

半導体ナノ粒子の三次元集合構造制御による新規人工光合成モデルの構築

Artificial photosynthetic model based on three-dimensional assembly of quantum dot nanoparticles

研究代表者 北海道大学大学院工学研究院 助教 石田洋平

Yohei Ishida

We herein report the first real-space investigation of Förster resonance energy transfer (FRET) in two different types of quantum dot (QD) supramolecular assemblies by observing their three-dimensional (3D) configurations through high-resolution electron tomography. Owing to its critical role in photosynthesis, artificial light-harvesting antennas, and investigation of protein-protein interactions, the mechanism of FRET has been intensively studied by monitoring its excited state dynamics via various spectroscopic techniques. The utilized electron tomography technique allowed the direct localization of 3D coordinates of individual QDs in self-assembled nanostructures and theoretical estimation of the FRET efficiency of a single fluorophore, domain, or supramolecular assembly. Moreover, the experimental value of the FRET efficiency determined by fluorescence spectroscopy was in good agreement with the magnitude obtained via electron tomography. We believe that the described strategy can be used in single-molecule FRET studies and will help to create a new bridge between material science and molecular/supramolecular photochemistry.

要旨

水中で単層剥離したアニオン性の粘土ナノシート (clay) をホスト、FRET が進行するような異なる極大発光波長を持つ2種類のカチオン性量子ドット(QD) をゲストとした静電相互作用による集合構造を用い、これまで分光測定を通してバルク的な挙動として理解されてきた FRET を、電子線トモグラフィ像により決定される実際の粒子間相対配置から初めて解析した。トモグラフィ像から、シート両面上に平面的に配列する QD の 3 次元中心位置を決定し、QD (D) と QD (A) の相対距離 R を用いて反応効率を計算した。36 個の QD (D) の効率 η_{FRET} は 2~43% と算出され、平均値である 27% をドメイン全体の η_{FRET} として得た。ドナーの発光強度の減少量から η_{FRET} は 28%、励起寿命解析からは 25% と見積もられ、トモグラフィによる解析から求めた結果とよく一致した。

1. まえがき

Förster Resonance Energy Transfer (FRET) は、ドナーとなる蛍光体から励起エネルギーの低いアクセプターへの双極子-双極子相互作用による光エネルギー伝達反応であり、反応速度定数 k_{FRET} はドナー-アクセプター間距離 R の 6 乗に反比例する。⁽¹⁾ 本章では水中で単層剥離したアニオン性の粘土ナノシートをホスト、カチオン性配位子で表面修飾した極大

発光波長の異なる 2 種類の CdSe/CdS/ZnS (コア/シェル/シェル) 量子ドットをゲストとした静電相互作用による集合構造を用い、これまで分光測定によりバルク的な挙動として理解されてきた FRET を、電子線トモグラフィ像により決定される実際の粒子間相対配置から理解することを目指した。本系のような粘土ナノシートを用いた静電相互作用による柔軟な集合構造の 3 次元構造解析において、電子線トモグラフィは有効な手法である。

2. 実験

2.1 使用試薬

リガンド交換反応にはカチオン性表面修飾剤として (11-Mercaptoundecyl)-*N,N,N*-trimethylammonium bromide (Aldrich) を、溶媒として Dichloromethane (TCI, HPLC grade) と Organo/ELGA Purelabo システムによって精製したイオン交換水を用いた。集合構造のホストである粘土ナノシートは Montmorillonite (クニミネ工業、 $\text{Na}_{0.66}(\text{Al}_{3.34}\text{Mg}_{0.66})\text{Si}_3\text{O}_{20}(\text{OH})_4$ 、陽イオン交換容量 (CEC; cation exchange capacity) = 0.90 mequiv g^{-1}) を以下の手順で精製したものを使用した。初めに粘土の分散液 (300 mL, 10g L^{-1}) を 7000 rpm、15 分間遠心分離し、回収した上澄み液をエタノール 1500 mL と 70°C で 1 時間混合した。得られたコロイド溶液を

