

4P059

温度可変マルチタスク単一分子蛍光分光装置の開発

(静大理¹, 静大院理²) ○三井正明¹, 福井洋樹², 河野祐也², 高橋良弥²

【序】 単一分子蛍光分光 (SMFS) 法は, 従来の集団平均測定では捉えられない1個1個の分子の挙動をサブナノ秒から秒オーダーに至る幅広い時間スケールで観測することができる。そのキネティクスには, 分子自身あるいはその局所周辺環境 (マトリクス) の構造不均一性や構造揺らぎの影響が明確に反映されるため, SMFS 法は不均一性が高く複雑な系の分子科学の解明に有効である。このような静的・動的不均一性を明らかにできる SMFS 法において測定試料の温度制御を行うことは, マトリクスの状態 (phase) の制御や反応ダイナミクスに対する揺らぎの効果の解明などの点から重要である。しかし, これまでの SMFS 研究では室温あるいは極低温条件下のみで測定が行われることがほとんどで, 1分子挙動の温度依存性を明らかにした報告例は未だ少ない [1-4]。そこで本研究では, 簡便に試料基板の温度制御ができる試料基板ホルダーを作製し, それを自作のレーザー走査型顕微蛍光分光装置と組み合わせた温度可変マルチタスク SMFS 装置を新たに開発したので報告する。

【装置開発と測定例】 レーザー走査型顕微蛍光分光装置: 励起光源には 441 nm ピコ秒ダイオードレーザー (パルス幅 70 ps, 繰り返し 10 MHz) を用いており, 直線偏光あるいは円偏光で無限補正油浸対物レンズ (100×, NA = 1.4) に入射し, 回折限界 (スポット径 ca.200 nm) まで集光して試料に照射する。試料からの蛍光は同一の対物レンズで捕集し, フィルター等を透過させ最終的に液体窒素冷却 CCD 分光器と 2 台の単一光子検出器 (APD) で検出するシステムとした。レーザースポットの 2 次元走査と APD による光子積算を同期させるプログラムを自作し, 基板上的任意の範囲の蛍光イメージを取得できるようにした。さらにイメージ取得後, レーザースポットを ±1 nm 程度の位置再現性で任意の 1 分子の位置に固定し, レーザー光を照射し続けることで 1 分子の蛍光強度, 蛍光寿命, 蛍光スペクトルの時間変化の並列測定や蛍光偏光変調測定, 光子相関測定, 光子コインシデンス測定といったマル

チタスク計測を行えるシステムを構築した。この装置を用いて 1 分子計測を行った例として, Zeonex 高分子薄膜中に分散された 9,10-ビス(フェニルエチニル)アントラセン (BPEA) の結果を模式的にまとめたものを図 1 に示した。

