



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	蛍光顕微鏡を用いた気液界面単分子膜の直接観察と膜質制御
Author(s)	下村, 政嗣
Citation	電子科学研究, 2, 9-15
Issue Date	1995-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/24300
Type	departmental bulletin paper
File Information	2_P9-15.pdf



蛍光顕微鏡を用いた気液界面単分子膜の 直接観察と膜質制御

分子認識素子研究分野 下村政嗣

気液界面単分子膜の直接観察と膜質の制御を行うために、蛍光顕微鏡を装着したフィルムバランスを作製した。単分子膜中での二次元結晶化の過程と結晶形態やサイズは、圧縮速度や温度に大きく依存する。とりわけパネルヒーターを用いて水面のみを加熱処理する方法は、対流などの影響が少なく均一な再結晶が可能となった。下水相に添加した高分子電解質と単分子膜とのポリイオンコンプレックスのモルフォロジーは高分子の化学構造に大きく依存する。ポリアクリル酸等の解離性高分子を用いると、pH による膜質制御が可能である。単分子膜の蛍光顕微鏡観察を用いたオプティカルイオンセンサーの設計例もあわせて紹介する。

1. はじめに

オレイン酸のような両親媒性化合物をベンゼンに溶かし水面上に滴下すると、さっと油膜が広がり溶媒が揮発した後に数ナノメートルの厚みを持つ薄膜が残る。この膜は気液界面単分子膜、あるいは Langmuir によって詳細な研究がなされたことから、Langmuir 膜 (L 膜) とも呼ばれている。また Langmuir とその弟子の Blodgett は、単分子膜を固体基板上に一層づつ移し取って多層膜を作製する技術を開発した。こうして累積した分子薄膜は Langmuir-Blodgett 膜、あるいはその頭文字を取って LB 膜と呼ばれている。LB 膜は、分子が二次元に配向した単分子膜を構成要素とし、膜厚や組成を任意にコントロールしながら分子レベルのフィルムを作製できる点で、分子素子やバイオ素子実現化の有力な素材として注目を集めている。望むべき構造と機能を持つ LB 膜を設計するためには、構成要素である単分子膜の評価が必要となる。従来、単分子膜や LB 膜の構造評価には電子顕微鏡による形態観察や電子線回折、赤外分光法、X 線回折など様々な手法が用いられてきた。しかし、その多くは固体基板に移し取った単分子膜や LB 膜を対象としたものであり、水面上の単分子膜を観察するには適しているとはいえない。気液界面の単分子膜を直接評価する方法が確立できれば、膜構造をその場で制御しながら LB 膜を作

製することが出来るにちがいない。そこで我々は、蛍光顕微鏡を用いた単分子膜の直接観察を行い、単分子膜の膜質制御の可能性を検討した。

2. 蛍光顕微鏡による単分子膜観察装置の作製

単分子膜のダイナミックな挙動を肉眼で直接観察できる点において、蛍光顕微鏡は魅力的な観察手法である。この手法は、1984 年にドイツとアメリカの生物物理の研究グループによってほぼ時を同じくして開発された方法である^[1]。蛍光イメージ観察用の装置は、落射型蛍光顕微鏡と単分子膜作製装置(フィルムバランス)からなり、その測定原理はきわめて簡単である。しかし、観察対象が水面上の厚みわずか数十オングストロームの薄膜であり、水の対流や空気の流れによる水面の攪乱の影響をうけるので、安定な蛍光イメージを得るためには様々な工夫が必要である。

我々は、小型のフィルムバランスを落射蛍光顕微鏡のステージに載せた顕微鏡固定型と、大型のフィルムバランスに顕微鏡鏡体を取り付けたフィルムバランス固定型の二つのタイプの蛍光顕微鏡観察装置を試作した。小型のフィルムバランスを市販の落射蛍光顕微鏡のステージを改良した X-Y-Z ステージ上に置き、空気流からの攪乱を受けないように全体をグローブボックスのなかに収めた。焦点あわせや、観察位置の移動は X-Y-Z ステージの外部からの操作により行った。

