

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03230

研究課題名（和文）新規3次元誘電率顕微鏡の開発と細胞内小器官の連携メカニズムの解明

研究課題名（英文）Development of a new dielectric microscope and analysis of the linkage mechanism of intracellular organelles

研究代表者

小椋 俊彦（Ogura, Toshihiko）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：70371028

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、走査電子誘電率顕微鏡の高機能化を行った。具体的には、高感度・低ノイズの初段アンプの開発と10 nm厚のSiN膜による高分解能観察ホルダを開発した。窒化シリコン薄膜を10nm厚にすることで空間分解能が4.5 nmまで向上し、細胞構造や有機材料等の構造をより詳細に観察することが可能となった。本システムを用いる事で、マウス乳がん細胞やメラニン色素細胞、口腔内上皮細胞等の様々な細胞のナノレベルでの直接観察を可能とした。さらに、観察された画像から、細胞内膜等の細胞内小器官の動作機構を解析する事に成功した。これに加えて最新の画像情報処理技術を用いる事で、細胞内小胞等の自動解析技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、高機能な走査電子誘電率顕微鏡を開発した。本システムを用いる事で、培養細胞の内部構造をナノレベルの分解能で生きたまま直接観察する事が可能となった。これにより、細胞内小器官のより詳細な解析が進展する事が予想される。さらに、培養細胞だけでなく、バクテリアやタンパク質複合体等の様々な生物試料の溶液中での直接観察と分析を可能とする。これ以外にも溶液中の有機材料やナノ粒子、食品や化粧品、石油化学製品、燃料電池や2次電池材料等の様々な分野においても活用が期待され、学術的にも産業的にも極めて大きな意義があるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this research, we improved the functionality of the scanning electron dielectric microscope. To achieve this, we developed a high-sensitivity, low-noise first-stage amplifier and a high-resolution observation holder with a 10-nm-thick SiN thin film. By increasing the thickness of the silicon nitride thin film to 10 nm, the spatial resolution was improved to 4.5 nm, making it possible to observe the structure of cells and organic materials in greater detail. By using this system, it is possible to directly observe various cells such as mouse breast cancer cells, melanin pigment cells, and oral epithelial cells at the nano level. Furthermore, from the observed images, we succeeded in analyzing the movement mechanism of intracellular organelles such as the intracellular membrane. In addition, by using the latest image information processing technology, we have developed an automatic analysis system for intracellular vesicles.

研究分野：ナノバイオテクノロジー

キーワード：窒化シリコン薄膜 走査電子顕微鏡 誘電率 液中観察 培養細胞 細胞内小器官

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで溶液中の生物試料を染色や固定化处理なしに高分解能で観察する方法を開発してきた。従来の方法では、細胞を生きたまま観察し、その内部構造をナノメートルの分解能で分析することは極めて困難であった。通常の光学顕微鏡では光の回折限界により、分解能が約 200 nm に制限され、ウイルスやタンパク質の観察は困難である。一方、電子顕微鏡は、数 nm の高い空間分解能を有するが、装置内部を真空にする必要があり、溶液中の生物試料をそのまま観察することは出来ない。さらに、電子線が生物試料に照射されると電子線損傷が生じる問題がある。我々はこれまで走査電子顕微鏡をベースとする新たな走査電子誘電率顕微鏡の開発を進めて来た。本提案では、この誘電率顕微鏡を大幅に高機能化し、一回の撮像で複数の傾斜観察画像を取得し、ここから 3 次元構造を求める新たなシステムを開発する。加えて、本提案により開発した観察システムを用いて、膜タンパク質複合体やオートファジ、及び細胞内膜構造等の細胞内小器官の構造変化を詳細に分析する。

