

論文内容の要旨

論文題目 原子間力顕微鏡による高分子の1分子力学計測

氏名 酒井 康博

本論文は、高分子1本鎖ならびに高分子表面の力学物性の、原子間力顕微鏡（AFM）による新しい測定法・評価法の開発についてまとめたものである。具体的には、高分子1本鎖の粘弾性測定法の開発、緑色蛍光タンパク質（GFP）の力学的アンフォールディング経路の検討と1分子粘弾性測定法を応用したリフォールディング検出の試み、環動ゲル表面の不均一構造観察について述べられている。

1. 本研究の目的

高分子の機能化、高性能化が進む昨今、より微小な領域での構造観察およびそこからヒントを得た形での構造制御へのフィードバック、さらにはその成果としての、高分子の力学物性の向上が求められている。そのためには、構造と力学物性の両方をより詳細に評価する手法が鍵となる。その中で、原子間力顕微鏡（AFM）は微小な領域での構造観察に適しているのみならず、ナノメートルスケールでの力学物性測定においてもその威力を発揮するため、まさにうってつけのツールである。

本研究では、AFMを高分子表面やその極限である1本の高分子鎖の力学物性を評価するための手段と位置づけ、高分子に特化した形で新しい測定法・評価法を開発することを目的とする。さらに、新規に開発した測定法の有効性を示すとともに、これと従来の測定法を組み合わせ、様々な物質に対して実践していくことで、従来の力学物性評価手法だけでは得られなかった、高分子の構造や物性に関する新たな情報を引き出していくことを目指す。

2. 高分子 1 本鎖の粘弾性測定

高分子材料の物性の中で、力学物性は学問的にも興味深く、また実用段階においても非常に重要なパラメータの一つである。バルク系では力学物性の評価手法は非常に多岐にわたっており、そのうち代表的なものとして引っ張り試験や動的粘弾性測定法がある。1 分子レベルにおいては、前者は既に AFM による 1 分子鎖の単純伸長という形で実現されているが、後者については未だ有効な評価手法が存在しない。本章の目的は、粘弾性測定を 1 本の高分子鎖に対して実現することにある。

まず、市販 AFM 装置外部に改良を施すことで、その測定を実現するためのシステムを構築した (図 1)。このシステムでは、これまでの市販装置だけでは不可能であった、試料の上下駆動、正弦波的駆動を非常に高い精度で制御することが可能である。正弦波応答については、100 Hz 以下の低周波領域での測定が可能である。

このシステムを用いて、1 本のポリスチレン鎖に対して、その様々な伸長状態において正弦波応答の測定を実現した (図 2)。入力に対する応答の振幅と位相差の値から、従来の単純伸長実験では得られなかった、1 本の高分子鎖自身が持つ粘弾性的な情報を伸長過程の様々な点において取得することに成功した。また、通常バルクの粘弾性測定においては当然のように行われている周波数掃引についても実現し、その結果から、1 本の高分子鎖の内部でのモノマー同士の摩擦現象の存在が示唆された。

3. 共振法による高分子 1 本鎖の粘弾性測定

この章では、カンチレバーをその共振点で振動させた状態で分子鎖の伸長を行うというアプローチにより、10 kHz 領域での高分子 1 本鎖の粘弾性測定を実現した。測定した振幅および位相の挙動について、現象論的なモデルに基づいて解析を行い、伸長過程における分子鎖の弾性および粘性に関する情報を分離して取得することに成功した。さらに、振動 1 周期あたりのエネルギー散逸についても値の見積もりを行い、値として $k_B T$ のオーダーであるという結果を得た。また、分子鎖の弾

