

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19297

研究課題名（和文）液-液相分離によって核内に形成される液滴様構造体の空間・ゲノムマッピング

研究課題名（英文）Intra-nucleic and genomic distributions of liquid droplets formed by liquid-liquid phase separations

研究代表者

白川 昌宏（Shirakawa, Masahiro）

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：00202119

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はナノダイヤモンド粒子(FND)を分子プローブとして、光検出磁気共鳴法(ODMR)による量子センシングにより、細胞内の物性値を計測する手法の開発を目的とした。まず 5-20 nm程度のNDを電子線照射し、窒素空孔センター(NVC)を生成する条件設定をした。続いて、FND粒子表面をコーティングや様々な化学修飾により、拡散、温度、pHなどの物性を10 nmオーダーの空間分解能で計測する手法を開発した。さらに生細胞内の局所温度やアクチンの運動を計測した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FNDの光検出磁気共鳴法(ODMR)によって、生細胞内の高分子の動態、拡散性、温度、pHなどの様々な物理パラメータを高い空間分解能で量子センシングするという手法の開発を進めた。その達成には、窒素空孔センターが持つ光三重項電子のを用いた光超偏極技術と光学検出装置の作成といった電子・光工学技術に始まって、ソフトウェア技術、nmオーダーのFNDの調製や官能基の導入といった化学的技術、さらに物理学的理論、分子・細胞生物学の技術、といった広範な学問分野を要する。このような分野横断的な新規技術を開発したことは、学術的意義が高い。更に生物、医学的分野に適用が進めば、その社会的意義は計り知れない。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was establish the method to measure several physicochemical parameters inside living cells by using optical detection of magnetic resonance (ODMR) of Nitrogen Vacancy Centers (NVCs) in nanodiamonds (NDs) at nanometer space resolution. For the preparation of quantum molecular sensors, we irradiated NDs ( 5-20 nm) by electron beams in order to generate NVCs. We then coated the surfaces of FNDs by polymers in order to avoid self-aggregations. We further modified the surfaces by several functional groups so that we can measure diffusion rates, temperatures, pH and so on by ODMR spectra of FNDs at space resolution of 10 nm orders. We also measured temperatures inside living cells, and analyzed movements of actin fibers ic cytoskeletons.

研究分野：生物物理、量子生命

キーワード：量子センシング 光検出磁気共鳴 1分子観察 ナノ粒子

## 1. 研究開始当初の背景

生細胞中の個々の生体高分子の動的挙動を観察することは、生命現象を理解する上で、極めて重要で、分子生物学、生物物理学での大きな基盤の一つである。また、細胞内での各所の温度、粘性、pH などの基礎的物性値や高分解能での分布は、細胞反応とその制御のメカニズムを理解する上で必須である。しかし、現在この「1分子観察」の手法は、蛍光分子を利用した光学顕微鏡によって行われる場合が殆どで、空間分解能、測定可能な物性値の種類、プローブの持久性、細胞毒性などといった点で改良しなければならない場合が多い。

## 2. 研究の目的

本研究は、ナノダイヤモンド粒子を分子標識プローブとして用いて、光検出磁気共鳴法(ODMR)により量子センシングをする手法を開発する事を目的とした。それにより、細胞内の粘性、温度、pH などの物性を 10 ナノメートルオーダーの空間分解能で計測し、核、ミトコンドリアや膜なしオルガネラ等の細胞小器官などの内部、周囲の物性値の分布・変化をリアルタイムで計測する手法を確立する。ナノダイヤモンドは物理的、化学的に極めて安定で、長期のレーザー照射にも耐え、クエンチングやフォトブリーチングも通常条件では起こさない。細胞毒性も殆ど認められない。こういった利点を活かして、ナノダイヤモンドを細胞内物性の超高空間解像度の量子センサーとして利用する。

## 3. 研究の方法

### (1) 測定装置

計測装置としては、高感度の蛍光顕微鏡装置と、これと同期するマイクロ波発生装置により構築した。蛍光顕微鏡装置としては、Eclipse Ti-E (ニコン) をベースとして、電子増倍型 CCD (EMCCD) カメラ (iXon3 DU897、アンドール) と 532 nm CW レーザー (Sapphire 532 LP、コヒレント) による広視野蛍光顕微鏡を構成した。マイクロ波発生装置としては、アナログ信号発生器 (N5181A、アジレント) により、ダイヤモンド窒素-空孔中心 (Nitrogen-Vacancy centers; NV センター) のゼロ磁場分裂幅 D に相当する 2870 MHz 周辺のマイクロ波を発振し、蛍光顕微鏡装置による検出とマイクロ波発生装置による発振を FPGA により同期した。これにより、マイクロ波掃引による ODMR 周波数スペクトルの取得を EMCCD カメラにより実現した。

### (2) プローブ調製

プローブとしては、平均粒子径 20 nm、30 nm、50 nm、100 nm など、目的に応じた粒子径を持つ高温高压法ナノダイヤモンドを出発材料として、2 MeV 電子線を  $10^{18}$  e<sup>-</sup>/cm<sup>2</sup> 照射し、900 °C でアニーリングした後、空気酸化、熱混酸処理、およびポリグリセロール化等の親水化といった処理を経ることで生体適合性の高い NV センター含有蛍光ナノダイヤモンドを調製した。更に、細胞標的を目的とする場合には、ポリグリセロール層表面のヒドロキシル基をカルボキシ化するために無水コハク酸処理を行い、これを WSC と NHS によるクロスリンクで抗体やペプチドなどと bioconjugation を行った。また、ナノ pH 計測を目的とする場合には、計測対象とする pH 域に応じて、ナノダイヤモンド結晶表面のカルボキシ化 (pH 3-7 での計測の場合) やチオール化 (pH 9 以上の計測の場合) を行った。

