

研究報告書

「ケミカルマッピングを実現するナノ電気化学顕微鏡の創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 高橋 康史

1. 研究のねらい

X 線構造解析、電子顕微鏡の発展に伴い、細胞の微細な構造が明らかとなり、細胞の構造と機能をシームレスで結びつける研究が急務とされている。特に、動的に変化を続ける細胞の局所的な化学情報の定量評価は、質量分析のように時間分解能を有さない技術では困難である。そのため現状では、細胞の機能維持に關与する化学物質の動的な分布を明らかにできず、静的な情報の張り合わせから化学変化を推定している。

細胞のストレスに対する応答時間は、数 ms で起こる神経伝達物質の放出から、数日で生じる遺伝子レベルの変化まで幅広く、また細胞を構成する微小器官を経時的に評価するには、細胞の局所にストレスを与える“摂動技術”と、低侵襲かつ局所的な分析技術の融合が不可欠である。走査型プローブ顕微鏡では、ノンラベルでナノスケールのイメージングとプローブを利用したサンプルへの刺激が可能である。そこで、本研究では、電気化学および形状計測を可能とするナノ電気化学顕微鏡を開発し、細胞の“機能マッピング”を試みた。

2. 研究成果

(1) 概要

動的な細胞表面、膜界面、細胞内の化学物質の変化を評価するため、走査型プローブ顕微鏡の先端に電気化学センサーを搭載した顕微鏡を開発した。また、一般的な走査型プローブ顕微鏡では、プローブとサンプルとの距離を一定に保つため、フィードバックシグナルとして、“力”を計測するが、細胞など軟らかいサンプルの計測は困難であった。そこで、“イオン電流”をフィードバックシグナルとして計測する走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)を利用し、そのプローブに、電気化学センサーを搭載した。

電気化学センサーとして、数十ナノスケールの電極、高感度な電気化学計測を実現可能な電気化学メッキ電極、ケミカルFETの開発を行った。また、イメージングの際に、生体分子の分布も同時にとらえるための自作の共焦点顕微鏡との融合技術も開発した。さらに、イオン電流を高速、高感度に計測するための微小電流計測機や、ナノスケールのプローブの位置制御の高速化を実現するため、ピエゾステージに関しても独自に開発した。さらに、細胞近傍の3次元的な化学物質の広がりを評価するため、新たな測定方法を開発した。

このような要素技術の開発により、従来 20 分ほどかかっていた計測時間を 30 秒まで短縮することに成功した。また、化学物質の取り込みや、単一細胞内での遺伝子の発現状態の評価、成長因子などの刺激前後の細胞の動きの変化を可視化した。

(2) 詳細

研究項目① “対話型”分析システムの開発

海馬の神経細胞は、シナプスでのシグナル伝達やカーゴ輸送により、構造や機能変化を生じている。これまで、ケージド化合物を利用したグルタミン酸刺激により、スパイン（ポストシナプス）の形状変化や Ca^{2+} 濃度変化が観察されてきた。本研究では、この神経細胞のダイナミックな構造変化とその際に生じる化学的な変化(pH, ATP, 遺伝子発現)をリンクさせ、シナプス1つを対話的に操作する分析技術の開発を目指した。具体的には、イメージングの高速化と、化学物質の高感度計測プローブ、蛍光計測とプローブ顕微鏡の融合技術、局所刺激技術の開発を行った。イメージングに関しては、神経細胞のように凹凸が著しいサンプルは、通常のプローブ顕微鏡では、計測が困難であるが、新規アルゴリズムの開発により、劇的に計測時間を短縮させ(*Anal. Chem.* 2017, 89, 6015.)、カーゴ輸送を可視化することができた。化学物質のセンシングに関しては、電気化学計測の高感度化に取り組み、電気化学メッキ(*Anal. Chem.* 2015, 87, 3484.)やケミカル FET(*Acs Nano* 2016, 10, 3214.)の開発により、数十 nM レベルのATP計測を実現した。また、蛍光技術との融合として、自作の共焦点顕微鏡をプローブ顕微鏡に融合させることで、カーゴ輸送による輸送される分子を識別可能とした。また、局所刺激に関しては、電気化学シリンジ技術を確認することで、fM レベルの試薬の投与や溶液・細胞質の回収を可能とした。今後、これらを組み合わせて、ダイナミックな変化と化学物質の濃度プロファイルの変化をリンクさせ、細胞機能を人為的に操作できるシステムに拡張させたいと考えている。