超薄膜絶縁体として電子デバイスに組み込もうとすれば、欠陥の無い均一な LB 膜の作製が要求される。用途によってはサイズの揃ったドメインが規則的に並んだ構造が必要になる場合もあるだろう。蛍光顕微鏡による単分子膜のその場観察法は、 π -A 曲線の解釈や結晶化等のダイナミックなプロセスの解明のみならず、顕微鏡で直接モニターしながら水面上単分子膜の構造を操作し膜質制御された LB 膜を作製することも可能とする。

単分子膜中における結晶ドメインの形成は、圧縮速度や温度などの物理的条件と、下水相の pH やイオン添加などの化学的条件に大きく依存する。たとえば、結晶核の形成を制御できればドメインサイズのコントロールが可能となる。単分子膜の圧縮速度は結晶核生成を支配する大きな要因である。図 2 はジオクタデシルジメチルアンモニウム塩の結晶ドメインサイズにおよぼす圧縮速度の効果を示したものである。一面おおよそ $73,500 \mu\text{m}^2$ の顕微鏡視野を場所むらのないように 24 画面抽出し簡単な二値化処理によって結晶ドメインの面積を求めた。150 mm \times 560 mm のフィルムバランスを用い 60 mm 2 /sec で圧縮した場合、平均サイズ 116 μm^2 の 445 個の結晶が観察された。50 μm^2 以下の小さなドメインの分布が目につく。一方、6 mm 2 /sec の圧縮では 257 個にまで減少し平均サイズは 234 μm^2 であった。ゆっくりと圧縮することで 1000 μm^2 を越える大きなドメインも形成される。しかしサイズ

分布はむしろ広がっている。これは水面上の温度や圧力にむらがあり結晶核形成が不均一に起こっているためだと考えられる^[4]。

既に我々は、単分子膜を熱処理にすることで二次元結晶のサイズが著しく大きくなることを明らかにした^[3]。化合物 2 の単分子膜の結晶は圧力が上昇すると互いを識別するのが困難なほど密に詰まる。一旦圧縮した後バリアーを戻して圧力を下げると、結晶相が数珠状に連なったパターンが見られ、さらに圧力を下げると結晶は消滅してしまう。小さな結晶をよせあつめただけでは大きな結晶にはならないことがわかる。ところが、20 $^{\circ}\text{C}$ で単分子膜を圧縮した後水槽全体を 40 $^{\circ}\text{C}$ まで加熱し、ふたたび冷却すると結晶のサイズは著しく大きくなる。この操作は水面上で単分子膜結晶の再結晶を行なったことになる。しかし、水槽全体を加熱する方法には問題点があった。我々が用いているフィルムバランスは、水槽の裏底にとりつけた蛇管を通して恒温水を循環し温度を制御している。その結果、加熱時には対流が起こり水面上には大きな温度分布が生じた。結晶成長は温度に大きく支配されるので、水槽全体を加熱する方法では結晶サイズに分布が生じてしまう。そこで、水面だけを均一に加熱する方式を採用することで対流の発生を抑えることにした^[2]。水面上に設置したパネルヒーターには熱処理のプロセスが観察できるように対物レンズ用の穴をあけた。水面の温度は、ヒーターにかかる電圧と水面からの距離に