PTFE 製のフィルター (Millipore, ポア径 $0.1 \mu\text{m}$) でろ過、次に残渣を一晩真空乾燥し精製を完了した。精製した粘土を完全に単層分離するよう水中で一晩静置した後使用した。

2.2 ドナーおよびアクセプター量子ドットの合成

FRET のドナー (QD (D)) およびアクセプター (QD (A)) として、極大発光波長の異なる 2 種類の CdSe/CdS/ZnS コア/シェル/シェル量子ドットを、既報に従い合成した。⁽²⁾

2.3 リガンド交換による量子ドット表面のカチオン化

合成直後のコアシェル量子ドットは trioctylphosphine oxide (TOPO) をリガンドとして表面修飾されている。中性分子である TOPO からカチオン性分子である (11-Mercaptoundecyl)-*N,N,N*-trimethylammonium bromide (MUTAB) へのリガンド交換反応を二層液相中で行い、量子ドット表面をカチオン化した。TOPO 修飾量子ドット (4 mmol) を 1 mL の dichloroethane に溶解し、MUTAB 水溶液 (10 g L^{-1} , 1 mL) を加えて一晩攪拌した。この溶液を 5000 rpm 、 5 分間遠心分離しカチオン化した量子ドットを含む水層を回収した後、余剰な MUTAB を除去するため dichloromethane で数回洗浄した。リガンド交換の前で吸光度は変わらなかったことから、溶液の濃度は保持されていた。これらの操作を QD (D) と QD (A) 分散液それぞれに対して行った。

2.4 量子ドット-粘土ナノシート集合構造の作製

単層剥離したアニオン性粘土ナノシート (clay) をホスト、カチオン性量子ドット (QD) をゲストとする超分子相互作用による QD-clay 集合構造は、それぞれの水溶液を攪拌下で混合することで作製した。集合構造水溶液をメンブレンろ過し (ポアサイズ $0.1 \mu\text{m}$)、ろ液の吸光度の添加ナノシート量による変化から、QD と clay の飽和吸着量を決定した。

2.5 HAADF-STEM トモグラフィ

STEM サンプルは QD-clay 集合構造分散液をカーボンコート銅グリッドに滴下して作製した。Titan³ G2 60-300 (FEI、加速電圧 300 kV) を用いて、BF および HAADF-STEM 像に加えて、 -64° から $+56^\circ$ まで 2° 間隔で回転させた連続傾斜 HAADF-STEM 像を撮影した (2048×2048 ピクセル、ピクセルサイズ 0.27 nm)。

Inspect 3D (FEI) を用いて、この傾斜像の相互相関法による各軸のアライメント及び simultaneous interactive reconstruction (SIRT) アルゴリズムによるトモグラフィ像の再構築 (25 iteration) を行い、Amira 5 (FEI) によって集合構造中の QD (D)-QD (A) 間の相対距離 R を解析した。決定された距離 R から反応速度定数 k_{FRET} とエネルギー移動効率 η_{FRET} を算出し、分光測定 (定常発光スペクトル、時間分解発光スペクトル) から得られる結果と比較した。

2.6 分光測定

吸光スペクトルは Lambda 35 UV/vis spectrometer (PerkinElmer)、定常および時間分解蛍光スペクトルは FluoTime 300 fluorescence lifetime spectrometer (PicoQuant、Xe ランプ、励起波長 405 nm) をそれぞれ用いて測定した。定常および時間分解蛍光スペクトルの変化から溶液全体における FRET の反応速度定数 k_{FRET} と反応効率 η_{FRET} を算出した。また絶対蛍光量子収率の測定には積分球ユニット ILF-533 (JASCO) を接続した FP-8600 (JASCO) を用いた。

