

研究報告書

「ナノダイヤモンドによる三次元構造動態イメージング技術の創成」

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: 五十嵐 龍治

1. 研究のねらい

本研究の目指すところは、1細胞の表現型・機能・個性を真に理解するために細胞内の一分子および単一オルガネラの構造動態を三次元的に活写する計測基盤技術を構築することである。このためには、細胞内の各々のマイクロコンポーネントについて動的構造を極限精度で、しかも「三次元」的に計測することこそが最も直接的かつ効果的な道筋である。

近年、蛍光感度で磁気共鳴現象を計測する新たな技術として、ダイヤモンド NVc における光検出磁気共鳴法(ODMR)が注目されている。ODMR は、光ポンピングにより高偏極したスピン状態の変化を光により検出する一分子感度の磁気共鳴計測技術である。申請者はこのダイヤモンド NVc のもつ ODMR 特性に着目し、申請者独自の技術として、三次元的な構造動態計測を行うための計測原理の開発を進めてきた。その結果、一分子計測に応用可能な単一 NVc 感度の ODMR 顕微鏡を開発することに成功した。またその過程で、スピンハミルトニアン のゼーマン項に注目し、外部磁場と NVc 電子スピンの相対方位によって外部磁場-NVc 間のゼーマン相互作用が一意に決まることに行き着いた。また、NVc のこの性質を活用することで、ナノダイヤモンド粒子の姿勢を $\pm 3^\circ$ の精度で決定可能であることを示した。

本研究では、ODMR 顕微鏡技術を細胞内の一分子・単一オルガネラの構造動態計測に応用し、1細胞の表現型・機能・個性の深い理解を目指した。具体的には Mechanome の解析への寄与を目指し、三次元構造動態のライブセルイメージングを行うための計測基盤技術を構築する。その中でも、特に細胞内の力の伝達に着目し、ナノダイヤモンドで細胞内分子を標識する技術と、in situ で1細胞内ナノ計測を行うための方法論を確立することが本研究のねらいである。

本研究の開発した計測手法は、これまで検出困難であった細胞内の一分子および単一オルガネラの構造動態の多次元情報がリアルタイムで精密計測可能となる。従って、1細胞の表現型・機能・個性を深く理解する上で極めて有用かつユニークな計測基盤技術であると考えている。更に、一分子レベルでの構造動態を精密計測する研究目的から、薬剤スクリーニングなど合理的に進めるための新たな創薬プラットフォームを提供する可能性もあり、基礎生命科学への応用からバイオテクノロジー、医療応用まで幅広い影響が期待できる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、ナノダイヤモンドによって生細胞内の生体分子やオルガネラの多次元動態計測や物理化学パラメータの取得を実現するために、(1)ナノダイヤモンドによる in situ 標識技術の確立、(2) 高速 ODMR 計測技術基盤の確立、(3)研究テーマ1および2を活用した生命計測技術基盤の確立を行った。

(1)については、粒子径 50 nm のナノダイヤモンドに対して僅か 5 nm 膜厚の超分岐ポリグリセロール(HPG)層で十分な水溶液分散性と非特異吸着の排除能を得るための表面コーティング手法を開発し、抗原-抗体系やビオチン-アビジン系を利用した分子標識、BL タグとの融合タンパク質を用いた細胞内 in situ 標識、ターゲティングペプチドを用いたアクチン線維への標識など、ナノダイヤモンドを用いた特異的分子標識技術の開発に成功した。更に、粒子径 5 nm の爆轟ナノダイヤモンドを改良し、量子センサーとして活用するための手法を確立した。

