

京都大学	博士（工学）	氏名	井戸 慎一郎
論文題目	周波数変調原子間力顕微鏡を用いた生体分子のナノスケール固液界面構造計測		
（論文内容の要旨） 次世代のエレクトロニクス技術の確立に向けて、限界を迎えつつあるトップダウン型の微細加工プロセスから、ボトムアップ型のプロセスへの転換が迫られている。その実現のための有力な手法のひとつとして、生体分子の自己組織化現象を利用する方法があり、ナノバイオテクノロジーと呼ばれる分野において現在活発な研究が行われている。ナノバイオテクノロジーのさらなる発展のためには、生体分子の機能に 관련된構造を精密に計測する必要があるが、分子生物学で伝統的に用いられてきた構造計測手法である X 線回折や電子顕微鏡は、生体分子が機能を発現する水中の計測が困難であるなど様々な制約を有していた。一方、走査型プローブ顕微鏡（SPM）技術の一種である原子間力顕微鏡（AFM）は、測定環境や観察可能な試料に対する原理的な制約が存在しないため、水中で動作するナノバイオデバイスの特性をその場で評価可能な数少ない技術のひとつとして近年大きな注目を集めている。しかしながら、従来の AFM による生体分子の水中構造計測は、空間分解能の制約により生体分子のサブ分子レベルの構造に関して新たな知見を与えることは少なかった。また、計測の際の強い相互作用によって、生体分子が天然構造から変形する問題も指摘されている。相互作用の制御性に関しては、周波数変調 AFM (FM-AFM) の開発によって大きく改善された。また、近年における FM-AFM 装置系の雑音低減の達成により、空間分解能が飛躍的に向上したため、FM-AFM を用いた生体分子に対する非破壊的な水中構造計測には大きな期待が集まっている。 本論文は水中で動作する FM-AFM を、DNA やタンパク質分子など様々な生体分子のナノスケール固液界面構造計測へと応用した結果をまとめたものであり、6 章からなっている。 第 1 章は序論である。はじめに、研究背景として次世代のエレクトロニクス技術におけるナノバイオテクノロジーの重要性について説明している。次に、ナノバイオテクノロジーを支える生体分子の構造計測技術について概観し、従来技術の問題点を指摘している。そのうえで、ナノバイオテクノロジーのさらなる発展のためには、AFM を水中における種々の生体分子のナノスケール構造計測へと応用することが必要であることを述べている。 第 2 章では、AFM を中心とした SPM 技術の概要が述べられている。はじめに、AFM において探針と試料との間に働く種々の相互作用について説明したうえで、これらの相互作用力を検出するために AFM で用いられる要素技術について述べている。特に本論文で用いられた周波数変調検出方式の AFM (FM-AFM) については、液中環境で使用する際に生じる問題点とその解決のために用いた方法を具体的に説明している。 第 3 章は、プラスミド DNA を水中で FM-AFM 観察した結果について述べられている。はじめに広域観察結果を示し、超らせん状態などプラスミド DNA の巨視的な構造が観察できていることを説明したうえで、高分解能観察結果ではプラスミド DNA が水中で形成する B 型の二重らせん構造が、主溝と副溝を明瞭に分解して観察できていること			