3. 結果と考察

図 1a はリガンド交換後のカチオン性 QD (D) および QD (A) の STEM 像と吸収・発光スペクトルである。平均粒径は $7.1 \pm 0.9 \text{ nm}$ および $8.5 \pm 1.0 \text{ nm}$ であり、QD (D) の発光スペクトルと QD (A) の吸収スペクトルが、FRET の必要条件である有意な重なり積分 J を持つことを確認した。図 1b は大過剰の粘土ナノシートを用いて作製した集合構造分散液と、ポアサイズ $0.1 \mu\text{m}$ 、PTFE フィルターによるろ液の吸光スペクトルである。ナノシートに吸着していない QD はこのフィルターを透過することと、集合構造のろ液は QD 由来の吸光ピークを示さなかったことから、ろ過によって集合構造を完全に除去可能であることが確かめられた。添加するナノシート量によるろ液の吸光度変化 (図 1c) から、飽和吸着量を余剰な QD 由来の吸収がなくなる $[\text{QD}] : [\text{clay}] = 2 \times 10^{-7} \text{ M} : 16 \text{ mg L}^{-1}$ と決定した。HAADF-STEM 観察試料は過飽和吸着量比で、分光測定試料は飽和吸着量比で作製した集合構造に対して行った。飽和吸着量比の時、1 粒子あたりのナノシート専有面積は約 100 nm^2 であり、六方最密構造を仮定すれば隣接する粒子同士の平均中心間距離は 10.8 nm である。これは有意な重なり積

分、 J に加えて、隣接する粒子の中心間距離が FRET の進行条件の一つであるドナーとアクセプターの十分な近接を満たしていることから、本集合構造中では近接する QD(D)-QD(A) 間で FRET が進行可能であると考えられた。

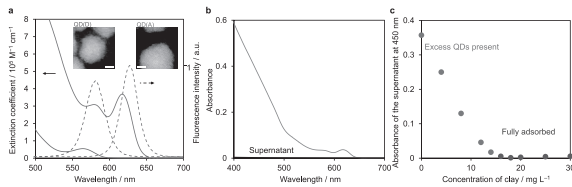


図 1 a. QD(D) (青)および QD(A) (赤)の吸収・発光スペクトル(実線・点線)、b. ろ過前の集合構造分散液(緑)およびろ液(黒)の吸収スペクトル([QD(D)] = [QD(A)] = 1.0×10^{-7} M, [clay] = 60 mg L⁻¹)、c. 添加するナノシート量によるろ液の波長 450 nm における吸光度変化([QD(D)] = [QD(A)] = 1.0×10^{-7} M, [clay] = 0-30 mg L⁻¹)。

図 2a および b は異なる倍率で撮影した QD-clay 集合構造の HAADF-STEM 像である。QD はナノシート上に密に吸着しており、高倍率像(図 2b)では粒子同士が重なって見えることから粒子がナノシートの両面に吸着していることが示唆された。実際の 3 次元構造を検証するため、 -64° から $+56^\circ$ まで 2° 間隔で回転させた 61 枚の像から成る連続傾斜 HAADF-STEM 像を撮影し、3 次元トモグラフィ像を再構築した。

得られたボリュームレンダリング像(図 2c)からは、QD はナノシートに相当する 1 nm 程度の空隙を介してシート両面に 1 層ずつ平面的に吸着していることが明らかになった。また集合構造は電子線入射方向 (z) に対して 8° 傾斜しており、ナノシート方向に合わせ新たに x' 、 y' および z' 軸を取って 3 次元解析を進めた。一般にトモグラフィ像では、試料傾斜角の制限により情報が失われる領域が、逆空間上で傾斜軸に沿って楔形に現れる (missing wedge effect)。したがって x 、 y 方向に比べて z (電子線入射) 方向の解像度は低く、得られる像は z 方向に伸長する。図 2c から、球状粒子である QD は z (z') 軸方向にやや伸長しているが、おおよそ球として再構築されており、得られたトモグラフィ像は z (z') 軸方向にも十分な解像度を持つと言える。図 2d-f は、シート相当の空隙面と ± 5.5 nm ずつ平行移動した面のスライス像であり、粒子はシートの両表面におい

