

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,小島 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)	要約
Type(English)	Outline

## [論文要約]

「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と評価」 関禎子

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。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。

本論文では、まず、大気中においてAFM測定および試料調製に関する基礎検討を行ない、AFM装置の信頼性の確認、測定に適するカンチレバーの選択、測定を可能にする基板の検討を行った。一般に、球状タンパク質や繊維状タンパク質では、分子内部に疎水性アミノ酸、分子表面に親水性アミノ酸が分布する傾向にあり、これらの試料の場合、AFM測定の基板としては親水性基板の方が適していることを実験より明らかにした。AFM動作モードに関しては、同じペプチド試料をコンタクトモードとタッピングモードで測定することにより得られた画像を解析し、タッピングモードの方が良好なデータが得られることを明らかにした。また、水平力顕微鏡(LFM)においては、脂質膜やタウタンパク質の形状像と摩擦力像の同時取得に成功し、タウタンパク質の摩擦力像では形状像では得られない微細

構造を検出し、タウタンパク質の基本単位構造を示唆する画像を得、超分子構造体ユニットモデルを構築した。

次に、大気中での基礎検討に基づき、液中測定への応用として、リポソームの観察、角膜上皮細胞及び内皮細胞組織の評価、および培養角膜上皮細胞への薬品の影響について検討を行った。コンタクトモードによるリポソームの観察は、免疫化学的手法を用いて基板に強固に固定することにより成功し、また、探針への荷重の変化に伴う試料の損傷観察より、重要であるのは荷重ではなく、探針の先端曲率半径を考慮した接触圧力であることを明らかにした。生体試料の固定に一般的に使用されるグルタルアルデヒドの試料に与える影響については、AFMを用いた角膜内皮細胞組織の形状および弾性率変化より評価したところ、薬剤暴露時間が長いほど、試料が収縮し、弾性率が高くなることを示した。また、防腐剤として使用される塩化ベンザルコニウムの細胞への影響を、培養角膜上皮細胞が収縮していく経時変化を測定することにより明らかにした。その際、細胞と同時に培地のコラーゲンの形状も観察可能であったことから、細胞と細胞外マトリックスとの関連の研究にAFMが大きく貢献すると思われる。

生体材料のSPM観察において重要なのは、まず、観察対象のサイズに合った平坦さを有する基板の選択、そして電荷を持つ試料の場合は、反対の電荷の、またはそうなるべく改変した基板への吸着。測定動作モードは主にタッピングモードが適している。SPMにより得られる知見は、大気中、液中での3次元情報のみならず、適切な条件設定をすれば、弾性率等の機械物性、またこれらの経時変化も得られる。SPMを従来の様々な顕微鏡法および分析法と組み合わせることにより、生物系の研究において強力な解析方法となることが期待される。