



Title	蛍光検出による無極性液滴中の単一分子ダイナミクスに関する研究
Author(s)	安田, 雅一
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59103
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【78】

氏 名	安 田 雅 一
博士の専攻分野の名称	博 士（理学）
学 位 記 番 号	第 2 5 2 6 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 24 年 3 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 基礎工学研究科物質創成専攻
学 位 論 文 名	蛍光検出による無極性液滴中の単一分子ダイナミクスに関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 宮 坂 博 (副査) 教 授 戸 部 義 人 教 授 芦 田 昌 明

論 文 内 容 の 要 旨

1989年にMoernerやKadorによる先駆的な研究がなされて以降、凝縮相の単一ゲスト分子の分光技術は飛躍的に進化

してきた。単一分子分光の意義として、時間原点においてパルス光照射によって非平衡状態を生成しその緩和過程の計測を行う事を基本とする従来の時間分解分光測定では困難な課題、例えば熱平衡点近傍における分子揺らぎに基づくダイナミクスや反応メカニズムを理解する上で有効であることが挙げられる。特に、溶液中における構造揺らぎを機能発現に有効に利用している生体高分子などでは、単一分子レベルの発光計測手法である蛍光相関分光法が古くから用いられてきた。近年では、SauerあるいはSchulerらにより、光子の到達時間差のヒストグラム解析に基づき高分子や生体分子のダイナミクスを研究した例も報告されている。いずれの手法も、観測領域内に存在する分子数が1以下となるような非常に希薄な溶液を観測対象とし、観測領域内を通過した分子の発光のみを検出する手法である為、光子の検出効率が低く、解析を行う上で十分な光子数を取得するにあたって時間を要するという課題があった。

検出効率の向上については、液滴を利用して分子の並進拡散挙動をその範囲内に固定化することで測定時間の短縮化を図る手法が提案されており、液滴の固定化や分子の内包効率の向上への試みもなされている。しかしながら、これら多くの試みは、研究目的が生体分子を対象としたものであるため水系の液滴に限定されており、非水系の液滴を使用した報告例ほとんどないのが現状である。また、界面が生体分子の運動に与える影響を低減するために、数 μm 以上の大きな液滴を観測対象とするのが一般的であった。

一方、非水系液体を含む微小液体ではマイクロ化学反応場として広く用いられるとともに、その物性評価についても研究がなされてきた。このような場においては一般的に界面の影響が大きくなることが知られており、バルク溶液とは異なる分子ダイナミクスを示すと考えられる。また、使用できる溶媒の種類が多く、分子ダイナミクスに対する溶媒効果に関して新たな知見の取得が期待できる。さらに、特に無極性溶媒においては、光イオン化状態の寿命が数ピコ秒以内と非常に短いため光イオン化に起因する蛍光の明滅現象を抑制できることも期待できる。

以上の観点から、本研究では①パルスレーザーおよびステージ操作型共焦点顕微鏡を組み合わせた高精度・長時間分解を有する単一分子蛍光検出系の製作と評価、および②液滴の固定化手法検討と無極性液滴中における分子ダイナミクスの研究を行った。

以下、本論文の各章を総括する。

第1章では単一分子分光の歴史と現状、本研究の背景や意義、目的について述べた。

第2章では単一分子計測システムの構築、取得したデータ解析用プログラムの作製およびそれらの評価を行った。パルスレーザーと共焦点型顕微鏡、高感度検出器を組み合わせ、微小領域における分子ダイナミクスを高い空間分解能と時間分解能により測定可能にするシステムの構築について詳細を示した。また、新規に開発された解析用プログラムを用いて、イメージング、蛍光強度の時間変化、蛍光寿命、コインシデンス、蛍光相関関数に関する情報取得を行い、その評価から、実際の測定に十分応用可能であることを示した。これらの測定システムを、色素分子を分散させたポリマー薄膜系の測定に応用し、その結果に対して開発した解析ソフトウェアを用いて評価を行い、本研究で開発した測定システム、解析ソフトウェアが、単一分子レベルの発光特性を評価できることを確認した。

第3章では分子の運動を観測領域内に固定しうる新規手法としてゲスト分子を内包させた液滴をゲル中に固定化させる手法の詳細を検討した。試料作製条件の詳細検討および評価を行い、本手法により液滴中単一分子の計測が可能であることを示した。