て全く異なる配置で吸着している。以降シートの両表面を Surface I および II として区別する。

次に、トモグラフィ像中に含まれる QD(D) および QD(A) を粒径の差によって分別した。スライス像の高さを変化させ、各粒子の極大粒径を測定した結果が図 2g であり、粒径の QD(D) (TEM 平均粒径 7.1 ± 0.9 nm) と QD(A) (TEM 平均粒径 8.5 ± 1.0 nm) に対応する 2 つのピークが現れた。図 2h に、像中に含まれる 73 個の QD を粒子の吸着面 (Surface I, II) と種類 (QD(D), QD(A)) によって色分けしたサーフェスレンダリング像を示す。非常に薄いナノシートは再構築に十分なコントラストが得られないため、図中では模式的に示した (水色部分)。固体表面でのドメイン形成において同一種同士の偏析が起こることはよく知られているが、本系では QD(D) および QD(A) は偏析することなくランダムに吸着していた。静電相互作用による集合構造におけるゲストの偏析は、同一ゲスト種間の強い疎水性相互作用やファンデルワールス相互作用によってもたらされる。偏析が起こると、別種のゲストと隣接する確率が小さくなるため、FRET のような異種分子間反応の速度定数や効率が著しく低下する。図 2h で明らかのように、QD(D) および QD(A) の偏析のないランダムな配列をもつ本実験で作製した集合構造中では FRET が十分な速度で進行していることが期待された。

得られたトモグラフィ像から集合構造中の QD の中心位置を決定し、粒子間で進行する FRET を解析した。図 2i は、 z 方向からみた各 QD の 3 次元中心位置である。図 3 に示したように Surface I, II と QD(D), QD(A) を区別して番号を振り、全 QD(D)-QD(A) 2 粒子間の中心間相対距離 R を決定、反応速度定数 k_{FRET} を FRET の式(1)に従い算出した。⁽¹⁾

$$k_{\text{FRET}} = \frac{9 \ln 10 \kappa^2 \phi_D}{128 \pi^5 n^4 N \tau_D r^6} J \dots \text{式(1)}$$

ここで κ は双極子モーメントの配向因子、 ϕ_D は積分球を用いて測定した QD(D) の絶対発光量子収率 (0.22)、 n は溶媒の屈折率 (水の場合 1.33)、 N はアボガドロ定数、 τ_D は時間分解発光分光測定によって得られた QD(D) の励起寿命 (23.0 ns) を表している。