(2)については、ODMR 計測技術の時間分解能を既存技術(数分程度)と比較し大幅に向上させるため、「蛍光ナノダイヤモンドの高輝度化」と「装置の高感度・高速化」を推し進めた。その結果、ナノダイヤモンドの電子線照射条件、焼成処理条件、表面処理条件の最適化に成功し、バルクのダイヤモンド基板に匹敵する ODMR 信号強度を与えるナノダイヤモンドを幅広い粒子径について安定して得ることが可能となった。また超高速 EMCCD とハイパワーの光励起半導体レーザー、更に FPGA を活用した EMCCD とマイクロ波発振器のシームレスな同期処理を行うことで、ビデオレートオーダーの時間分解能で ODMR 周波数スペクトルを取得し、細胞でナノダイヤモンド標識した計測対象の三次元構造動態や温度などの物理パラメータをリアルタイム計測することが可能となった。

(3)については、膜タンパク質動態のリアルタイム計測、一分子構造動態の多次元計測、細胞内分子集団のナノ動態計測、生細胞内ミトコンドリア温度変化のナノ計測、酵素反応熱のナノ計測など、多様な生物学的計測への応用を行うことに成功した。特に細胞内分子標識と多次元動態計測を活用することで、細胞骨格における力の細胞内伝搬の可視化に成功した。この計測手法は機械刺激に対する分子-細胞-生物個体の間の制御・応答機構の解明に寄与すると期待している。

(2) 詳細

研究テーマ1「ナノダイヤモンドによる in situ 標識技術の確立」

本研究の最大の目標の1つは、ナノダイヤモンドをイメージングプローブとして十分活用し得るものにするることである。しかし、ダイヤモンド表面は熱混酸処理などを行った場合でも大部分が疎水的な水素終端になるため、水溶液中での分散性の低さや生体分子との非特異吸着が問題となり特異的な分子標識や細胞標識を行うことは困難である。そこで、本研究では着手段階から、非特異吸着と凝集を排除するために、超分岐ポリグリセロール(HPG)によるナノダイヤモンドの親水化表面コーティングを用いる手法に着目してきた。本研究では、まずこの方法がタンパク質や細胞への非特異吸着を回避する極めて有効な手段であること、HPG 化ナノダイヤモンドを抗体修飾することにより分子特異的ナノダイヤモンド標識することが可能であることを示した。しかし、既存の手法では十分な親水化ナノダイヤモンドを得るために数十ナノメートル程度の HPG 層必要であったため、HPG 化の手法を大幅に改良した。その結果、粒子径 50 nm のナノダイヤモンドに対して僅か 5 nm 膜厚の HPG 層で十分な親水性が得られる HPG 化手法の開発に成功した。ナノダイヤモンドによる特異的分子標識技術についても、抗体を用いる手法以外にも、ビオチン-アビジン系を利用した分子標識、BL タグとの融合タンパク質を用いた細胞内 in situ 標識、ターゲティングペプチドを用いた生細胞内分子やオルガネラへの標識などいくつかの手法の開発に成功した(図1、図2)。

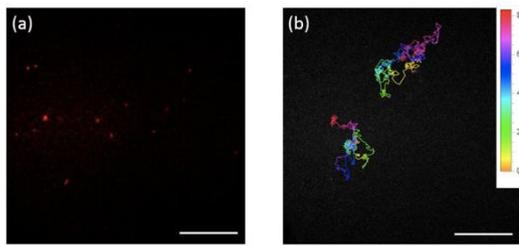


図1 (a) アンピシリン修飾HPG化ナノダイヤモンドで特異的標識した単一生細胞表面のBLタグ融合IL-18受容体。(b) ナノダイヤモンドによるIL-18受容体の細胞膜上トラッキング。
スケールバーは10 μm 。