研究項目② 細胞膜界面でのケミカルマッピング

申請者らが開発した膜タンパク質の局所電気化学計測法は(*Anal. Chem.*, 2009, 81, 2785.)、膜タンパク質の位置について、細胞膜内外を明瞭に識別して評価できる。この技術を、癌の増殖と関わりがある皮成長因子受容体(EGFR)の発現状態の連続計測へと応用した。具体的には、EGFR の電気化学計測のための標識にアルカリフォスファターゼ(ALP)を用いてきたが、pH 9.5 で計測を行っていたため、連続計測が困難であった。そこで、計測に利用する緩衝溶液の選定、酵素のラベリング方法の検討を行い、EGFR の内在化に伴う細胞表面での発現状態を連続的に計測する技術を確認した(*in preparation*)。

SICM は、生細胞の表面で生じるエンドサイトーシスを連続的に計測することが可能であり、京都大学二木教授とのアルギニンペプチドの取り込みに関する共同研究により、アルギニンペプチドが取り込まれやすいサイトが細胞上に存在し、その部分が形状変化を起こしていることを可視化した(*Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 56, 7644.)。さらに、細胞極率を変化させる化学物質を投入した際に生じるサブマイクロスケールの微絨毛によく似た構造物の形成を確認することができた。

また、近年メカノセンサーとしての機能が注目されている一次繊毛に関しても、形状イメージングを行い、繊毛の根元に存在するシリアポケットを可視化することができた(*in preparation*)。繊毛の伸縮とシリアポケット近傍の構造変化を連続的に捉え、さらに、繊毛付近のATPが、センサーとしての機能と密接に関係していることが予想されるため、ATP

のセンシングも検討している。

さらに、細胞近傍の化学物質の濃度プロファイルを3次的に可視化するアルゴリズムを開発し、細胞近傍における酸化還元物質の分布と、イオン電流の分布を可視化することにも成功した(*Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, 19, 26728.)。

研究項目③ 細胞内のケミカルセンシング

プローブを細胞内へ挿入して、細胞内の化学物質や遺伝子発現状態の不均一性を評価する技術を確認した。具体的には、ATPの計測に関しては、心筋細胞内へ独自開発を行った ATP 計測用のケミカル FET プローブを挿入して、心筋細胞内の ATP の計測を行った。また、細胞内の mRNA の局所回収・分析では、SICMによる形状イメージングを行った後で、ナノピペットを任意の位置に自動で配置して、回収を行った(*Acs Nano* **2016**, 10, 6915.)。この際に、通常ナノスケールのピペットでは、開口が小さいために、高い圧力をかけて細胞質を回収する必要があり、微調整が困難である。そこで、ナノピペット内に有機電解液を入れ、試料が存在する溶液とピペットとの間に、油水界面を形成し、この状態で電圧を印加すると界面張力による微小容量の細胞質の回収を実現した。アクチン関連の mRNA である *Actb* に関して、細胞の縁部分での発現状態が高いことを明らかにした。

3. 今後の展開

サブマイクロスケールの化学物質の計測を微小電極により実現可能としたが、ナノスケールの領域で nM レベルの化学物質を計測するには、単分子計測レベルの高精度な計測が要求され、そのようなニーズを実現するための新たなセンサーの開発を進めるとともに、シナプスなど、神経伝達物質、ATP、pH など様々な化学物質の濃度変化が生じる領域において、時空間的に化学物質の濃度プロファイルを取得し、細胞の制御機構を明らかにしていきたいと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

予定していた要素技術開発は、ほぼ完成することができた。また、開発した装置により、遺伝子の局所回収や、成長因子による刺激後の細胞の形状変化の観察、アルギニンペプチドの膜透過性の評価、繊毛の形状観察、神経細胞の構造変化なども行うことができた。また、化学物質の計測に関しては、微小電極にとどまらず、FET センサーの開発により、高感度な化学センシングを行うことを可能とした。このような技術開発により、これまで平均値や特定の状態をスナップショットで捉えられてきた細胞の活動を、シームレスに評価することを可能とし、細胞の複雑な制御機構の解明につながることを期待できる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバック、1 期生成果評価会での総括・AD 間の議論を踏まえ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

細胞の形態をリアルタイム観察しながら、高感度・高速・実時間で細胞外化学物質の時空間的プロファイルを計測しイメージングするという、光学顕微鏡とは全くことなる情報を取得することのできる originality の高い尖った顕微鏡技術を開発しました。さらにナノピペットを利用して細胞の化学物質や遺伝子を分取し、極微量の発現解析も達成しています。当初の目的を越えるような十分な成果を達成しています。このような新しい技術の開発は、基礎研究の進展や科学技術の創生に大いに貢献することが期待できます。生物学者との共同研究をさらに進めて、この装置、ツールの有用性をアピールし、普及に努めて欲しいと思います。