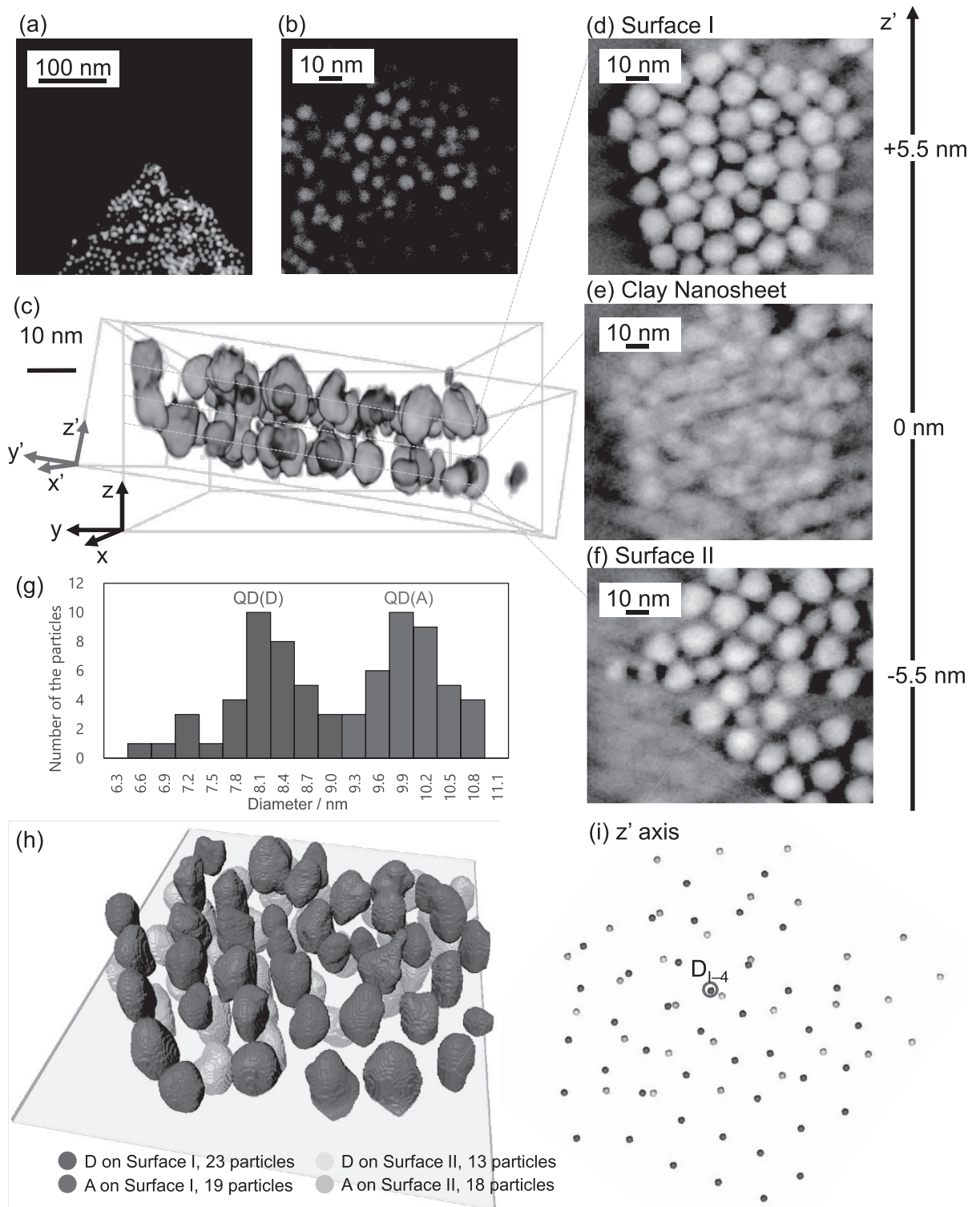


図2 a. 低倍率およびb. 高倍率HAADF-STEM像、c. ボリュームレンダリング像(x) 85.3 nm \times (y) 69.6 nm \times (z) 34.6 nm)、d-f. z' 方向に5.5 nm ずつ平行移動した x' y' 面スライス像、g. トモグラフィ像中に含まれた粒子の極大粒径ヒストグラム(解析では青、赤色の領域をそれぞれ QD(D)、QD(A) とした).

配向因子 κ について、本系では QD はランダムな方向でナノシート上に吸着しており、FRET の進行中に特異的な配向はない。静的な 3 次元構造中において、このような双極子モーメントが等方的な 2 成分間での κ^2 の値は 0.66 である。QD(D) の発光スペクトルと QD(A) の吸収スペクトルの重なり積分 J は式(2)に従って、 $3.4 \times 10^{16} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (または $3.4 \times 10^{33} \text{ nm}^6 \text{ mol}^{-1}$) となった。ここで λ は波長 (nm)、 $\varepsilon_A(\lambda)$ は QD(A) のモル吸光係数、 $f_0(\lambda)$ は積分値が 1 になるよう規格化した QD(D) の極大発光強度である。本系で得られた J の値が一般的な分子間の FRET と比べて非常に大きいのは、QD(A) の高いモル吸光係数のためである。またドナーのエネルギー遷移速度と放射失活速度が等しくなるような距離を Förster 距離 (R_0) と言い、式(3)によって算出される。Förster 距離 R_0 は 7.2 nm となった。

$$J = \sum F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 \Delta \lambda \quad \dots \text{式(2)}$$

$$R_0 = 0.0211(n^{-4} \phi_D \kappa^2 J)^{1/6} \quad \dots \text{式(3)}$$

さらに FRET の式(4)に従って、 τ_D 及び k_{FRET} の値を用いて各 QD(D) の反応効率 η_{FRET} を算出した。ここで $\sum k_{\text{FRET(D-Ai)}}$ はある QD(D) に対する各 QD(A) との間の k_{FRET} の総和を表す。例えば D_{I-4} では、最も近い距離にある A_{I-13} との間の反応速度定数 k_{FRET} は $24.7 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ と算出され、以降中心間距離 R が長くなるにつれて k_{FRET} は減少した。これらの値と式(4)から D_{I-4} の反応効率 η_{FRET} は 49% となった。この高い反応効率は D_{I-4} と非常に距離の近い A_{I-13} 、 A_{I-5} 、 A_{I-1} および A_{II-17} との反応を反映しており、Förster 距離 R_0 の 2 倍以上離れて近接するその他の QD(A) からの寄与は小さい。シートを介した QD 間の比較的長い中心間距離は、1 nm 程度のナノシート自身の厚さと、QD 表面を修飾するカチオン性分子の長い直鎖部分(およそ 2 nm) が絡まった状態でシート表面に存在しているためであると考えられる。