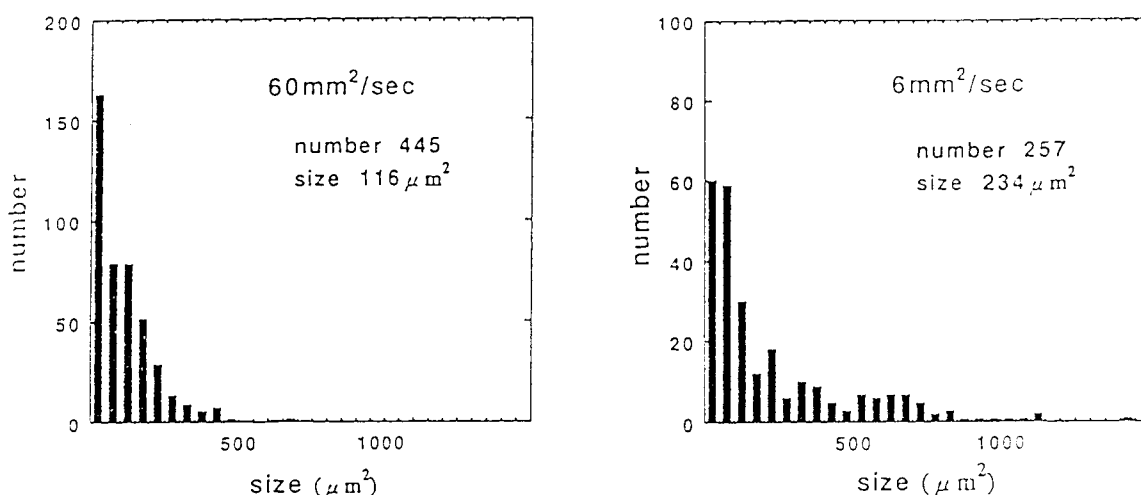


図 2 ジオクタデシルジメチルアンモニウム塩単分子膜の結晶ドメインサイズの圧縮速度依存性。

よってコントロールすることができた。水槽の温度を 20°C に設定し、圧力が 20 mN/m になるまで圧縮すると直径 2~3 ミクロンの結晶が形成される。この圧力を保つように圧力センサーからバリアーにフィードバックをかけながらパネルヒーターに電圧をかけると、5 分ほどの間に水面の温度は 42°C 付近まで上昇する。温度が上昇するにつれて結晶サイズは小さくなり 40°C を越えたあたりで結晶は消失し視野は均一に光る。ここでヒーターのスイッチを切ると急激に水面温度が下がりはじめ、35°C 付近から再び結晶が出現しはじめる。水面温度は 10 分ほどで 20°C に戻った。

一方、水相温度が 10°C の場合、単分子膜展開直後から不均一な核形成がおりサイズ分布の大きなドメインが得られたが、5 mN/m の定圧条件下で再結晶することでドメインのサイズ分布は均一になった。膜面全体を均一に熱処理することで、個々のドメインが持っている展開直後の履歴が除かれ熱力学的な平衡に近い状態で結晶化したものと考えられる。

下水相の pH やイオン強度の変化も単分子膜のドメイン化を支配する大きな要因である。下水相に溶存する物質との相互作用によってドメインの形態を著しく変えることも可能である。カリウムイオン選択性のイオノフォアであるバリノマイシンを含むジドデシルリン酸 3 単分子膜の π -A 曲線は NaCl 水溶液上と KCl 水溶液上ではかなり異なる。これはバリノマイシンとカリウムイオンが膜界面において特異的なホストゲスト相互作用をしているためだと考えられる。蛍光顕微鏡による形態観察にも下水相イオンの違いが見られた。NaCl の場合にはドメインのサイズも数も著しく減少するのに対し、KCl では小さなドメインが密にまつた蛍光像が得られた^[5]。

5. ポリイオンコンプレックス法によるドメイン形成制御^[6]

電荷を持った単分子膜を反対電荷の水溶性高分子を含む下水相上に展開すると、気液界面で高分子性のイオン対すなわちポリイオンコンプレックスを形成する。この方法は簡便な高分子性 LB 膜の作製法として、また高分子の配列制御法として注目されている。さらに高分子との相互作用を利用して単分子膜の膜質制御にも用いることができる。イオン対形成にともなう π -A 曲線の変化は高分子の化学構造に大きく依存し、

例えばカチオン性単分子膜とのコンプレックスでは高分子のアニオン電荷密度が大きいほど単分子膜を凝縮させる傾向が見られる。アニオン性モノマーであるスチレンスルホン酸と水溶性に富むアクリルアミドとの共重合体 4 を合成し π -A 曲線ならびに蛍光イメージに及ぼす共重合組成の効果を検討した。スチレンスルホン酸とアクリルアミドが 1 対 1 の組成比ではスチレンスルホン酸のホモポリマーよりも圧力立ち上がりの面積が大きくなる。これは高分子のアニオン電荷密度の低下によって膜分子間の密なパッキングが妨げられたものと考えられる。さらにアクリルアミドの組成比を 1 対 6 に増やすと π -A 曲線はより広面積側にシフトする(図 3)。