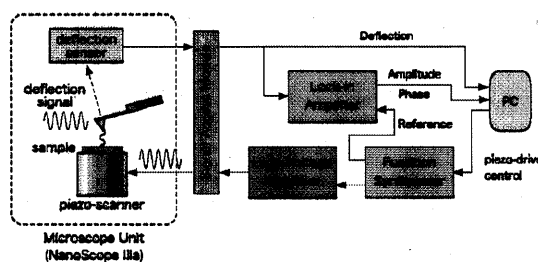


図 1: AFM をベースとした、高分子 1 本鎖の粘弾性測定システム。

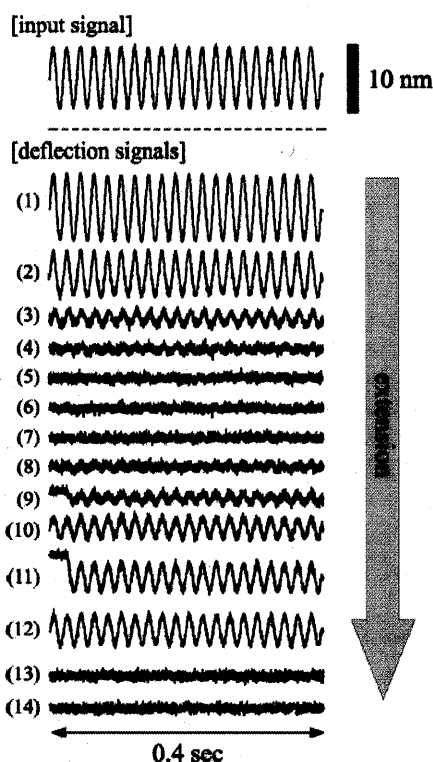


図 2: 高分子 1 本鎖の粘弾性測定から得られた、正弦波入力に対する分子鎖の応答。(3)-(12)にかけて、分子鎖は徐々に伸長されている。

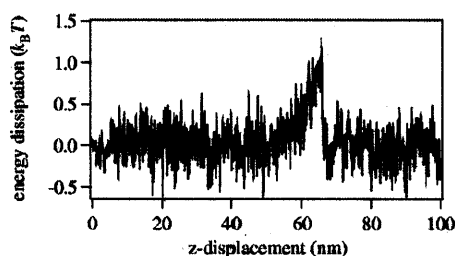


図 3: 共振法による粘弾性測定から得られた、1 周期あたりの平均エネルギー散逸の、分子鎖伸長に伴う変化。

性が立ち上がり始める領域から、分子鎖の伸長に伴ってエネルギー散逸の値が増加する挙動を観測した。これは、分子鎖を構成するモノマーと周囲の溶媒分子との摩擦によるものであると解釈した。

バルクの粘弾性測定では、時間- 温度換算則とよばれる経験則に基づき、広範な周波数領域での粘弾性的情報を得ることが可能である。一方、1 分子鎖の測定は溶媒中で行うため、測定可能な温度領域が限られる。また、現状では、100 Hz から 1 kHz、および 100 kHz 以上の周波数領域での動作を実現できていない。広い周波数範囲にわたる「1 分子粘弾性スペクトロスコピー」を実現するためには、各周波数領域に適した変調法を開発していくことが今後の課題となる。

4. Green Fluorescent Protein の 1 分子力学計測

生物学の研究において顕微鏡観察用の蛍光標識として幅広く用いられている、緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein, GFP) に対して、その立体構造と蛍光特性の相関を詳細に明らかにするための第一段階として、AFM による 1 分子力学計測を行った。

まず、1 個の GFP 分子に対して伸長実験を行い、測定から得られた張力- 伸長曲線では、GFP 分子の末端と AFM 探針または基板との結合が破断する前にも、ある特定の伸長距離において複数の力のピークが観測された。ピークの現れる伸長距離と、GFP のアミノ酸配列および立体構造との関係を詳細に検討した結果、分子内において局所的に結合が強固で、破壊に大きな力を要する部位を特定することができた。これにより、外力による GFP のアンフォールディング経路が明らかとなった。

さらに、2 章で開発した粘弾性測定法を応用することにより、動的な力学物性に関する情報を得ることに成功した。測定を行った時間スケールの範囲内では、GFP 分子は伸長過程全体にわたり力学的な正弦波刺激に対して同位相で応答し、最近報告されたアンフォールディングとリフォールディングの繰り返しのような現象はここでは起こっていないことが判明した。分子に加える正弦波の周波数のレンジを広げ、かつ、より高い力分解能を備えた測定が実現できれば、GFP 分子内の二次構造の外力による崩壊などの詳細な情報を得られる可能性がある。GFP 分子の折りたたみ構造はその発光特性と密接な関係があり、したがって本研究で得られた知見は、分子構造と発光特性との相関のより詳細な理解に資するものであるのみならず、新規タンパク質の設計において有益な情報を与える。さらには、これらの知見をもとにして発光を外力によってコントロールすることが実現できれば、新しい発光デバイスへの展開も期待される。

5. 環動ゲル表面の不均一構造観察

ポリエチレングリコールとシクロデキストリンからなる環動ゲルは、ゲルのネットワークを形成する高分子鎖上を架橋点が自由に動くことができるという特徴を有し (滑車効果)、これによって従来のゲル材料では実現不可能であった高い含水率と機械強度を両立させた材料である。また、生体に対する安全性が非常に高いため、生体適合材料、医用材料分野への応用が期待されている。

これまでの研究から、環動ゲルにおいて最も特徴的な性質としての滑車効果は、溶媒環境により制御可能であることが明らかになりつつある。例えば、貧溶媒中では架橋点を形成するシクロデキストリン分子が凝集して滑車効果が抑制され、また、ゲルを伸長すると不均一構造が誘起されることが X 線小角散乱の結果から確認されている。また、散乱パターンから、この構造の特徴的なサイズは数十 nm のオーダーであることが観測されている。本章では、AFM を用いて、このようなゲルの不均一構造の実空間における可視化を行った。