$$\eta = \frac{\sum k_{\text{FRET(D-Ai)}}}{\tau_D^{-1} + \sum k_{\text{FRET(D-Ai)}}} \quad \dots \text{式(4)}$$

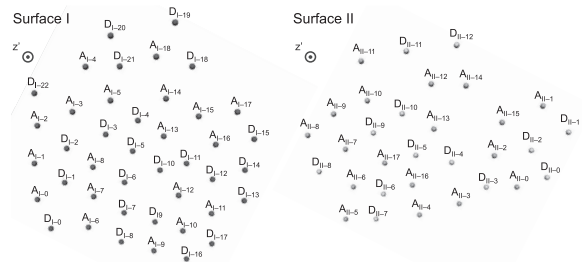


図3 FRET 解析に用いた各粒子のナンバリング

36 個の各 QD(D) の η_{FRET} (3~51%) の平均を取り、ドメイン全体反応効率 η_{FRET} を求めると $27 \pm 2\%$ となった。ドメイン全体の η_{FRET} の誤差範囲は、QD(D) および QD(A) の粒径分布が完全に分離していないことを考慮して決定した。QD(D) と QD(A) の境界領域である、粒径 8.7 ~ 9.0 nm に含まれる 3 個の QD(D) と 9.3 ~ 9.7 nm に含まれる 3 個の QD(A) について、QD(A) または QD(D) として入れ替えた場合に同様の計算を行ったところ、(i) 3 個の QD(D) (D_{I-6} 、 D_{II-8} 、 D_{II-11}) が QD(A) である場合 η_{FRET} は 28%、(ii) 3 個の QD(A) (A_{I-5} 、 A_{I-7} 、and A_{I-11}) が QD(D) である場合 η_{FRET} は 25% となった。

またドメインの辺縁部に配置していた QD(D) は、中心部に存在するものと比べて近接するアクセプター数が少ないため、3~20% 程度の比較的低い反応効率を示した。これはトモグラフィを用いた実空間解析によって、FRET に関わる個々の反応成分を区別したことで初めて明らかになった事柄である。

集合構造中では FRET (QD(D)→QD(A)) の他に、Energy migration (QD(D)→QD(D)) と Back energy transfer (QD(A)→QD(D)) というエネルギー伝達過程が可能である。Energy migration について QD(D) の発光および吸収スペクトルの重なり積分 J ($2.6 \times 10^{15} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{nm}^4$) と式(3)より、 R_0 は 4.5 nm となり、同様に Back energy transfer についても QD(A) の発光スペクトルと QD(D) の吸収スペクトルの重なり積分 J ($4.2 \times 10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{nm}^4$)、QD(A) の発光量子収率 ϕ_A (0.19) と式(3)より、 R_0 は 2.3 nm となった。これらの R_0 は QD の直径よりも十分小さいことから本系において Energy migration および Back energy transfer の寄与は無視した。