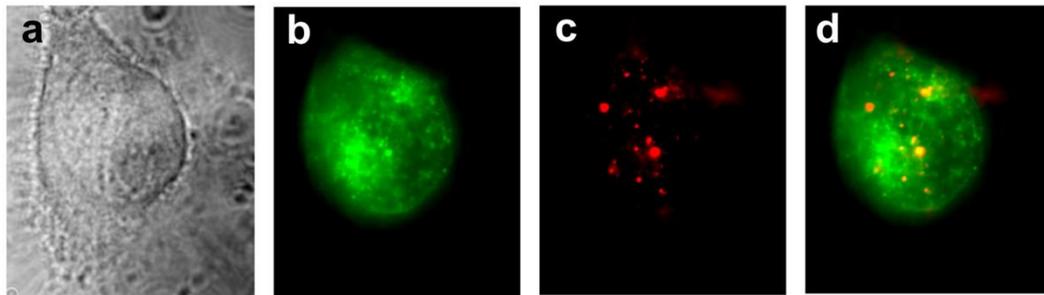


図2 NLS 修飾ナノダイヤモンドによる核標識。それぞれ明視野像(a)、NucSpot Live 488による核染色(b)、ナノダイヤモンド NV 中心(c)、および(b)と(c)のマージ(d)。

更に、分子計測用のイメージングプローブに適したサイズの蛍光ナノダイヤモンドを得るために、粒子径 5 nm の爆轟ナノダイヤモンドの実用化に向けた取り組みを行った。この結果、末端官能基を改良することにより 10%程度の高い ODMR 信号を与える蛍光ナノダイヤモンドが得られること、電子線照射による NV 中心の生成が有効であることを確認すると共に、この様にして得た蛍光爆轟ナノダイヤモンドが温度計測や回転運動計測、超解像イメージングを行うナノセンサーとして機能することを実証した (Sotoma et al., in preparation)。

研究テーマ2「時間分解能の向上に向けた取り組み」(高速 ODMR 計測技術基盤の確立)

生命計測における ODMR 計測の潜在的有用性については既に多くの議論が為されているが、計測に要する時間が数分単位と長い場合が多いため実用化が遅れていた。このため、本研究においてはこの時間分解能を大幅に向上するため、(1)蛍光ナノダイヤモンドの高輝度化と(2)装置の高感度・高速化を推し進めた。まず(1)については、60~80 keV、 10^{13} イオン/cm²の He⁺イオン照射、あるいは 2 MeV、 10^{18} 電子/cm²の電子線照射によって幅広い粒子径のナノダイヤモンドにおいて ODMR 活性を持つ NV 中心を効率よく生成できること、照射後に 525°C、1時間の焼成処理を行うことで高い ODMR 活性を得られることを実証した (図3a)。また、高い ODMR 活性を得るためにバルクのダイヤモンド基板では表面をオゾンによるプラズマ処理を行うのが一般的であり、この手法を蛍光ナノダイヤモンドに取り入れようと試みた。その結果、70%程度的大幅な ODMR 活性上昇が可能であることを示した(図3b)。

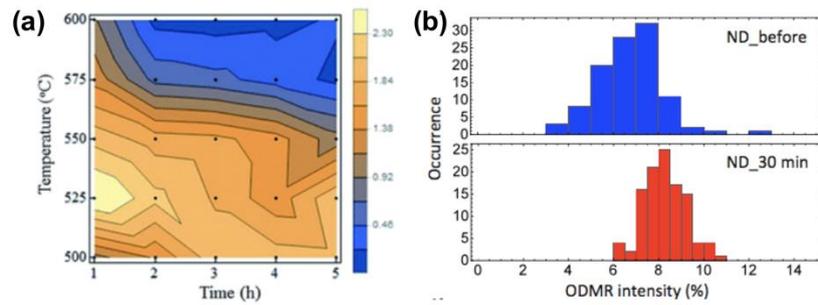


図3 (a) 焼成温度と ODMR 信号強度。525°Cで1時間焼成することで最大強度の ODMR 信号が得られた。(b) 酸素プラズマ照射前(青)と30分照射後(赤)での ODMR 信号強度変化。