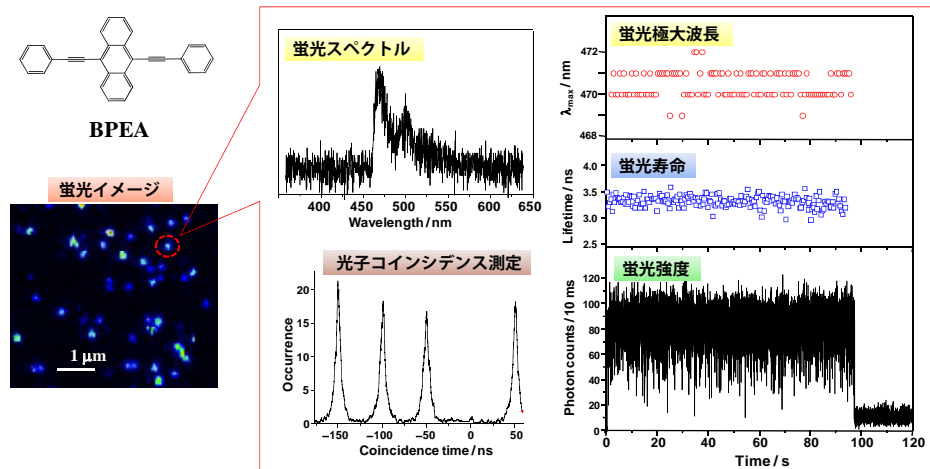


図 1. 自作したレーザー走査型顕微蛍光分光装置による Zeonex 高分子薄膜中の BPEA 1 分子のマルチタスク SMFS 計測の例

温度可変試料基板ホルダー: 開発した温度可変試料基板ホルダーの概略を図 2a に示す[5]。試料基板ホルダー内部は排気することができ、またホルダー下面から銅パイプを挿入することでホルダー内部に雰囲気ガスや温度制御用ガスを導入できる。ホルダー上面の O-リング上に試料基板であるカバーガラスあるいはカバーガラスセルを設置し、大気側から油浸対物レンズによって集光した励起光を真空側にある試料面上に照射する。ホルダー内部の排気にはロータリーポンプとメカニカルブースターポンプを組み合わせた排気系（排気速度 1,000 L/min）を用いた。ホルダー内部を排気すると大気圧との差圧によって基板は O-リングに強く押しつけられ固定される。このときのカバーガラスの変形を抑制するため、O-リング溝よりも内側の部分とカバーガラスの間にスペーサーを設置した。本システムでは、液体窒素によって冷却あるいはヒーターによって加熱された高純度アルゴンガスを、流量調整しながら試料基板に吹き付けることで基板温度を制御するという方式を採用した。カバーガラスに対物レンズを作動距離まで近づけた SMFS 測定時の状態とし、冷却アルゴンガスの流量を次第に増加させた。このとき基板温度はホルダー内圧の上昇にもなってほぼ線形に低下し、ホルダー内圧 25 Pa で基板温度が -40°C まで低下することを確認した。

この基板ホルダーを利用した測定例として、ペリレンジイミド誘導体 (DMP-PDI, 図 2b) と γ -シクロデキストリン (γ CD) の包接錯体に対する予備的な SMFS 測定の結果を図 2c-f に示す。室温 (20°C) における蛍光イメージ (図 2c) には、DMP-PDI/ γ CD 錯体が水溶液中を拡散していることを示す位置再現性のない輝線が観測された。そこでこの試料を -12°C まで冷却し、水溶液を凍らせて測定した蛍光イメージが図 2d である。錯体の拡散が抑制されたため、円形状の輝点が再現性よく同じ位置に観測された。これにより錯体 1 分子に励起光を照射し続けることが可能になり、図 2e, f に示すように氷中の錯体 1 分子の蛍光スペクトルや蛍光強度の時間変化を計測することに初めて成功した。DMP-PDI/ γ CD 錯体 1 分子の蛍光スペクトル (図 2e 下段) は、氷中のアンサンブル測定 (図 2 上段) から得たものと比較的良好一致しており、また蛍光強度の時間変化

(図 2f) では、ブリンキング現象が観測された。このブリンキング挙動を解析すれば、包接錯体の反応ダイナミクスに対する構造揺らぎの効果を明らかにできるものと期待される。

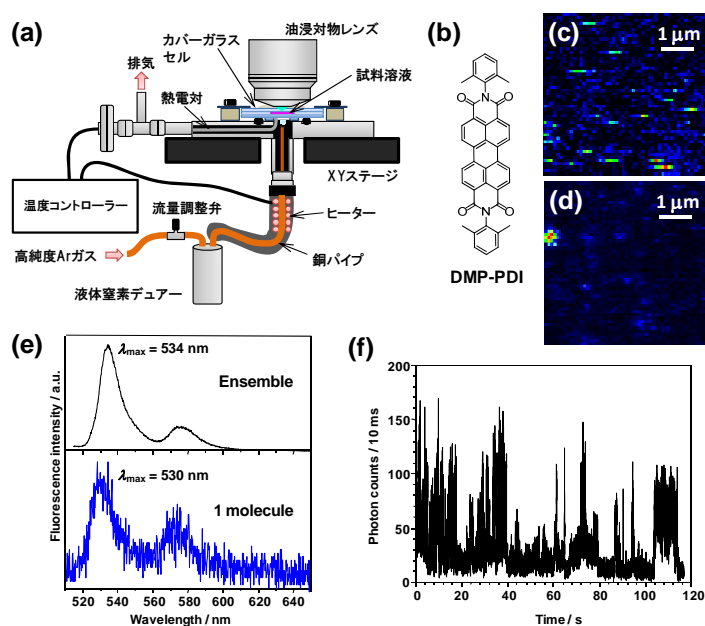


図 2. (a) 温度可変試料基板ホルダーの概略, (b) DMP-PDI の構造, (c) 20°C および (d) -12°C で測定した蛍光イメージ, (e) 氷中における DMP-PDI/ γ CD 錯体のアンサンブルおよび 1 分子の蛍光スペクトル, (f) 氷中における DMP-PDI/ γ CD 錯体の蛍光強度の時間変化の一例

【参考文献】[1] R. Zondervan, F. Kuzler, G. C. G. Berkhout, M. Orrit, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 12628 (2007). [2] H. Oikawa, S. Fujiyoshi, T. Dewa, M. Nango, M. Matsushita, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4580 (2008). [3] D. Sluss, C. Bingham, M. Burr, E. D. Bott, E. A. Riley, P. J. Reid, *J. Mater. Chem.* **19**, 7561 (2009). [4] J. R. Siekierzycka, C. Hippus, F. Würthner, R. M. Williams, and A. M. Brouwer, *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 1240 (2010). [5] 三井正明 他, 分光研究 **60**(4), (2011).