



(様式 5)

指導教員 承認印	
-------------	---

2019年 12月 9日
Year Month Day

学位 (博士) 論文要旨
(Doctoral thesis abstract)

論文提出者 (Ph. D. candidate)	工学府博士後期課程 電子情報工学 専攻 (major) 2017 年度入学 (Admission year) 学籍番号 17834101 氏名 酒井 淳 (student WED No.) (Name) Sakai Atsushi  (Seal)
主指導教員氏名 (Name of supervisor)	村山 能宏
論文題目 (Title)	マイクロ空間で作られたゼラチンゲルの粘弾性およびナノ構造の変化
論文要旨 (2000 字程度) 分子量の大きな高分子が溶媒中で物理的・化学的に結合 (架橋) し、三次元的なネットワーク構造を形成した高分子ゲルは、我々の日用品に広く用いられている。中でもゼラチンなどの生体高分子ゲルは、その高い生体親和性により、薬剤輸送システム等の医薬品や食品の材料として活用されてきている。特に、界面活性剤膜で覆われたエマルション中でゲル化して得られる (乳化重合法) ミクロな生体高分子ゲルは、その大きな表面積/体積比により、周囲の環境変化に敏感に応答し、ゲル中に内包した薬物輸送など、より高度な機能材料として用いられている。このミクロな生体高分子ゲルの機能は、そのナノ構造とそれが決定する粘弾性に依存する。それゆえ、それらの制御が重要であるが、従来は 1 mm 以上の大きなバルクゲル、あるいはミクロゲルの分散溶液に対してのみ解析がなされてきた。しかし、上記で述べた乳化重合法により得られるミクロ生体高分子ゲルは、高分子がゲル化する過程で界面活性剤膜と接しており、その膜界面が生体高分子ゲルのナノ構造転移やその粘弾性へ強く影響することが予想される。そこで本研究では、最も汎用されている生体高分子ゲルであるゼラチンゲルを用い、乳化重合によりミクロゲルを作製し、その単体の粘弾性とナノ構造を解析することで、界面活性剤膜が及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。本研究により、ミクロ閉じ込めが生体高分子の構造相転移へ与える影響が導かれ、ゼラチンだけでなくその他の生体高分子ゲルに対する未知のゲル化過程におけるミクロ閉じ込めの寄与の解明が期待される。 従来、小さな物体の粘弾性測定には原子間力顕微鏡 (AFM) が用いられてきた。しかし、AFM は測定対象に探査針を押し込み粘弾性測定するため、液中で固定されていない物体や球形の物体の粘弾性を測定することは困難であった。そこで本研究では、ガラスキャピラ	

リー吸引による細胞の粘弾性評価法[1]を改良することで、マイクロゲル単体の表面ヤング率および粘弾性を測定する手法を確立した。

この手法を用いて、サイズの異なるエマルジョン中でゲル化させたゼラチン・マイクロゲルのヤング率を測定した。その結果、半径 50 μm 以下のマイクロゲルのヤング率は、同濃度で作製したバルクゲルよりも 10 倍以上高くなることを見出した[2]。この弾性率上昇は、エマルジョン表面を覆う脂質膜とゼラチンが相互作用した結果、ゲルのナノ構造が変化したためであると考察した。マイクロゲルのナノ構造がバルクゲルと異なる場合、弾性と粘性の相関関係がバルクゲルとは異なることが予想される。そこで、キャピラリー吸引の圧力を周期的に変化させることで、弾性を反映する貯蔵弾性率 E' と粘性を反映する損失弾性率 E'' の相関を調べた。その結果、マイクロゲルの E'' の値は同じ E' を持つバルクゲルよりも低くなることが分かった。

マイクロゲルに対するヤング率上昇と低粘性化を構造変化の観点から説明するため、マイクロゲルのナノ構造を CD スペクトルにより解析した。その結果、マイクロゲル中には通常のゼラチンゲルが持つ三重らせん構造だけでなく、 β シート構造も形成されていることが明らかになった。さらに、ゲルサイズと β シート構造の相関を解析するため、 β シートに特異的に結合し蛍光を発する Thioflavin-T を添加し、ゲル化させたところ、小さなマイクロゲルほど高い蛍光強度が生じた。このサイズ依存性はマイクロゲルのヤング率上昇のサイズ依存性と定性的に対応することから、一部が β シート化することがヤング率の上昇を招いたと考えられる。また低粘性に関しても、ランダムコイル部分が β シートすることにより物理的絡み合いが減少したことが予想されることから説明できる。