### 2. 研究の目的

本研究では、走査電子誘電率顕微鏡を用いた細胞内小器官の相互作用とその動的メカニズムの解明を目標とする。こうしたメカニズムの解明には、生きたそのままの細胞内小器官の 3 次元動的構造変化を捉えることが必須となる。我々はこれまで走査電子誘電率顕微鏡を開発して来た。この観察法では、生物試料を 2 枚の耐圧性の高い窒化シリコン(SiN)薄膜で密閉し走査電子顕微鏡の試料室へと導入する。電子顕微鏡内は高真空であるが、試料ホルダ内部は大気圧状態を保つことが可能である。この大気圧ホルダの上部に電子線を走査しながら照射し、上部のタンゲステン層に吸収させる。これにより生じた電位変化を水溶液中の生物試料に透過させ下部の金属端子で検出し画像化する。電位の透過性は物質の比誘電率により決まるため、比誘電率が 80 と高い「水」は電位信号を良く透過させる。一方、「生物試料」は比誘電率が 2 ~ 3 と低く電位信号を大幅に減衰させる。このため、水溶液中の生物試料を高いコントラストで観察することができる。これにより、溶液中の生きたバクテリアやタンパク質を電子線損傷がなく、非染色・非固定の状態で 10 nm の分解能で観察可能となった。本提案では、走査電子誘電率顕微鏡の高分解能化を行う。さらに光学顕微鏡と併用する事で、様々な細胞内部の小器官を生きたまま直接観察し、その機能の解明を行う。

### 3. 研究の方法

本研究では、走査電子誘電率顕微鏡の高分解能化を行った。これを達成するために、高感度・低ノイズの初段アンプの開発と 10 nm 厚の SiN 薄膜による高分解能観察ホルダを開発した。窒化シリコン薄膜を 10nm 厚とすることで空間分解能が 4.5 nm まで向上し、細胞構造や有機材料等の構造をより詳細に観察することが可能となった(研究成果 1)。さらに、培養細胞を安定的に SiN 膜上に培養し、培養液を保持したまま試料ホルダへと封入する技術を向上させる事で、マウス乳がん細胞やメラニン色素細胞、口腔内上皮細胞等の様々な細胞を直接観察する事が出来た。また、観察された画像から、細胞内部の小胞やメラニン色素粒子等を認識し、分析するアルゴリズムを開発した。このアルゴリズムには、畳み込み演算層を多層に積層したディープニューラルネットワークを用いる事で、ほぼ 100% の認識精度を達成した。こうした方法を用いて、細胞内部のメラニン色素粒子の直径や真円度等をほぼ自動的に解析処理する事が可能となった。

### 4. 研究成果

本研究では、高分解能化・高機能化した走査電子誘電率顕微鏡を開発し、空間分解能を 4.5nm まで向上させた(研究成果 1)。さらに本方法を用いて、マウス乳がん細胞や口腔内上皮細胞、メラニン色素細胞等を生きたまま直接観察し、その内部の小器官の分析を行った(研究成果 2 5)。主な研究成果の詳細は以下となる。

#### (1) 高分解能走査電子誘電率顕微鏡の開発

本項目の目標は、1 枚の画像の撮像時間を 10 秒に短縮し、さらに誘電率観察画像の分解能を 8 nm から 6 nm 以下へと向上させることである。これを達成するため、信号増幅の帯域を従来の 2 倍の 20 kHz へと拡張した初段アンプシステムの開発を行った。この初段アンプでは、電流増幅回路(トランスインピーダンスアンプ)の回路構成を改良することで、高抵抗に並列接続する発信防止コンデンサーを取り除くことに成功した。これにより、アンプの帯域を 10 倍以上に向上させることが可能となり、これまで 80 秒であった撮像時間を 10 秒まで短縮させることに成功した。さらに、試料ホルダの窒化シリコン薄膜の厚さを 50 nm から 10 nm へと薄層化することで、入射した電子線の散乱範囲を抑え、高分解能化が可能であることを突き止めた。これにより、サンプルにも依存するが、最高分解能として 4.5 nm での観察が可能となった。こうした成果を 2023 年に顕微鏡関連の国際専門誌に発表した(研究成果 1)。