しかし、プラズマ照射は蛍光ナノダイヤモンドの大量生成に不向きであるため、代替手段として、化学的な表面処理によって同等の効果が得られる終端技術を開発した。その結果、高い ODMR 活性の蛍光ナノダイヤモンドを大量調整することが可能となった。次に(2)については、一般に ODMR 計測で用いられる光子カウンターでは蛍光ナノダイヤモンドの高輝度化に十分対応可能なダイナミックレンジを得ることが難しい。そこで本研究では、最速 10000 fps の超高速 EMCCD を導入することで大きなダイナミックレンジと高感度・高速リアルタイム ODMR 計測を実現した。更にハイパワーの光励起半導体レーザーを組み合わせるとともに、FPGA を活用して EMCCD とマイクロ波発振器をシームレスに同期させることで、ビデオレート(数十ミリ秒)オーダーの時間分解能で、計測対象の ODMR 周波数の二次元分布をイメージングできる装置を構築した。これにより、細胞でナノダイヤモンド標識した計測対象の三次元構造動態や温度などの物理パラメータをリアルタイム計測することが可能となった。

研究テーマ3「共通項目」(研究テーマ1および2を活用した生命計測技術基盤の確立)

本研究で開発したナノダイヤモンド標識技術(研究テーマ1)と、高感度・高速 ODMR 計測技術(研究テーマ2)を活用することで、膜タンパク質動態のリアルタイム計測(図1)、一分子構造動態の多次元計測、細胞内分子集団のナノ動態計測、生細胞内ミトコンドリア温度変化のナノ計測(図4)、酵素反応熱のナノ計測など、幾つかの生物学的計測への応用を行うことで有用性を実証することに成功した。特に細胞内分子標識と多次元動態計測を活用することで、当初からの目的であった細胞骨格における力の細胞内伝搬の可視化に成功した。

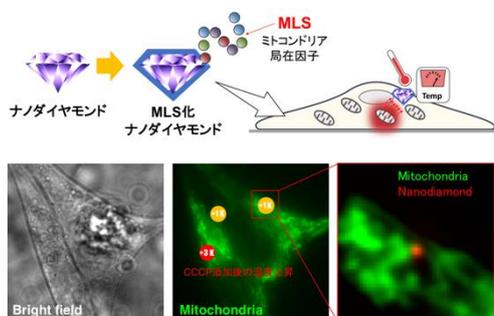


図4 MLS 修飾ナノダイヤモンドによるミトコンドリア標識と、CCCP 添加前後でのナノスケール温度計測。プレリミナリな計測結果であるが、CCCP により脱共役した後、1~3 K の温度上昇がナノダイヤモンド ODMR 計測により観測された。

更に機械刺激に対する応答を検証するために、これらの実験と並行してピエゾによる圧力

印加の系を構築し(図5)。更に *in vivo* での計測を試みるために、線虫観察装置の開発を行った。機械刺激に対する分子応答と細胞内の生命現象の発現、更には生物個体の行動への展開を視野に入れ、この研究は現在も継続進行中である。

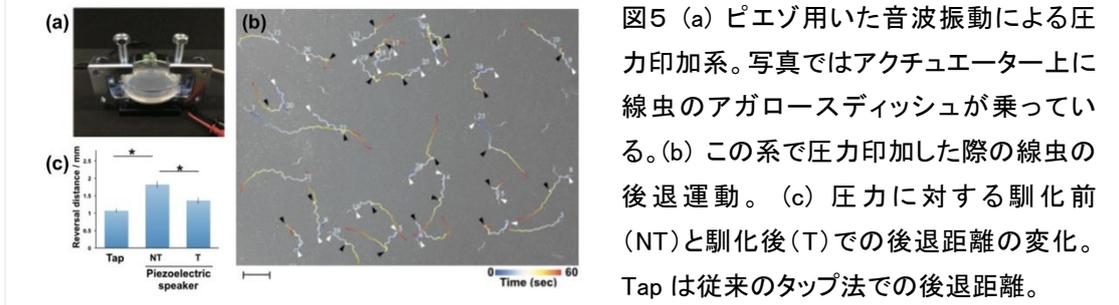


図5 (a) ピエゾを用いた音波振動による圧力印加系。写真ではアクチュエーター上に線虫のアガロースディッシュが乗っている。(b) この系で圧力印加した際の線虫の後退運動。(c) 圧力に対する馴化前(NT)と馴化後(T)での後退距離の変化。Tap は従来のタップ法での後退距離。

