

学位論文題名

Studies on Single Molecule Diffusion in Confined Space

(微小空間における単一分子拡散に関する研究)

学位論文内容の要旨

ナノメートルスケールの微小空間においては、巨視的空間とは異なる特異的な分子運動性が発現する。微小構造を用いてこの分子運動性を積極的に制御することで、単一分子レベルでの精巧な分子の輸送および動的機能発現が期待される。近年、ナノメートルスケールの構造体間隙において分子と構造体の直接的相互作用により生じる、分子の配向変化・変形を利用した分子分別機構が提案されている。一方、微小間隙における分子同士の集団的相互作用を利用することで、全く新しい分子運動性制御手法の確立が期待される。本研究は、金属構造体の微小間隙(ナノゲート)における分子間相互作用を利用した、新規分子分別手法の確立およびその単分子レベルでの評価を目的とした。

第二章においては微小なポリスチレンラテックスビーズの単層最密充填構造を鋳型として金属を蒸着し、三角形微粒子規則配列構造を多数同時に作製するナノスフィアリソグラフィ(Nanosphere lithography; NSL)法に着目し、金属ナノゲート配列構造の大面积化を試みた(図 1 (a) (b))。その結果、気液界面にビーズを配列させることにより、従来数十 $\mu\text{m}^2$ 程度であった欠陥のない構造を数 $\text{mm}^2$ にまで拡大した。さらに、得られた Ag 構造に対し KCl 水溶液中にて電場印加と光照射を同時に行うことにより、ナノメートルスケールでの多数同時構造制御に成功した。

第三章においては NSL 法を用いてして作製された Ag ゲート単位構造の光学特性制御を検討した。発光強度の時間変化が単一蛍光分子特有の一定の蛍光強度の維持および突発的な消光を示したことから、この発光は銀微粒子上に形成された原子数個からなる蛍光性銀クラスターに由来することが示唆された。発光スペクトルにおいて、銀微粒子のプラズモン共鳴による吸収帯付近に強い発光が観察されたことから、Ag ゲート単位構造の光学特性制御によって単位構造表面の微視的 Ag クラスターの発光特性が積極的に制御可能であることが示された。これらの結果により、光照射による Ag 構造制御において、印可されるエネルギーならびに構造変化がより敏感に検出されることが示された。

第四章では以上の手法により構造及び光学特性を制御された金属ナノゲート構造存在下において、分子の二次元的拡散挙動を制御および評価した。本研究では分子拡散の場として脂質二分子膜を用いた。脂質二分子膜は水溶液中において固体基板上を自発的に展開す

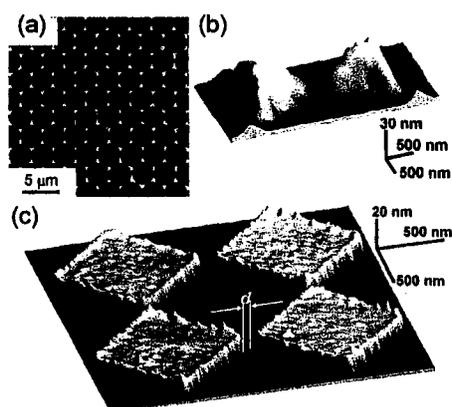


図 1 (a) (b) NSL 法 および (c) EBL 法により作製されたナノゲート構造の原子間力顕微鏡像。

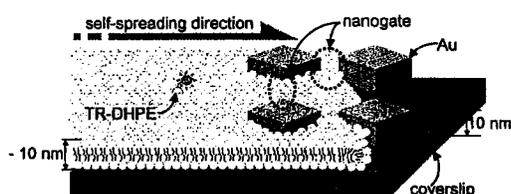


図 2. 金属ナノゲート構造を通過する脂質二分子膜の模式図。

ることが知られている。この挙動を、電荷に依存しない分子輸送の駆動力として利用可能である。NSL 法によりナノゲート構造を作製した基板の上に、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  水溶液中において Egg-yolk phosphatidylcholine (Egg PC)の脂質二分子膜を自発展開させた。この膜内に添加さ