京都大学	博士（工学）	氏名	井戸 慎一郎
を述べている。また、FM-AFM 像の断面プロファイル解析によって、観察されたプラスミド DNA の直径は B-DNA の直径とほぼ一致していることを示し、探針-DNA 間の相互作用による DNA の天然構造からの変形は生じていないことを述べている。続く節では、FM-AFM で観察された B-DNA の表面構造と真の構造とを正確に比較するために用いた AFM 像のシミュレーションの概要とその結果について説明している。実験とシミュレーションの比較によって、FM-AFM 像において DNA バックボーン表面に観察された凹凸の繰り返し構造は糖-リン酸からなる主鎖の周期構造に対応していることを示し、個々の官能基を分解できる程度の高い分解能で FM-AFM 測定が行えていると結論づけている。本章の最後に、ナノバイオテクノロジー応用へ向けた予備実験として行われた自己組織化 DNA ナノ構造の水中 FM-AFM 観察結果が述べられている。試料として DNA2 次元結晶の一種である DNA タイルを用いた水中 FM-AFM 観察結果から、DNA タイルを構成するサブユニット中の DNA の二重らせん構造と、ユニット結合部の湾曲した二重らせん DNA の構造が、主溝と副溝の配置を含めて観察できていることを説明している。 第 4 章では、FM-AFM を用いた 3 次元フォースマッピング法を用いて、バクテリオロドプシン (BR) 膜タンパク質分子表面の局所水和構造計測を行った結果が述べられている。はじめに、従来の 3D フォースマッピング法が原理的に接触測定となる点に言及し、探針と生体試料双方の破壊を回避するための手法上の改善点について説明している。そのうえで、BR 分子の 2 次元結晶膜である紫膜表面を対象として、2 通りのカンチレバー振動振幅条件を採用した 3D フォースマッピングを行った結果が述べられている。これら 2 つの異なる振幅条件間の測定結果が比較され、いずれも振動的な探針-試料間距離依存性を示す、界面水和構造に由来する水和力と分子表面の立体構造に由来する立体力が切り分けられることが説明されている。その結果として、C-D ループ近傍に局在した水分子の構造が水和力分布として計測されていると結論づけている。 第 5 章では、モノクローナル抗体分子を水中で FM-AFM 観察した結果が述べられている。はじめに、従来の抗体分子の構造計測は主に TEM や回折法が用いられてきたために、可動性に富む抗体分子の水中における構造については不明な点が多いことを指摘している。そのうえで、準生理的条件において抗体分子が基板表面において自己組織的に会合し、秩序的な 2 次元結晶を形成する現象を FM-AFM 観察によって明らかにした結果が述べられている。また、溶液条件の詳細な検討に基づき、水中における分子間相互作用を精密に制御することで、抗体分子の 2 次元結晶形成が再現性よく誘導できることを説明している。最後に、抗体分子の 2 次元結晶表面に抗原性の分子および構造が類似した非抗原性の分子の溶液を添加することで、抗体分子との特異的ないしは非特異的な吸着状態の FM-AFM 観察を行った結果について説明しており、抗原性の分子を含む溶液を添加した場合にのみ 2 次元結晶表面への多数の分子吸着が観察されたことから、2 次元結晶中で各々の抗体分子は免疫活性を維持していると結論づけている。 第 6 章は結論であり、本論文で得られた成果を要約するとともに、今後の展望を述べている。			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、将来的にナノバイオデバイス応用が期待される種々の生体分子を対象として、生体機能に相関した分子構造を水中で動作する周波数変調検出方式原子間力顕微鏡(FM-AFM)を用いてナノスケールで計測した成果についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. プラスミド DNA が水中で形成する B 型の二重らせん構造を、主溝と副溝を明瞭に分解して非破壊に水中 FM-AFM 観察することに成功した。また、AFM 像のシミュレーション結果と実験結果を比較することによって、FM-AFM 像における DNA のバックボーンに沿った周期的な凹凸構造がリン酸基の周期的な配置に対応していることを示した。
2. 自己組織化 DNA ナノ構造の一種である DNA タイルを作製し、その構造を FM-AFM を用いて水中観察した結果、DNA タイルを構成するサブユニット中のバンドル様の DNA 二重らせん構造と、ユニット結合部の湾曲した二重らせん構造を、主溝と副溝の配置を含めて観察することに成功した。
3. FM-AFM を用いた 3D フォースマッピング法によって、バクテリオロドプシン (BR) タンパク質分子の 2 次元結晶膜である紫膜表面に形成された局所的な水和構造を水和力分布として非破壊に計測することに成功した。
4. モノクローナル抗体 (IgG) 分子を対象とした水中 FM-AFM 観察によって、IgG 分子単量体の特徴的な Y 字形の構造を、Fab、Fc 各領域を定量的に識別して水中観察することに成功した。
5. 準生理的条件において、IgG 分子が自己組織的に会合し、秩序的な 2 次元結晶を形成することを水中 FM-AFM 観察によって明らかにした。また、IgG 分子 2 次元結晶と抗原性分子との相互作用を FM-AFM を用いて直接水中観察することで、2 次元結晶中の個々の IgG 分子は生体活性を維持していることを確認した。

本論文は、ナノバイオテクノロジー分野における今後の研究展開に不可欠な生体分子の水中におけるナノスケールの構造を明らかにしたものであり、学術上、實際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、平成 25 年 1 月 25 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、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。