

論文審査の結果の要旨

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。

本論文は 6 つの章により構成され、各章の概要は以下の通りである。

第 1 章では、nN から pN にまで及ぶ微小な力の計測について、主に測定手法の発展という視点からその歴史を概観し、その流れの中での AFM の位置づけについて述べられている。また、微小な力の計測の極限とも言える 1 分子力学計測について、AFM を用いた手法と他の測定手法とを比較しながら、その特徴と、これらの測定から過去に得られた知見がまとめられている。最後に、背景となる知識として、走査型プローブ顕微鏡、特に本研究で用いている AFM について、イメージングの原理と力測定に関する一般論、さらには高分子 1 本鎖の力学測定法について詳細に説明されている。

第 2 章では、高分子 1 本鎖の力学物性の新しい評価手法としての、「高分子 1 本鎖の粘弾性測定」についてまとめられている。これは、従来の 1 分子伸長実験のように 1 本の高分子鎖をただ単純に引っ張り上げてしまうのではなく、分子鎖の伸長を途中で止め、正弦波的な変調を加えることによって 1 分子の「粘弾性」にまで踏み込んで評価しようというものである。このような測定を実現すべく、著者は市販の AFM 装置外部に機能を拡張して独自の測定システムを構築しており、その過程が詳細に説明されている。このシステムにより 0.1-100 Hz という低周波領域における 1 本鎖の粘弾性測定が実現され、静的な単純伸長実験では得られなかった、1 本の高分子鎖自身における粘弾性的な挙動を伸長過程の様々な点において検出することに成功した。

第 3 章では、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」の実現を目指した次の一手として、高周波域における粘弾性測定法について述べられている。AFM の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基づき、装置に機能拡張を施すことによって、10 kHz 領域での測定が実現された。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うことで、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できた。さらに、1 分子内における振動 1 周期あたりのエネルギー損失についても値の見積もりが可能となり、値として $k_B T$ のオーダーであるという結果が得られた。この損失は、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ている。

第 4 章では、生物学研究の場において蛍光標識として幅広く用いられている GFP について、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の、AFM による 1 分子力学計測についてまとめられている。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、外力によって破壊された立体構造が元に戻る現象（リフォールディング）のタイムスケールに関する情報が得られた。

第5章では、表面弾性率分布評価に基づく、環動ゲルの相分離構造の実空間における可視化についてまとめられている。まず、新たなカテゴリーに属するゲルとしての環動ゲルについて、従来のゲルとの比較を中心にその特徴が述べられ、これまでの環動ゲルに対する散乱実験の結果から得られた知見について記述されている。次に、測定用ゲル試料の調製法、表面弾性率の評価法について詳細に説明されている。実際に弾性率分布を測定したところ、貧溶媒中のゲル表面が硬い相（架橋点であるシクロデキストリン分子の凝集）と軟らかい相（ゲルのネットワークを構成する高分子鎖）の2相に分離しているのが確認された。また、貧溶媒中でこのゲルを伸長すると、これら2つの相が伸長方向に対して30°から45°程度傾いた方向に縞状構造を形成していることがわかった。貧溶媒中でこのような相分離が起こることは中性子やX線の小角散乱測定からは予想されていたが、本研究ではこれを初めて実空間で可視化することに成功したことになる。

第6章では、本研究から得られた知見について総括し、AFMによる力学測定法についての今後の展望が述べられている。

以上のように本論文で著者は、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、高分子や生体分子などのソフトマテリアルに特化した形で新しい測定法・評価法を開発し、様々な物質に対してそれを実践した。これにより、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多くの有意義な知見を得ている。近年進んでいる高分子材料の機能化・高性能化においては、より微小な領域で構造と力学物性の両方を詳細に評価する手法が不可欠であり、本論文で著者が新たに開発した測定手法は、その中での重要な位置を占めることになると予想される。また、実際の測定から得られた多くの知見は、新規高分子材料や、将来その登場が期待される人工タンパク質の設計において大いなる指針となり得る。

第2章及び第3章の結果については、中嶋健、原正彦、伊藤耕三、西敏夫との、第4章の結果については、Tong Wang、中嶋健、宮脇敦史、伊藤耕三、原正彦との、第5章の結果については、奥村泰志、伊藤耕三との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験及び解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。よって、本論文は博士（科学）の学位論文として合格と認められる。