れた単一の蛍光標識脂質分子 Texas Red 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (TR-DHPE)の拡散挙動について、全反射顕微鏡 (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy; TIRFM)を用いて観察を行った(図 2)。個々の分子の軌跡から、TR-DHPE 分子はナノゲートを通るホップ拡散に従うことが明らかとなった。得られた分子の軌跡について平均二乗変位 (mean square displacement; MSD)を用いて数値解析を行った。その結果、ナノゲート構造不在下においてはランダムなブラウン拡散に従った分子運動が、

ナノゲート構造存在下においては阻害されることが示唆された。MSD の値より算出された見かけの拡散係数の時間変化より、銀微粒子に囲まれた円形領域における分子の平均滞在時間を算出した。さらに、見積もられた平均滞在時間から分子拡散に対する実効的なゲート幅を算出した結果、走査型電子顕微鏡像における値と良い一致を示した。本結果は、分子の二次元的なホップ拡散に対しサブミクロン領域にて人為的な制御を実現した数少ない例であり、本研究での構造形成手法の優位性を示すものである。

第五章では、より小さいゲートサイズにおける単一分子の局所運動性の検討を目的に、構造体の形状およびサイズを自在に制御可能な電子線リソグラフィ (electron beam lithography; EBL)法を用いてナノゲート構造を作製し(図 1 (c))、ゲートにおける分子運動性のより詳細な評価および積極的な制御を検討した。蛍光顕微鏡を用いて TR-DHPE を添加された DLPC 二分子膜内の蛍光強度分布より膜内 TR-DHPE 分子濃度を評価した結果、ナノゲート通過に伴う膜内 TR-DHPE 濃度の減少が示された。この TR-DHPE に対するフィルター効果は、ゲート幅の減少及び膜展開速度の増大に伴い顕著となった。一方、TIRFM を用いて観察された単一 TR-DHPE 分子の軌跡(図 3)について、MSD プロットを用いて拡散性評価を行ったところ、ナノゲート構造のない基板では拡散係数  $4 \mu\text{m}^2/\text{sec}$  のランダム拡散に従った分子運動が、幅 75, 100, 200 nm のナノゲート構造存在下においてはゲート幅に伴い減少した。さらに、二次元平均変位相関解析により自発展開方向においては膜先端部へ向かう異方的拡散が誘起されることが明らかとなった。この平均変位は膜自体の展開速度より予測される値よりも大きかったことから、膜の自発展開以外の分子輸送の駆動力がナノゲートに局所空間に存在することが示唆された。TR-DHPE 分子の平均変位はナノゲートの幅の減少に伴い減少したが、100 nm 未満のゲート幅において特に顕著な減少が見られた。この傾向は蛍光顕微鏡像より見積もられたフィルター効率と一致した。異方拡散性より、ナノゲートにおいて単一 TR-DHPE 分子に働くフィルター効果の駆動力を見積もった結果、 $10^{-16} \text{ N/molecule}$  のオーダーとなり、100 nm 以下のサイズ領域にあるナノゲートにおいては特定の分子に非常に大きな拡散抑制力が選択的に作用することが明らかとなった。この結果は、電場などの高い駆動エネルギーを与える外場を用いることなく、ナノ構造構築によって高い分子分別効果が実現可能となることを示している。

本研究においては、100 nm 未満のゲート幅に対して二桁程度小さい TR-DHPE 分子を高効率にて分別する系を構築した。さらに、この分別機構の詳細を単一分子の軌跡を用いて定量的に明らかとした。分別効率と単一分子レベルの分子運動性の相関を検討した結果、本分別現象がナノゲートにおける分子の局所的集団的相互作用による全く新しい機構に基づくことが示唆された。一般に固体表面、細胞膜などで発現する効率的な化学反応、エネルギー変換、物質認識・分別などの機能発現において、その二次元空間における局所的な特異性が重要な役割を果たすことが知られており、本研究で得られた知見はそれらの理解、制御への礎となる。