第4章では、液滴中単一分子からの発光を検出するにあたって、①励起レーザー光による光退色がおこりにくく、②励起波長における分子吸収係数が大きい、さらに③発光量子収率が高く、④蛍光寿命が数ナノ秒程度である分子として、PDI分子を選択し、微小油滴中PDI分子の発光挙動について検討を行った。

まず、トルエン液滴系の光学透過像および単一分子からの蛍光観測から、試料作製中における溶媒の蒸発およびそれに起因するPDI分子の凝集について明らかにし、微小油滴系の作製に最適な溶媒に関する知見を得た。

次に、沸点が高く、かつトルエンより揮発性が低いオクタン液滴系を用いて、液滴中PDI分子の発光挙動を観測した。半数以上の液滴が凝集体と同様の発光挙動を示した結果から、PDI分子のオクタンに対する溶解性に注目し、凝集を抑制する手法とし、オクタン液滴に内包する上で最適な構造を有するゲスト分子に関する知見を得た。

第5章では本章では前章で得られた知見をもとにして、PDIのペリレン骨格部に立体障害の大きい*tert*-butylphenoxy基を、イミドの窒素原子にプロピル基を導入したBP-PDIをゲスト分子として選択し、オクタン液滴中BP-PDI分子の発光挙動について検討を行った。まず、蛍光強度の時間変化測定を行い、その発光挙動が①段階的な光退色、②スパイク状の強度変化、③指数関数的な発光強度減少、の3つに大別できることを明らかにした。次に、液滴中およびPMMA中に固定化されたBP-PDI分子の比較を行い、非極性溶媒であるオクタン液滴にすることで、光イオン化に起因する蛍光の明滅現象を抑制できることを示した。さらに広視野蛍光像、蛍光強度あるいは蛍光偏光度の時間変化測定結果から、界面に対する分子の吸着方向が発光挙動に与える影響について知見を得た。最後に、サイズの異なる液滴と溶液について蛍光強度の自己相関関数による解析を行い、液滴内における分子ダイナミクスについて、①界面からの影響を受けずに拡散する場合と、②分子吸着といった界面と分子の相互作用が強く影響を受ける場合の時間スケールに関する知見を得た。

論文審査の結果の要旨

本論文は単一分子蛍光検出計測による微小液体中における界面吸脱着を含む分子ダイナミクスに関する研究結果について述べたものである。

まず、パルスレーザーと共焦点型顕微鏡、高感度検出器を組み合わせ構築した単一分子蛍光計測システムに対して、蛍光イメージング、蛍光強度の時間変化、蛍光寿命、コインシデンス、蛍光相関関数の測定結果を評価し、回折限界程度の空間分解能を保ったまま、サブナノ秒から数十秒以上の時間領域の分子ダイナミクスの測定に十分応用可能であることを示した。次に蛍光色素分子の選択、また液滴を観測領域内に固定する手法を探索し、蛍光分子を内包する液滴を信頼性高く作成する方法を確立している。これらの手法に基づき作成された試料を対象に、 200 nm ～数 μm 径の無極性液滴の発光挙動を測定解析し、通常の高分子固体等に固定化した蛍光分子で頻繁に観測される蛍光明滅現象が、無極性溶媒中では著しく抑制されることを見出し、蛍光の減状態生成に関わる光イオン化状態の寿命が、無極性溶媒中では数ピコ秒以内と非常に短いことが原因であることを示した。また蛍光の偏光・強度の時間変化、蛍光イメージング画像から蛍光色素の液滴界面への吸脱着過程を検出し、その解析から界面吸脱着の時間スケールには、数ミリ秒程度の短い過程と約 50 ms から数秒以上の比較的長い間吸着状態が継続する二つの過程に大別できることを示した。これらの蛍光明滅現象、吸脱着に伴う蛍光偏光、強度の変化の液滴の径に対する依存性を詳細に検討し、明滅現象に対する界面の寄与を明らかにしている。

以上の結果は、非水溶媒を用いた微小液滴中の溶質分子のダイナミクス測定と解析に対して有益な手法を示すとともに、一般の有機溶媒中における溶質分子の平衡点近傍のスローダイナミクス、マイクロ化学反応場や分析場として微小液滴を用いた研究領域にも重要な知見を与えており、博士(理学)の学位論文として価値のあるものと認める。