

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	走査型プローブ顕微鏡による分子集合体および細胞の観察・評価
Title(English)	
著者(和文)	関 禎子
Author(English)	Teiko Seki
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:乙第4117号, 授与年月日:2015年9月30日, 学位の種別:論文博士, 審査員:丸山 厚,田口 英樹,金原 数,森 俊明,小畠 英理
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:乙第4117号, Conferred date:2015/9/30, Degree Type:Thesis doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(論文博士)

論文要旨 (和文2000字程度)

報告番号	乙 第 号	氏 名	関 禎 子
(要 旨) 走査型プローブ顕微鏡(Scanning Probe Microscope : SPM) は、1980年代より開発され、最初に完成した走査型トンネル顕微鏡(Scanning Tunneling Microscope: STM)は、大気中で原子が見える非常に画期的な顕微鏡で、開発者のノーベル物理学賞受賞に至った。STMは導電性が必要であり、測定できる試料が限られていたが、その後、導電性が不要である原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope: AFM) が開発され、応用が急速に発展した。AFMとは、先端が先鋭な探針を試料表面に近づけ、探針と試料との相互作用力が一定となるよう制御すると同時に平面方向二次元に走査し、三次元形状を得る顕微鏡である。 現在、半導体産業においては、SPMは確立した評価技術の一つとして使用され、多大な貢献をしている。高分子材料の分野では、表面形状のみならず、表面の物性等の計測も可能なことから、高機能材料開発等様々な研究に用いられている。しかし、生体材料に関しては、電子顕微鏡観察とは異なり真空を必要せず、大気中および液中での測定が可能なことから、非常に期待されているにも関わらず、現在は限られた研究に用いられ、一般的に使用される顕微鏡にまでは至っていない。その理由としては、生体材料が柔らかいこと、試料の特徴が多岐にわたること、などによる測定の難しさが考えられる。そのため、かなりの熟練と測定原理の熟知、そして新たな測定法の探索などが必要となる。データを取得できたとしても、誤った解釈をする可能性もある。生体材料では、特に試料調製等周辺技術が未発達で、解決すべき問題が多い。電子顕微鏡が、試料作製技術の進歩とともに発展したように、SPMの発展及び正確な測定には、その周辺技術の進展が不可欠である。 本研究では、SPMによる測定方法が十分に確立されていない生体材料について研究を行った。対象としたのは、主に構造タンパク質、合成ペプチド、脂質平面膜および細胞である。これらについて、1) 観察するための方法、これには、試料調製方法、測定方法が含まれる、2) 取得可能な情報、を明らかにすることにより、SPMによる生体試料測定を容易にし、生物系への応用研究に貢献することが、目的である。 STMによる生体関連物質の観察は、現在は研究例が少ないが、AFMが開発される前には、DNA、酵素、コラーゲンなどを対象に行われていた。本研究では、HOPG上に載せた、Fアクチンの観察に成功し、最小単位であるGアクチンは認識できなかったが、Fアクチンの螺旋構造とそのピッチ35nmを観察した。このときの測定条件であるトンネル電流と印加電圧の値は、同じ構造タンパク質である微小管を測定した他の研究者の値と類似していることから、これが測定の成功に寄与した可能性がある。しかし、STMによる有機分子の測定原理は明らかになっていない。 合成ペプチドのバルナーゼとタウタンパク質については、AFMコンタクトモードおよびタッピングモードにて、観察を行った。試料担持基板は、HOPGでは乾燥時に試料が凝集してAFM測定ができなかったが、マイカでは分散性が良く、観察に成功した。これらの試料は、透過型顕微鏡(Transmission Electron			

Microscope: TEM) 像との比較を行い、AFMではTEM像に類似した形状が観察され、更にTEMでは得られない三次元情報を得ることができた。また、AFMの測定原理で考えられている「Convolution Effect」も確認した。