3. 今後の展開

本研究が達成した(1)生細胞内の生体分子やオルガネラのナノダイヤモンド標識技術と(2)高速 ODMR イメージング技術の確立によって、これまで不可能であったナノレベルでの多次元的な分子の細胞内動態を、一分子レベルでリアルタイム計測することが可能となった。またこれと同時に、既存の技術では精密定量困難であった単一細胞内局所の物理化学パラメータのリアルタイム定量にも道を拓いた。これまで蛍光ナノダイヤモンドが生命計測プローブとして潜在的には有用であると言われてきたが、本研究に酔って1細胞の表現型・機能・個性を理解するための新たなツールとして実用化を大きく推し進めることに成功した。更に、蛍光ナノダイヤモンドのセンサーとしての有用性は幅広く、今後は分子動態と温度に限らず、膜電位や脳磁、イオン濃度、分子間相互作用など幅広い。従って本研究が達成した技術は、多種多様な物理化学パラメータの1細胞計測のためのプラットフォームとして活用されていこう。このようなナノ計測技術への要望は生命科学への応用やバイオテクノロジー、医療応用に限らず、半導体ナノプロセスの微細化や電子デバイスのエネルギー効率化、マイクロリアクターの開発まで及ぶ。このため、基礎科学から産業用途まで幅広いインパクトを持つテクノロジーとして展開していくと期待している。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究費を計画的に執行したことで、研究目標である(1)ナノダイヤモンドによる *in situ* 標識技術の確立、(2)高速 ODMR 計測技術基盤の確立について技術目標を達成することができた。また、(3)1細胞計測への応用についても目標を達成するとともに、今後1細胞レベルの機械刺激応答機構を解明する上で、重要な足がかりとなる成果を得た。このために、京都大学・白川昌宏教授と研究総括である京都大学・浜地格教授の協力を得て技術開発を進めると共に、本研究を通して大阪大学・原田慶恵教授、京都大学・水落憲和教授、東京工業大学・波多野睦子教授、産総研・山崎聡先生、QST・横谷明德先生、大島武先生らと、量子センサー技術開発のために「量子技術、マテリアルサイエンス、生命計測」をつなぐ強固な分野横断ネットワークを築いた。このような連携によって、今後も量子センサー技術の開発を加速度的に推し進め、1細胞レベルの分子生

物学や熱力学の議論が行える様になっていこう。これにより、薬剤スクリーニングなど合理的に進めるための新たな創薬プラットフォームを提供し、基礎生命科学への応用からバイオテクノロジー、医療応用、更にバッテリーや半導体プロセスの効率化に至る産業応用まで幅広い波及効果が見込まれる。

(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期生評価会での研究総括・領域AD間での議論を踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ナノダイヤモンドに超分岐ポリグリセロール薄膜をコーティングし親水化と分子標識を可能にする優れた標識技術を開発し、これをベースにナノダイヤモンドを用いた“特異的分子標識技術”の開発に成功しました。さらに、化学的な表面処理による高ODMR活性蛍光ナノダイヤモンドの大量調製法と高感度・高速ODMR計測技術を開発し、細胞内アクチンフィラメントの回転動態の3次元計測を実現しました。1細胞内分子動態を1分子レベルの感度でin situ ナノ計測する方法論の確立という当初の目的はほぼ達成されています。

これらに加えて、蛍光ナノダイヤモンドを細胞局所での温度センサーやpHセンサーとして利用し、さらにマイクロ波を用いないスピン緩和時間の計測、量子センサーへの展開をはかるなど、従来にはない原理による様々な1細胞計測技術を開発しており、高く評価できます。生命科学にとどまらず、電子デバイス等の産業的応用にもつながる技術に発展することも期待されます。