しかし、アクリルアミドの組成がもっと増加しても (1 対 64) π -A 曲線には大きな変化はみられなくなる。これはアクリルアミド連鎖によるスペーサー効果で説明することができる。重合性基を有する二分子膜の分子パッキングが高分子主鎖形成によって乱されることは以前より指摘されていた。Ringsdorf らは高分子主鎖とアルキル鎖の間に緩衝作用を示す親水性のスペーサーグループを導入することで、単分子膜の分子パッキングに対する主鎖形成の影響を抑えることに成功した^[7]。共重合体とのコンプレックスの場合も、アクリルアミド組成が大きくなりその連鎖がある程度の長さになると水相で柔軟なコイルを形成し、膜分子のパッキングへの影響が小さくなり、 π -A 曲線の組成依存性も小さくなるものと考えられる(図 4)。

分子パッキングにおよぼすアクリルアミド連鎖のスペーサー効果は蛍光イメージの観察にも見いだされた。ポリスチレンスルホン酸のホモポリマーとのコンプレックスでは顕微鏡の視野は圧力に関係なく均一である。アクリルアミドの組成が少ない場合にも視野は均一で結晶ドメインは観察されない。一方、組成比 1 対 64 の共重合体では圧縮に伴いデンドライト状のドメインが成長した。

ポリアクリル酸のように可逆的な解離平衡を示す高分子を用いれば pH 変化によるドメイン形成制御が期待される。図 3 b に種々の pH 条件下における π -A 曲線と、5 mN \cdot m⁻¹ における分子占有面積と pH の関係を示す。面積と pH のプロットは、pH 5 付近をさかいに低い pH 側で単分子膜の面積が広がる傾向を示している。ポリアクリル酸の pKa 付近よりも低い pH 領域

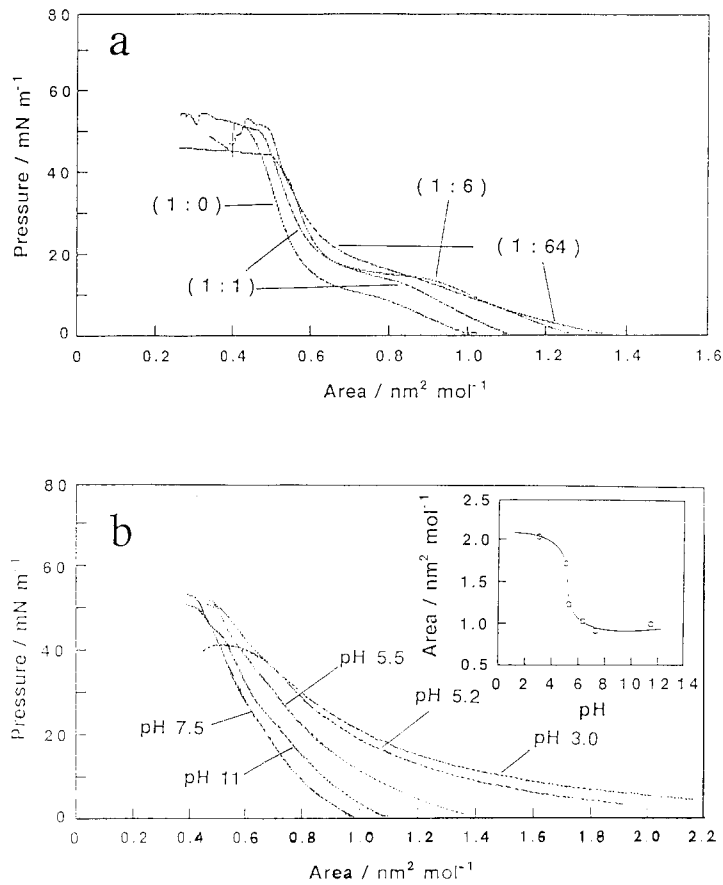


図3 ポリイオンコンプレックス単分子膜の表面圧-面積曲線。a: 共重合体4とのコンプレックス。括弧は共重合組成を示し、(1:0)はポリスチレンスルホン酸のホモポリマーである。b: ポリアクリル酸とのコンプレックス単分子膜の下水相 pH 依存性。挿入図は 5 mN/m における面積を pH に対してプロットしたもの。