AFM 探針を試料に押し込んだ際に探針に働く力を測定することで、その試料表面の局所的な硬さ（弾性率）を評価することができる。この操作を少しずつ位置を変えながら行えば、試料表面の弾性率分布が得られる。このような手法はフォースマッピング法と呼ばれる。AFM による軟質試料の表面観察には、通常、タッピングモードなどが用いられるが、溶媒中でのゲル表面は極めて軟らかいため、安定した観察は非常に困難である。したがって本研究ではフォースマッピング法を採用し、未伸長のゲルおよび一軸伸長したゲルについて、弾性率分布を貧溶媒中でその場測定することで、不均一構造を可視化した。

未伸長の環動ゲル表面の弾性率分布（図 4a）では、観察領域内で硬い相（白色破線内、ドメインサイズは 50-200 nm 程度）と軟らかい相に分離しているのが観察された。この硬さの違いは押し込み時のフォースカーブ（図 4b）にも傾きの違いとして現れている。硬い相は CD 分子の凝集、軟らかい相は PEG リッチ相であると考えられる。一方、2 倍に一軸伸長した環動ゲル（図 5）では、未伸長の場合とは明らかに異なり、硬い相と軟らかい相の縞構造が見られる。縞の方向は伸長方向に対して 30-45° 程度傾いており、図 5 と左右対称の方向のものや、縞構造が折り返して波状になっている構造が観察された結果も得ている。また、縞の幅は 30-50 nm 程度であり、これは X 線小角散乱の結果から予想されるサイズと一致している。

これまでに、伸長によって誘起され形成されるゲル内部の不均一構造は散乱実験によっては確認されていたが、実空間で観察した例はこれが初めてである。本研究によって、未開拓の領域が多く残されている環動ゲルの構造や物性について、そのより深い理解に一歩近づいたと言ってよいであろう。本研究で得られた知見は、環動ゲルの実用化を図っていく上で、その設計段階において基礎的かつ重要な情報となり得る。

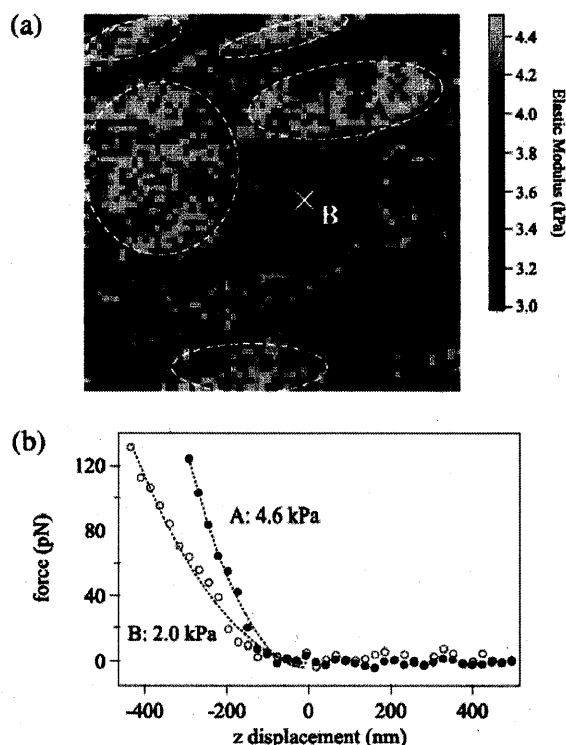


図 4 : (a) 未伸長の環動ゲル表面の弾性率像 (500 nm × 500 nm)。50-200 nm 程度のサイズの硬いドメインが観察される（白色破線内）。(b) (a)中の硬い領域（点 A, ●），および軟らかい領域（点 B, ○）における典型的なフォースカーブ。理論式によるフィッティングの結果も重ねて示してある（破線）。

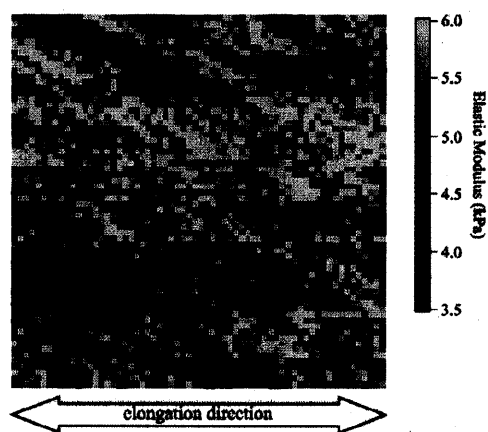


図 5 : 図の横方向に 2 倍に伸長した環動ゲル表面の弾性率像 (2μm × 2μm)。