### (3) 測定手法

測定手法としては、NV センターの持つ三重厚電子スピンに対して光ポンピングに基づく  $|0\rangle$  への初期化を行い、(1) マイクロ波照射による  $|±1\rangle$  への磁気共鳴、および (2) スピン緩和によって増加する無輻射遷移を光検出するという手法を用いた (以下、(1) を ODMR 計測、(2) を T1 計測と呼ぶ)。ナノ領域の温度計測や温度計測については ODMR 計測により行った。同 pH 計測については T1 計測により行った。

### (4) 細胞導入

細胞導入はエレクトロポレーション法に依った。この際、装置としては NEON Transfection system (インビトロジェン) を使用し、電圧および時間の最適化を行った。エレクトロポレーション後は、計測用のガラスボトムディッシュに継代し、37 °C で 1 日間の回復培養を行った。

## 4. 研究成果

まず、NVC の光三重項電子を用いた室温における超偏極技術を確立した (Miyanishi *et al.*, *Magnetic Resonance*, 2021)。単分散の 5 ナノメートル極微小ナノダイヤモンドを利用した量子センサーを開発 (Terada *et al.*, *ACS Nano*, 2019)、加えて、ナノダイヤモンドの生体適合性向上のためのワンポット合成法を開発し、細胞内温度計測を行った (Terada *et al.*, *Bioconjugate Chemistry*, 2018)。さらに、ナノダイヤモンドの表面官能基の改質、特にヒドロキシ化による NVC の ODMR コントラストの増強を達成した (Sotoma *et al.*, *Scientific Reports*, 2018)。

細胞内のセンシングに向けて、ナノダイヤモンドの electroporation 細胞内送達技術を開発した (Terada *et al.*, *BBA - General Subjects*, 2019)。また、ナノダイヤモンドを用いた T1 強調イメージング技術を開発し、ナノ微小空間の pH の可視化を実現した (Fujisaku *et al.*, *Chemosensors*, 2020)。FIONA 法を ODMR と結びつけた手法を開発し、空間分解能を大幅に向上するのに成功した。さらに、物性パラメータの計測に向けては、ナノダイヤモンドを用いた pH センサーの開発および実証 (Fujisaku *et al.*, *ACS nano*, 2019) を行なった。加えて、プローブの動態計測として、ナノダイヤモンドを用いた三次元ナノ回転運動トラッキング技術を開発し、これを活用した 1 分子構造変化の 3 次元検出、細胞粘弾性計測などを実証した (Igarashi *et al.*, *JACS*, 2020)。更に温度と拡散係数の同時測定法や、ODMR のニューラルネットワークを使った測定パラメータの最適化も行なった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka Takashi, Ikeya Teppei, Kamoshida Hajime, Suemoto Yusuke, Mishima Masaki, Shirakawa Masahiro, G?ntert Peter, Ito Yutaka	4. 巻 58
2. 論文標題 High Resolution Protein 3D Structure Determination in Living Eukaryotic Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 7284 ~ 7288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201900840	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsutsumi Naotaka, Yokota Ayumi, Kimura Takeshi, Kato Zenichiro, Fukao Toshiyuki, Shirakawa Masahiro, Ohnishi Hidenori, Tochio Hidehito	4. 巻 9
2. 論文標題 An innate interaction between IL-18 and the propeptide that inactivates its precursor form	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42661-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Terada Daiki, Segawa Takuya F., Shames Alexander I., Onoda Shinobu, Ohshima Takeshi, O?sawa Eiji, Igarashi Ryuji, Shirakawa Masahiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Monodisperse Five-Nanometer-Sized Detonation Nanodiamonds Enriched in Nitrogen-Vacancy Centers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 6461 ~ 6468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnano.8b09383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Polat Onur K., Uno Masatoshi, Maruyama Terukazu, Tran Ha Nam, Imamura Kayo, Wong Chee Fah, Sakaguchi Reiko, Ariyoshi Mariko, Itsuki Kyohei, Ichikawa Jun, Morii Takashi, Shirakawa Masahiro, Inoue Ryuji, Asanuma Katsuhiko, Reiser Jochen, Tochio Hidehito, Mori Yasuo, Mori Masayuki X.	4. 巻 30
2. 論文標題 Contribution of Coiled-Coil Assembly to Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-Dependent Inactivation of TRPC6 Channel and its Impacts on FSGS-Associated Phenotypes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 1587 ~ 1603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2018070756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujisaku Takahiro, Tanabe Ryotaro, Onoda Shinobu, Kubota Ryou, Segawa Takuya F., So Frederick T.-K., Ohshima Takeshi, Hamachi Itaru, Shirakawa Masahiro, Igarashi Ryuji	4. 巻 13
2. 論文標題 pH Nanosensor Using Electronic Spins in Diamond	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 11726 ~ 11732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnano.9b05342	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terada Daiki, Genjo Takuya, Segawa Takuya F., Igarashi Ryuji, Shirakawa Masahiro	4. 巻 1864
2. 論文標題 Nanodiamonds for bioapplications?specific targeting strategies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129354 ~ 129354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.04.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Walinda Erik, Morimoto Daichi, Shirakawa Masahiro, Scheler Ulrich, Sugase Kenji	4. 巻 1864
2. 論文標題 Visualizing protein motion in Couette flow by all-atom molecular dynamics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129383 ~ 129383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.06.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森本 大智、白川 昌宏	4. 巻 92
2. 論文標題 ユビキチン鎖の鎖長に依存した物性と分解	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 7 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920007	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------