本研究では、ゼラチンが脂質膜で覆われたエマルジョン中でゲル化すると、ランダムコイルの一部が β シートへ構造変化することで、同濃度のバルクゲルと比べてヤング率の上昇と低粘性化することを見出した。これらのナノ構造の変化は脂質膜界面近傍だけでなく、マイクロ空間への閉じ込めによっても生じることが示唆された[3]。界面の効果によって生じた β シート構造が線維化の過程で他の分子を β シート化させることで、マイクロゲル全体に β シート構造が生じているのではないかと考えられる。

以上のマイクロ閉じ込めの効果が、他の生体高分子ゲルに対しても成り立つか否かを調べることで、従来の乳化重合法が生体高分子ゲルのナノ構造や粘弾性へ及ぼす影響が明らかになるはずである。それが明らかとなれば、ゲル化空間サイズを介した生体高分子ゲルの新たな粘弾性制御法が確立できる可能性が高い。また、本研究で確立したガラスキャピラリーによる小さな物体の局所的な粘弾性測定法は、今回の高分子マイクロゲルに限定されず、細胞や細胞組織などに対しても適応可能であり、高分子物理学やソフトマター物理学だけでなく生物学に対しても将来的に貢献できるはずである。

[1] M. Sato et al., *J. Bio. Eng.*, 1988

[2] A. Sakai et al., *ACS Cent. Sci.*, 2018

[3] A. Sakai et al., *NWEH REOR G*, 2019

(英訳) ※和文要旨の場合(400 words)

Polymer gels are formed by cross-linking polymers which forms a three-dimensional network structure. Biopolymer gels like gelatin have high biocompatibility and thus been utilized as daily necessities. Especially, biopolymer microgels prepared from an emulsion polymerization attract attention since they respond to external moduli since their surface-to-volume ratio is high.

Although the mechanical properties of the biopolymer microgels and their Nano-structures, quite important to regulate their functions measured as bulk gels or microgel suspensions. However, those of single microgels are still elusive. The effect of surfactant membrane surrounding the biopolymer droplets expects to change their structural transition upon gelation and accordingly their mechanical properties. Therefore, we aimed to reveal the effect of surfactant membrane on biopolymer microgels prepared inside microdroplets through the analysis of the viscoelastic properties and nanostructure.

For the mechanical analysis of single microgels, we developed a method using micropipette aspiration [1]. This is because the conventional method using atomic force microscopy (AFM) is inapplicable for measuring the viscoelastic properties of spherical microgels in a solution, since the AFM uses indentation of the probe.

Thus, we found that the gelatin microgels smaller than 50 μm in their radii have 10 times higher elastic modulus than corresponding bulk gels [2]. We considered that the surfactant membrane surrounding the gelatin droplets changed the nano-structural transition upon gelation. When the nano-structure changed, the relationship between elasticity and viscosity of the microgels should be different from those of bulk gels. Therefore, we measured the relationship between storage modulus E' reflecting elasticity and loss modulus E'' reflecting viscosity of microgel and compared with that of bulk gels. Then, we found that microgel have lower E'' than bulk gels which have the similar E' value. It strongly suggested that microgels and bulk gels have different nano-structure. To prove this, we measured nano-structure of them by Circular Dichroism (CD). As a result, microgel had not only triple helical structure but also β -sheet structure. We compared the amount of β -sheet structure by using thioflavin-T (ThT) that generates fluorescence reflecting the β -sheet structure. Then, smaller microgels had a higher intensity of ThT. We found that the structure change occurred even without attachment to surrounding surfactant [3]. The β -sheet structure formed at the surface is converted into a β -sheet together with other molecules in the process of fibrosis, so that the β -sheet structure is generated in the entire microgel.

These results are expected to contribute to control properties of micro sized gels or measure not only polymer gel but biological material like tissues.

[1] M. Sato et al., *J. Bio. Eng.*, 1988

[2] A. Sakai et al., *ACS Cent. Sci.*, 2018

[3] A. Sakai et al., *NWEH REOR G*, 2019