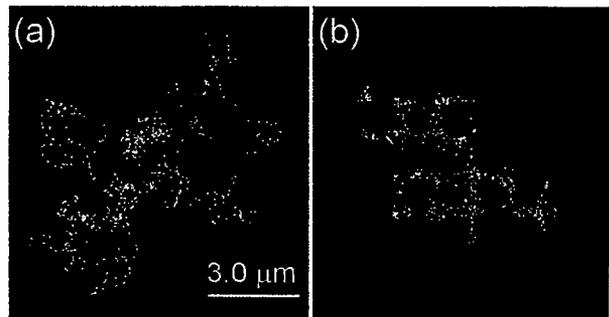


図 3. TIRFM 像において観察された単一 TR-DHPE 分子の軌跡: (a)ナノゲート構造なし (b)  $d = 200 \text{ nm}$  のナノゲート構造存在下。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 村 越 敬

副 査 教 授 喜 多 村 昇

副 査 教 授 石 森 浩 一 郎

副 査 教 授 金 城 政 孝 (生命科学学院)

学 位 論 文 題 名

## Studies on Single Molecule Diffusion in Confined Space

(微小空間における単一分子拡散に関する研究)

サブミクロンスケールの微小な構造体間隙においては、巨視的空間とは異なる特異的な分子運動性が発現する。このような微小場特有の分子運動を分子分別機構に応用することにより、分別デバイスの微小化および高効率・単一分子レベルでの分子分別が可能となると期待される。しかしながら、微小構造を用いた既存の分別機構はいずれも電場や圧力といった外場の印加を必要とし、また、構造体との直接的相互作用に基づいて分子を電荷またはサイズにより分別するものに限られていた。これに対し、申請者は学位論文において、微小間隙を有する固体基板上を自発的に成長する自発展開脂質二分子膜を分子輸送媒体として用いることにより、外場の印加を不要とするのみならず、微小間隙における膜構造変調に起因する局所的化学ポテンシャル勾配に基づいた新奇な分子分別機構の構築およびその単一分子レベルでの評価を行った。申請者ははじめに、ナノメートルスケールにて周期性および間隙幅が制御された微小間隙の自己組織的な作製および表面修飾を用いたその物性制御に成功した。作製した微小間隙基板上に自発展開脂質二分子膜を作製した結果、膜内に添加された異種分子の間隙透過性のみが選択的に減少し、本系にて分子分別効果が発現することが示唆された。

次に、申請者は全反射顕微鏡を用いた単一分子追跡により、この分別効果の機構明確化を検討した。実験としては、微小間隙を通過する自発展開膜内の単一色素標識分子を直接的に観察し、その軌跡を追跡した。得られた軌跡に対する平均二乗変位解析により、膜内分子のホップ拡散挙動が間隙幅に依存して制御可能であることが示された。また、分子拡散性に対する実効的な間隙幅の定量的評価に成功した。さらに、分子の軌跡より拡散係数および自発展開方位に対する分子移動速度を解析した結果、間隙において単一分子に作用する分別効果の駆動力を算出することに成功した。算出された駆動力は従来の静電場を用いた分子分別機構における値と同程度であり、外部擾動を用いない本系においても、局所的な分子運動制御に基づいた高い分別効率が発現可能であることが示された。

以上より、申請者は微小間隙における局所的な分子の集団的相互作用による新奇な分子分別機構を構築した。さらに、ナノメートルスケールの微小間隙存在下での脂質二分子膜内分子運動ダイナミクス評価により、本分別機構に作用する力学的因子の定量評価に成功した。本成果は、ナノメートルスケールにて制御された微小空間における単一分子追跡を行った初めての研究報告例であり、単一分子レベルでの精妙な分子操作法への応用可能性を提示するのみならず、固体表面や細胞膜等における局所エネルギー印加による化学反応、エネルギー変換、物質認識・分別などの発現に対する理解および制御への礎となる研究である。

よって申請者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。