脂質平面膜に関しては、ホスファチジルコリン (phosphatidylcholine: PC) やジパルミトイルホスファチジルコリン (dipalmitoylphosphatidylcholine: DPPC) 等の平面膜を水平力顕微鏡 (Lateral Force Microscope: LFM) にて形状像と摩擦力（水平力）像の取得に成功した。これらはコンタクトモードでの測定であり、試料が損傷しやすい。そこで、測定を常に引力領域で行って荷重を小さくしたので、損傷のない画像を取得できた。表面形状と摩擦力が同時にわかるのは他の顕微鏡にはない、AFMの大きな特徴であり、分子の配向等を考察する上で非常に貢献するものである。

リポソームに関しては、液中AFMコンタクトモードによる観察を行った。リポソームは、生体膜モデルやDDS等を使用される脂質二重膜で、観察の必要性があったが、直径100-200nmの粒子を光学顕微鏡では観察できず、これまで電子顕微鏡等により、乾燥状態またはレプリカでしか形状観察できなかった。本研究では、液中でリポソームが浮遊しないよう、免疫化学反応を用いて基板に固定して測定を行い、初めて液中観察に成功した。また、プローブであるカンチレバーからサンプルへの荷重を段階的に増加させ、基板に吸着していたリポソームを剥がすことも行った。これは、基板に対するリポソームの吸着力の理解へと繋がる。

角膜細胞については、生体由来組織と培養細胞を対象とし、ピークフォースタッピングモードでの表面観察と硬さ測定を行った。内皮細胞組織では、グルタルアルデヒド処理の影響を形状と硬さについて測定した。培養角膜上皮細胞には、防腐剤として点眼薬に使用されている、塩化ベンザルコニウムを暴露後、細胞の形態及び硬さを約60分間測定し、ダイナミクスを取得することができた。

SPMの装置の発展とともに、試料調製、測定方法などの工夫・探索をすることで、生体材料の観察が可能となり、他の顕微鏡では得られない三次元情報、表面の機械物性等を取得することができた。今後も、生体材料の評価に、SPMが大きく貢献することが期待される。

－以上－

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(論文博士)

論 文 要 旨 (英 文)

(300語程度)

(Summary)

報告番号	乙 第	号	氏 名	Teiko Seki
”Observation and evaluation for molecular assembly and cells using scanning probe microscopy” (要 旨) Scanning Probe Microscopes (SPM) is a microscope for obtaining 3-D images of a sample surface at a high resolution. In the semiconductor industry, SPM is used as one of the established evaluation techniques and makes a large contribution to the semiconductor production. In the field of polymer science, it is used for the measurement method of material properties as well as surface topographies in various stages of the functional material development. However, the application of SPM to biological samples is limited, although the SPM’s capability of measuring samples in air and liquid has been regarded quite promising compared with the electron microscopy which requires vacuum. This thesis deals with SPM measurements of biological samples which is yet to be established. The target samples are structural protein, synthesized peptide, lipid membrane, and living cells. For these samples, 1) observation methods, which include sample preparation and measurement parameter settings, 2) kinds of information to be acquired, are clarified for the purpose of making the SPM observation of biological samples easier and contributing to application studies of biology. Appropriate selection of substrates for sample led success of the observation of the protein and synthesized peptide. For liposome particles, they were fixed to substrates by applying immunochemical reaction, and images were successfully obtained in liquid for the first time. Also effects of benzalkonium chloride, which is often included in eye drops as preservative, on the cultured corneal epithelial cells were evaluated by exposing the samples to benzalkonium chloride and continuously making AFM measurements for one hour. With the advancement of SPM instruments, observations of various biological samples were made possible, and their 3-D surface information and mechanical properties became available, which are not possible with other microscopes. The development of the sample preparation and measurement techniques were also indispensable for the successful observations. It can be expected that SPM continues to make a large contribution as the evaluation technique for bio-materials.				

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).