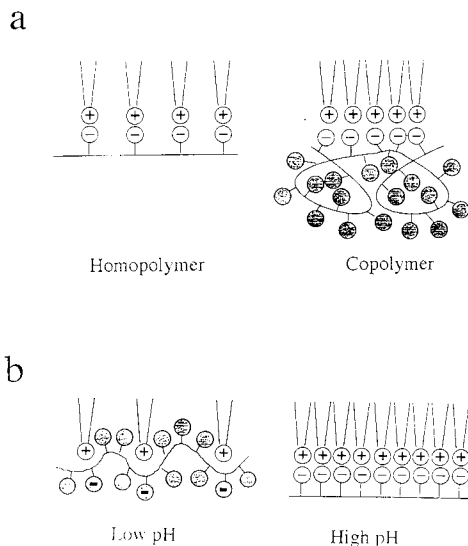


図4 ポリイオンコンプレックス単分子膜のモデル図。a: コポリマーにおけるスペーサー効果。b: ポリアクリル酸とのコンプレックスに対する pH の効果。

では、未解離のカルボキシル基が多く高分子の電荷密度が減少し π -A 曲線が広がるものと解釈できる。純水上の π -A 曲線は pH に対し大きな変化を示さないことから、ポリアクリル酸とのコンプレックス形成により pH 変化に応答する新しい機能が付与されたことを意味している。これは、高分子の性質を利用することで膜特性の制御が可能になったことを示す重要な結果である。

蛍光顕微鏡像にも著しい pH 依存性が見られる。pH 3 では視野は均一に光っており結晶化しにくいようである。pH 5.5 では小さな黒点が観察されはじめ、pH 11 では明確なデンドライト状結晶ができる。 π -A 曲線の結果とあわせ推論すると、低 pH では未解離のアクリル酸連鎖が単分子膜疎水部近傍に入り込み膜分子間のパッキングを悪くすると考えられる。アクリルアミドとは異なり、未解離のアクリル酸残基はスペー

サーとしての効果を示さないようである(図4b)。

ところで、高pHでほとんど解離したポリアクリル酸とのコンプレックスでは結晶ドメインが見られるのに対し、常に完全解離しているポリスチレンスルホン酸ではドメイン形成が見られない。大きなベンゼン環の立体障害によって膜分子のパッキングが阻害されているのかもしれない。単分子膜の結晶化には、膜分子の側方拡散と適切な分子パッキングが必要となる。ポリイオンコンプレックス単分子膜では、高分子の電荷密度、側鎖置換基の立体効果、イオン対形成の結合定数、高分子主鎖の自由度、高分子側鎖の疎水性、などの要因が複雑にからみあって結晶化を支配するものと考えられる。

6. 形態観察の応用

Wolfbeisらは膜電位感受性色素としてオクタデシルローダミンを含むバリノマイシンとアラキジン酸との混合単分子膜を石英基板上に累積し、カリウムイオンのオプティカルセンサー(オプトード)の作製を行った^[8]。バリノマイシンによるカリウムイオンの取込に伴う膜電位変化をローダミン色素の蛍光強度変化として検出しようとするものである。しかし彼らのLB膜はカリウムイオンに応答するものの、イオン強度の変化に伴う非特異的な蛍光応答もみられた。そのために参照オプトードとしてバリノマイシンを含まないLB膜が必要である。そこで我々は、より選択性に優れたセンサーを設計するために、蛍光分光光度計を装備した蛍光顕微鏡トラフを用いてローダミン色素の蛍光強度を支配する要因を調べた。膜化合物としてジドデシルリン酸とアラキジン酸を用いたところ、蛍光強度は結晶ドメインの形成とともに著しく減少すること、アラキジン酸との混合単分子膜ではドメイン形成に及ばず金属イオンの効果がジアルキルリン酸ほど顕著にみられないことが明らかになった^[9]。そこで、ジアルキルリン酸をマトリックス膜として、イオンとの相互作用があってもあまり大きな形態変化のない圧力条件で累積膜を作製し、フローセル中での種々のイオンに対する蛍光強度の応答を測定したところ、カリウムイオンに対しては蛍光強度の減少が見られナトリウムイオンではほとんど変化はなかった。ジアルキルリン酸LB膜を用いることで参照オプトードは不用となった。蛍光強度の変化量はカリウムイオン濃度の対数に比例す

ることから、膜電位変化を反映しているものと考えられる^[10]。以上の結果は、蛍光顕微鏡による単分子膜の直接観察をもとにしたイオン選択性の高いオプトード設計の成功例である。