さきがけ研究の途中で移動し独立する経験をしながらも、複数の研究課題を同時並行的に成功裏に進展させ、多数の質の高い論文にまとめあげるなど研究運営手腕にも高いものが認められます。国内外から多数の講演に招待され、更には平成 28 年に文部科学大臣賞若手科学者賞するなど多数の団体から表彰を受けていることは、この分野に大きく貢献していることを示すものであると考えます。多数の研究者と興味深い共同研究を始めており、新たな知見も得られつつあり、今後の進展が期待されます。

5. 主な研究成果リスト

(1) 主要な論文(原著論文)発表

1. Ida, H.; Takahashi, Y. ; Kumatani, A.; Shiku, H.; Matsue, T., High Speed Scanning Ion Conductance Microscopy for Quantitative Analysis of Nanoscale Dynamics of Microvilli. <i>Anal. Chem.</i> 2017 , <i>89</i> (11), 6015–6020.
2. Murayama, T.; Masuda, T.; Afonin, S.; Kawano, K.; Takatani– Nakase, T.; Ida, H.; Takahashi, Y. ; Fukuma, T.; Ulrich, S.; Futaki, S., Loosening of Lipid Packing Promotes Oligoarginine Entry into Cells, <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> 2017 , <i>56</i> , 1 – 7.
3. Takahashi, Y. ; Kumatani, A.; Shiku, H.; Matsue, T., Scanning Probe Microscopy for Nanoscale Electrochemical Imaging. <i>Anal. Chem.</i> 2017 , <i>89</i> , 342–357.
4. Zhang, Y.; Clausmeyer, J.; Babakinejad, B.; Lopez Cordoba, A.; Ali, T.; Shevchuk, A.; Takahashi, Y. ; Novak, P.; Edwards, C.; Lab, M.; Gopal, S.; Chiappini, C.; Anand, U.; Magnani, L.; Coombes, R. C.; Gorelik, J.; Matsue, T.; Schuhmann, W.; Klenerman, D.; Sviderskaya, E. V.; Korchev, Y., Spearhead Nanometric Field–Effect Transistor Sensors for Single–Cell Analysis. <i>Acs Nano</i> 2016 , <i>10</i> (3), 3214–21.
5. Nashimoto, Y.; Takahashi, Y. ; Zhou, Y.; Ito, H.; Ida, H.; Ino, K.; Matsue, T.; Shiku, H., Evaluation of mRNA Localization Using Double Barrel Scanning Ion Conductance Microscopy. <i>Acs Nano</i> 2016 , <i>10</i> (7), 6915–22.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件 (公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表/招待講演

1. **Takahashi, Y.**, Nanoscale electrochemical imaging by scanning probe microscopy, International Workshop: New Electroanalytical Techniques and Their Emerging Applications (IWNET-2017), Xi'an, China. 2017年9月26日
2. **Takahashi, Y.**, Multifunctional Scanning Ion Conductance Microscopy for Single Cell Analysis, Meeting of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology, Bochum, Germany. 2017年9月23日
3. **Takahashi, Y.**, Development of High Resolution Scanning Electrochemical Microscopy for Single Cell Analysis, Pittcon 2017, Chicago, USA. 2017年3月8日

主な受賞

- | | | |
|---------|-----------------------------|-------------------------------------|
| 1. 高橋康史 | 電気化学会 進歩賞・佐野賞
電気化学顕微鏡の創成 | ナノスケールの固液界面計測を実現するナノ
2016年3月30日 |
| 2. 高橋康史 | 文部科学大臣賞若手科学者賞
計測に関する研究 | ナノ電気化学顕微鏡の創製と固液界面
2016年4月20日 |
| 3. 高橋康史 | バイオインダストリー奨励賞
化学顕微鏡の開発 | 超解像ケミカルイメージングを実現する電気
2017年10月11日 |

著作物

1. **高橋康史**、”高解像度走査型電気化学顕微鏡の開発”、化学と工業、**2016**, 69, 777-779.
2. **高橋康史**、”ナノスケールの形状・化学物質濃度プロファイルを可視化するナノ電気化学顕微鏡の創生”、生物物理、**2016**, 56(3), 179-180.