トモグラフィ像による FRET 解析の妥当性を検討するため、一般的な FRET 解析方法である分散液の定常

発光および時間分解発光測定により得られた結果と比較した。図4aはQD(D)-clay、QD(A)-clayおよび、QD(D)とQD(A)を1:1で含むQD-clay集合構造のナノシート濃度による定常発光スペクトル変化(励起波長405 nm)である。3種類の濃度比 ($[QD] : [clay] = 2 \times 10^{-8} M : 1.6 \text{ mg L}^{-1}$, $2 \times 10^{-8} M : 3.2 \text{ mg L}^{-1}$, $2 \times 10^{-8} M : 6.4 \text{ mg L}^{-1}$)は、吸着した1粒子あたりの専有面積がそれぞれ100、200、500 nm^2 に対応する。QDの吸着密度が高いほど、QD(D)の発光強度は減少、QD(A)の発光強度は増強していることから、励起状態のQD(D)から基底状態のQD(A)へのFRETが進行していることが示唆された。波長609 nmに等発光点が現れたことから、それぞれの吸着密度ではFRETの反応効率が異なると考えられた。最も高い吸着密度100 nm^2 のとき、QD(D)の発光強度減少量から見積もられるFRETの反応効率 η_{FRET} は28%となった。定常発光測定ではQD(D)とQD(A)の両方が直接励起されるため、両者を区別して理解することが困難であるので、時間分解発光測定によるさらに詳細な解析を行った。図4bはQD(D)-clayおよびQD-clay集合構造の時間分解発光スペクトルである。QD(D)の励起寿命はFRETが進行することで23.0 nsから17.3 nsまで減少し、寿命の減少量から η_{FRET} は25%と見積もられた。ここでQD(A)の発光強度は9%増強、励起寿命は20.1 nsから21.7 nsまで増加している(図4c)が、QD(A)の挙動から η_{FRET} を見積もることは出来ない。

分光測定によるFRET解析はバルク中に含まれる全QD-clay集合構造中で進行するFRETの平均値を評価しており、STEMトモグラフィ像による解析はある1つの集合構造中で進行するFRETを評価しているという違いを踏まえた上で、前項でトモグラフィ像から得られた結果($\eta_{\text{FRET}} = 27\%$)は、分光測定から得られた結果($\eta_{\text{FRET}} = 28\%$ または25%)とよく一致した。

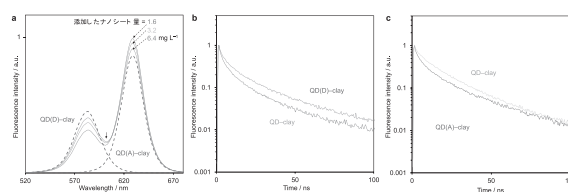


図4 a. QD(D)-clay(青点線)、QD(A)-clay(赤点線)および異なる濃度でナノシートを添加したQD-clayの定常発光スペクトル(励起波長405 nm)、図中矢印は等発光点を示す(波長609 nm)、b. QD(D)-clay(青)およびQD-clay(緑)の時間分解発光スペクトル(励起波長560 nmおよび405 nm)、c. QD(A)-clay(赤)およびQD-clay(緑)の時間分解発光スペクトル(励起波長640 nmおよび405 nm)。

4. 結論

水中で単層剥離したアニオン性の粘土ナノシート(clay)をホスト、FRETが進行するような異なる極大発光波長を持つ2種類のカチオン性CdSe/CdS/ZnS量子ドット(QD)をゲストとした静電相互作用による集合構造を用い、これまで分光測定を通してバルク的な挙動として理解されてきたFRETを、電子線トモグラフィ像により決定される実際の粒子間相対配置から初めて解析した。トモグラフィ像から、シート両面(Surface I, II)上に平面的に配列するQDの3次元中心位置を決定し、QD(D)とQD(A)の相対距離 R を用いて反応効率 k_{FRET} を計算した。 k_{FRET} から求めた36個のQD(D)の効率 η_{FRET} は2~43%と算出され、平均値である27%をドメイン全体の η_{FRET} として得た。ドナーの発光強度の減少量から η_{FRET} は28%、励起寿命解析からは25%と見積もられ、どちらもトモグラフィによる解析から求めた結果とよく一致した。

これらの結果から、ナノシートを用いた柔軟な静電相互作用によるソフトな集合構造と光化学反応系の多角的な理解における電子線トモグラフィの有用性が示された。

発表論文

なし

参考文献

- (1) Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung Und Fluoreszenz. Ann. Phys. 1948, 437, 55-75.
- (2) Yang, Y. A.; Wu, H.; Williams, K. R.; Cao, Y. C. Synthesis of CdSe and CdTe Nanocrystals Without Precursor Injection. Angew. Chem., Int. Ed. 2005, 44, 6712-6715.