また、幅広くナノダイヤモンドを用いたバイオイメージング手法を探索しているところを高く評価します。一方、ナノダイヤモンドを用いなければ達成できない代表作を“一つ”作ることを念頭におき、重要なプロジェクトを選別して一段と深く掘り下げ、研究の完成度を上げたというスタンスも必要です。まずは、得られた研究成果を業績として確定させ、この技術を世界にアピールするためにも、成果を論文として出版することに一層の努力を期待します。また、このユニークな技術を生かす研究対象と提携相手の選定も、今後の発展を考える上で重要なポイントとなると考えます。

5. 主な研究成果リスト

(1) 主な論文(原著論文)発表

1. Sugi, T., Ohtani, Y., Kumiya, Y., Igarashi, R., & Shirakawa, M. (2014). High-throughput optical quantification of mechanosensory habituation reveals neurons encoding memory in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, p17236-17241.
2. Sotoma, S., Akagi, K., Hosokawa, S., Igarashi, R., Tochio, H., Harada, Y., & Shirakawa, M. (2015). Comprehensive and quantitative analysis for controlling the physical/chemical

states and particle properties of nanodiamonds for biological applications. *RSC Advances*, 5, p13818–13827.

3. Sotoma, S., Iimura, J., Igarashi, R., Hirose, K. M., Ohnishi, H., Mizukami, S., ... & Tochio, H. (2016). Selective labeling of proteins on living cell membranes using fluorescent nanodiamond probes. *Nanomaterials*, 6, p56.
4. Genjo, T., Sotoma, S., Tanabe, R., Igarashi, R., & Shirakawa, M. (2016). A Nanodiamond-peptide Bioconjugate for Fluorescence and ODMR Microscopy of a Single Actin Filament. *Analytical Sciences*, 32, p1165–1170.
5. Sotoma, S., Terada, D., Segawa, T. F., Igarashi, R., Harada, Y., & Shirakawa, M. (2018). Enrichment of ODMR-active nitrogen-vacancy centres in five-nanometre-sized detonation-synthesized nanodiamonds: Nanoprobes for temperature, angle and position. *Scientific reports*, 8, p5463.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(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

1. Ryuji Igarashi, Shingo Sotoma “Surface modifications and selective imaging of nanodiamond for bio-application” ダイヤモンド量子センシングワークショップ 2015/08/05
2. 五十嵐龍治, 外間進悟, 源城拓哉, 白川昌宏 “表面化学修飾ナノダイヤモンドによる生命計測” ナノ学会第14回大会 2016/6/16
3. 五十嵐龍治 “Intracellular remote synchronization of protein structural changes measured with a 3D nano-gyrosensing method” 生命科学・量子技術・ナノエレ・研究の融合ミニシンポジウム・東京工業大学大岡山キャンパス北3号館 2017/2/28
4. Ryuji Igarashi, Takahiro Fujisaku, Shingo Sotoma, Takuya Genjo, Daiki Terada, Ryotaro Tanabe, Yoshie Harada, Masahiro Shirakawa “Quantum sensing for single-molecule measurements” 量子生命科学国際シンポジウム 2017/7/25

招待講演

1. 五十嵐 龍治、外間進悟、寺田大紀、源城拓哉、白川昌宏 “細胞イメージングのためのナノ磁気共鳴” 第29回バイオメディカル分析科学シンポジウム 2016/9/2
2. 五十嵐龍治 “細胞を測る道具」としての量子センサー“ 第1回量子生命科学研究会 2017/4/12
3. 五十嵐龍治、源城拓哉、原田慶恵、白川昌宏 “ナノダイヤモンド量子センサーによる

- 蛋白質動態の3次元計測” 第17回日本蛋白質科学会年会 2017/6/21
4. 五十嵐 龍治, 寺田 大輝, 藤咲 貴大, 田辺 竜太郎, 白川 昌宏 “量子センサーによるナノレベルの生細胞モニタリング” 第60回放射線影響学会 2017/10/28
5. 五十嵐龍治 “蛍光性ナノダイヤモンドを用いた定量的細胞計測技術” 2017年度生命科学系学会合同年次大会 2017/12/6