

京都大学	博士 (工学)	氏名	寺田 大紀
論文題目	Ultra-small diamond quantum sensor for bioapplications (生物学応用のための超小型ダイヤモンド量子センサー)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>分子・細胞生物学者の関心事は、生物の基礎構成単位である細胞内で「どんな物理化学現象が」「いつ」「どこで」「どのように」「どの程度」起きているかを正確に定量することにある。その疑問に答えるために開発された一例が蛍光顕微鏡であり、観察対象とする生体分子への蛍光プローブ標識を介し、生細胞内で生体分子の動態を一分子レベルで可視化してきた。近年、新規蛍光プローブとして、窒素-空孔中心 (NV センター) をもつ蛍光性ナノメートルサイズ・ダイヤモンド (FND) が注目を集めている。FND は、炭素骨格から形成されるために細胞毒性が低く、30 nm 程度のサイズであれば退色・明滅のない極めて安定な蛍光を発する。注目すべきはその蛍光特性と磁気共鳴技術との組み合わせにより、「温度」「磁場」「電場」「pH」といった物理量を定量できる点にある。つまり、FND を観察したい生体分子に繋げれば、位置情報と微小空間の物理量を同時に取得可能な量子センサープローブとしての活用が期待できる。本論文は、この FND 量子センサープローブによる細胞イメージングを目標とし、FND の機能化技術に関する研究結果をまとめたものであり、3 章から構成されている。</p> <p>第 1 章は、5 nm サイズダイヤモンド・量子センサーの効率的な作成を意図し、その強い凝集性を克服して水溶液中に単分散化させる化学処理技術について記述している。従来は高温高圧法により作製された 20~100 nm サイズダイヤモンドが量子センサープローブとして主に使用されてきた。一方で、そのような大径粒子の使用は、標識可能な生体分子に大きな制約をもたらす。一般的に使用されている蛍光タンパク質の大きさ (5 nm 程度) を鑑みると、これと同程度のサイズが理想とされる。そこで本章では爆轟法により作製された 5 nm サイズダイヤモンドに空気酸化と酸処理 (<math>\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3=3:1</math>) を組み合わせた化学処理技術を施し、この単分散体溶液を作製することに成功している。</p> <p>第 2 章では、窒素-空孔中心を導入する電子線照射技術を 5 nm サイズダイヤモンドに適用し、NV センターの濃縮に成功している。加えて第 1 章の化学処理技術を応用し、NV センターが濃縮された 5 nm サイズダイヤモンドの単分散溶液の作製を実現している。一般的な NV センターの作成方法は、1) 電子やイオンの照射による空孔の作製、2) その空孔の窒素への隣接のためのアニーリング処理 (800 °C、真空中)、の 2 段階で構成されていた。2 MeV、<math>5 \times 10^{18} \text{ cm}^{-2}</math> の電子線照射後、照射前の 5 nm サイズダイヤモンドと比較し 4 倍の NV センター濃度を有することを確認し、かつアニーリング前後で NV センター濃度に変化は見られなかった。5 nm サイズダイヤモンドでは一般的な NV センター形成機構と異なり、1 段階で NV センターが形成していることが明らかとなった。また、電子線照射により形成したマイクロメートルサイズの 5 nm ダイヤモンド凝集体に対し、第 1 章の化学処理技術を使用して単分散溶液を得ることに成功している。化学処理後の 5 nm ダイヤモンド凝集体から光検出磁気共鳴シグナルが観察され、量子センサープローブとしての機能を確認した。</p> <p>第 3 章では、生理条件下で FND を観察対象の生体分子に選択的標識するための簡便な表面修飾方法を記述している。sp<sup>3</sup> 炭素結合からなるダイヤモンド構造に由来する FND の表面疎水性により、生理条件下で FND は凝集し、非特異的に生体分子に吸着する。これは観察対象である生体分子の標識を阻害する。そこで、親水性を向上させる超分岐鎖ポリグリセロールによる被覆とその末端 OH 基を COOH 基に変換する簡便な</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	寺田 大紀
<p>表面修飾方法を開発した。COOH 基を介した抗体等の結合により、標的生体分子を認識できるように設計した。表面修飾を行った FND は、生理条件下でも高い分散性を維持し、生体分子への非特異的な吸着の抑制に成功した。また、FND の量子センサーとしての機能確認を意図し、FND をエレクトロポレーションにより生細胞に導入し温度計測を試みた結果、15 分の時間分解能・1~2 K 程度の温度誤差で計測が可能であることを示した。</p> <p>つづく結論において本論文で得られた成果について要約している。</p>			

## (論文審査の結果の要旨)

本論文は、窒素-空孔中心 (NV センター) を保有する蛍光性ナノメートルサイズ・ダイヤモンド (FND) を量子センサープローブとして細胞イメージングに活用することを目標とし、FND の機能化技術の開発を行った結果をまとめたものである。得られた主な成果は次の通りである。

1. 5 nm サイズダイヤモンド・量子センサーを作成するために、強い凝集性を有する 5 nm サイズダイヤモンドを水溶液中に単分散化させる化学処理技術を開発した。空気酸化と酸処理 ( $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3=3:1$ ) を組み合わせた化学処理技術は、5 nm サイズダイヤモンド表面をカルボキシ基やケトン基をはじめとする酸性基の導入を可能とする。この結果、水中で高い負電荷 (ゼータ電位=約-40 mV) を示し、静電反発により安定な 5 nm サイズダイヤモンドの単分散体溶液を与える。また、酸処理によりダイヤモンド合成時のコンタミネーションである鉄などの金属イオンの除去にも成功している。
2. 空孔を導入する電子線照射技術を 5 nm サイズダイヤモンドに応用することで、NV センターの濃縮に成功している。2 MeV,  $5 \times 10^{18} \text{ cm}^{-2}$  の電子線照射により、元の 5 nm サイズダイヤモンドと比較し 4 倍の NV センター濃度に濃縮した。また、窒素と空孔を結合させるアニーリング前後で NV センター濃度に変化がないことから、5 nm サイズダイヤモンドでは一般的な NV センター形成機構と違った機構で NV センター形成され、アニーリングを必要とせずに NV センターの濃縮が可能であることを明らかにした。この NV センターが濃縮された 5 nm ダイヤモンド凝集体をもとに、化学処理技術を使用して単分散体が作製され、量子センサープローブとしての機能の確認に成功した。
3. FND を観察対象である生体分子に選択的標識するための簡便な表面修飾方法を確立した。表面修飾していない FND は、生理活性溶液中で凝集し非特異的に生体分子に吸着する一方で、親水性を向上させるカルボキシ基化超分岐鎖ポリグリセロールを表面修飾した FND は高い分散性を維持し、生体分子への非特異的な吸着を抑制できることが確認された。また、FND を生細胞に導入し温度計測により、量子センサーとしての機能の確認を行った。その結果、15 分の時間分解能・1~2 K 程度の誤差で局所温度の計測が可能であることを示した。

本論文は、FND を量子センサーとして活用するために必要な機能化技術についてまとめたものであり、学術上、寄与するところが少なくない。よって本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 2 年 2 月 14 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行い、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。