより鮮明に描き出すことが可能になるものと期待される。ここで紹介した SNOM や PALM だけでなく構造化照明や誘導放出過程を利用した手法も提案されており、超高解像の光学イメージング法は高分子界面の物性研究において大きな役割を果たすものと考えられる。

文 献

- 1) P.G. de Gennes : "Scaling Concepts in Polymer Physics" (Cornell University Press, Ithaca, New York, 1979).
- 2) M. Doi and S.F. Edwards : "The Theory of Polymer Dynamics" (Clarendon, Oxford, 1986).
- 3) E. Betzig and J.K. Trautman : Science **257**, 189 (1992).
- 4) M. Ohtsu (Ed.) : "Near-field Nano/Atom Optics and Technology" (Springer, Tokyo, 1998).
- 5) H. Aoki, S. Morita, S. Sekine and S. Ito : Polym. J. **40**, 274 (2008).
- 6) A. Yildiz, J.N. Forkey, S.A. McKinney, T. Ha, Y.E. Goldman and P.R. Selvin : Science **300**, 2061 (2003).
- 7) T.J. Gould, V.V. Verkhusha and S.T. Hess : Nat. Protocols **4**, 291 (2009).
- 8) E. Betzig, G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacio, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz and H.F. Hess : Science **313**, 1642 (2006).
- 9) M.J. Rust, M. Bates and X. Zhuang : Nat. Methods **3**, 793 (2006).
- 10) H. Aoki, K. Mori and S. Ito : Polym. Prepr. Jpn. **59**, 4447 (2010).
- 11) M. Bohmer and J. Enderlein : J. Opt. Soc. Am. B Opt. Phys. **20**, 554 (2003).
- 12) H. Aoki, T. Takahashi and S. Ito : Polym. J. **43**, 218 (2011).
- 13) N. Sato, S. Ito and M. Yamamoto : Macromolecules **31**, 2673 (1998).
- 14) L. Si, M.V. Massa, K. Dalnoki-Veress, H.R. Brown and R.A.L. Jones : Phys. Rev. Lett. **94**, 127801 (2005).
- 15) J. Yang, R. Sekine, H. Aoki and S. Ito : Macromolecules **40**, 7573 (2007).
- 16) R. Sekine, H. Aoki and S. Ito : J. Phys. Chem. B **113**, 7095 (2009).
- 17) Y. Tamai, R. Sekine, H. Aoki and S. Ito : Macromolecules **42**, 4224 (2009).
- 18) T. Ube, H. Aoki, S. Ito, J. Horinaka, T. Takigawa and T. Masuda : Polymer **50**, 3016 (2009).
- 19) T. Ube, H. Aoki, S. Ito, J. Horinaka, T. Takigawa and T. Masuda : Macromolecules **44**, 4445 (2011).