最近、熱処理によってLB膜の機能が向上することを見いだした。半導体電極表面を単分子膜1とポリビニル硫酸からなるポリイオンコンプレックスLB膜で修飾し、フェロシアン化カリウムの電気化学酸化還元反応を調べた。通常の累積操作で表面被覆した電極には多くの欠陥があり、電極反応は有効にはブロックされない。一方、水面上でポリイオンコンプレックス単分子膜を熱処理した後に累積すると、電気化学反応の著しい抑制がみられた。これは、熱処理によってLB膜中の欠陥が減り絶縁性が向上したためである^[11]。今後熱処理は、高品質LB膜の作製法として広く用いられる技術となるであろう。

7. おわりに

水面上単分子膜のマイクロ構造を蛍光顕微鏡によって直接観察する手法は、発色団を持つ膜や蛍光プローブの添加を必要としており、X線回折法やFT-IRなどに比べると汎用性に欠けるという批判もある。光学顕微鏡による観察であるためにその分解能には制約があるものの、反射分光法や顕微分光法の併用が簡単であり分子レベルの情報を得ることが可能である。最近、Brewster角度で単分子膜にp-偏光を入射し反射率の違いを利用して相状態の変化を視覚化する顕微鏡(Brewster Angle Microscope: BAM)の作製が報告されている^[12,13]。ドイツとフランスのグループがそれぞれ独自に開発しており、前者の装置は市販されている。この手法は蛍光プローブを必要としない点で汎用的であり今後研究例が増えるものと思われる。一方、原子間力顕微鏡(AFM)などとの併用によって光学顕微鏡から電子顕微鏡レベルにいたる広いレンジで単分子膜の構造評価が可能である。HansmaらとGaubらは原子間力顕微鏡や走査型トンネル顕微鏡(STM)を組み込んだ蛍光顕微鏡システムを試作し、それ自身が強い蛍光を発するポリジアセチレンカルボン酸単分子膜の結晶格子の観察に成功している^[14]。BAMやAFMによる単分子膜の観察は飛躍的に増加するであろう。それぞれの顕微鏡の長所を活かした相補的な使用が望まれる。

【引用文献】

- [1] 下村政嗣, 油化学, 39, 134 (1994) ならびに引用文献参照
- [2] M. Shimomura, K. Fujii, T. Shimamura, M. Oguchi, E. Shinohara, Y. Nagata, M. Matsubara, and K. Koshiishi, *Thin Solid Films*, 210/211, 98 (1992).
- [3] M. Shimomura, K. Fuji, P. Kark, E. Sackmann, P. Meller, and H. Ringsdorf, *Jap. J. Appl. Phys.*, 27, L1761 (1988).
- [4] 小口雅之, 東京農工大学大学院工学研究科修士論文(1993).
- [5] M. Shimomura, E. Shinohara, S. Kondo, N. Tajima, Y. Nagata, and K. Koshiishi, *Sensors & Materials*, 4, 29 (1992).
- [6] 下村政嗣, 生物物理, 34, 11 (1994).
- [7] A. Laschewsky, H. Ringsdorf, G. Schmidt, J. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 788 (1987).
- [8] O. S. Wolfweis, B. P. H. Schaffer, *Analytica Chimica Acta*, 198, 1 (1987).
- [9] M. Shimomura, E. Shinohara, S. Kondo, N. Tajima, and K. Koshiishi, *Supramol. Chem.*, 3, 23 (1993).
- [10] M. Shimomura, A. Honma, S. Kondo, N. Tajima, E. Shinohara, and K. Koshiishi, *Sensors & Actuators, B*, 14, 629 (1993).
- [11] M. Shimomura, M. Oguchi, K. Kasuga, K. Fujii, E. Shinohara, S. Kondo, N. Tajima, K. Koshiishi, *Thin Solid Films*, 243, 358 (1994).
- [12] D. Honig, and D. Mobius, *Thin Solid Films*, 210/211, 64 (1992).
- [13] S. Henon, and J. Meunier, *Thin Solid Films*, 210/211, 121 (1992).
- [14] C. Putman, H. Hansma, H. Gaub, P. Hansma, *Langmuir*, 8, 3014 (1992).