### (2) PM2.5 の細胞内への取り込み機構の解明

本研究項目では、北京の大気中より採取されたPM2.5をPBSに懸濁し、これを培養細胞へと添加することで細胞内へと取り込ませ、誘電率顕微鏡により直接観察し分析を行った。この成果としては、ヒト及びマウスの培養細胞にPM2.5を添加し、これが細胞内へと直接取り込まれることを確認した。さらに、高機能化した誘電率顕微鏡を用いて、PM2.5の取り込み状況をそのままの培養状態で直接観察を行った。この結果、PM2.5は、複数の粒子が袋状の細胞内膜に包まれる形で取り込まれていることが判明した(図1)。この細胞内膜には脂質が多く含まれていることを確認した(研究成果2)。また、PM2.5の粒子間にはタンパク質と予想される画像領域が観測された。これは、細胞がPM2.5を取り込むことで、ヒートショックプロテインやメタルチオネイン等が多く発現し、これがPM2.5の粒子と結合したものと推定される。さらに、PM2.5添加5時間後には、細胞内部にPM2.5が多く取り込まれ、その凝集塊周囲に脂質が多く含まれる内膜構造が観察された(図1)。この構造は、オートファゴソームに対応すると考えられる。また、PM2.5の取り込み量は添加後約5時間で最大となり、それ以降は徐々に減少していることが判明した。さらに、PM2.5が細胞膜上ではなく細胞内に存在することを共焦点レーザーラマン顕微鏡により明らかにした。本成果は、PM2.5の取り込みに関して、生きたそのままの細胞構造を直接観察した世界初の成果となる(研究成果2)。

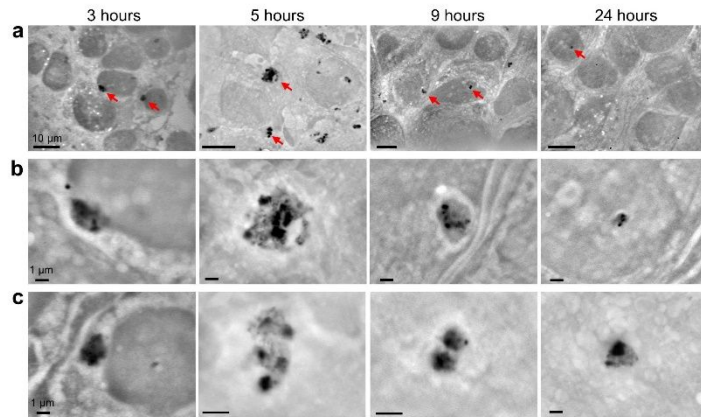


図1 誘電率顕微鏡によるPM2.5を取り込んだ培養細胞の直接観察

### (3) メラニン色素生成細胞の走査電子誘電率顕微鏡による直接解析

メラニン色素を生成するヒト色素細胞やヒト黒色腫 MNT-1 細胞に対して、非染色・非固定の状態での直接観察を行い、細胞内のメラニン色素小胞の直接観察が可能であることを確認した(図2)。通常のメラニン色素細胞のメラニン色素小胞(メラノソーム)はラグビーボール状をしているが、MNT-1細胞ではドーナツ状の構造となっていた(図2)。さらに、細胞内のメラニン色素小胞の形状や分布状態を自動的に認識し分析するために、畳み込みニューラルネットワークを多層化した Deep Neural

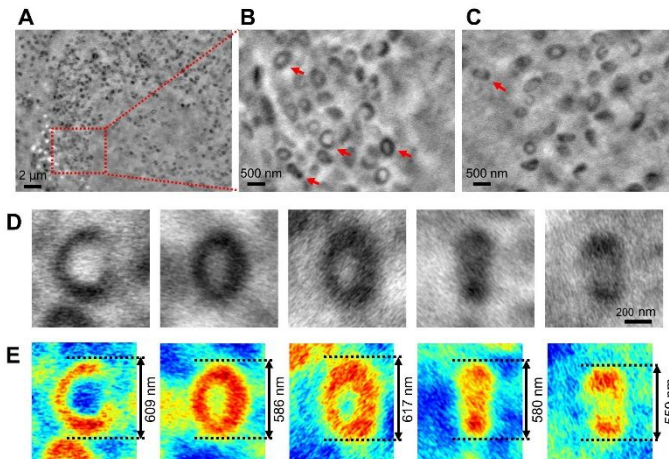


図2 メラニン色素生成細胞(MNT1)のメラニン色素小胞の直接観察

Network による画像解析方法を開発した(研究成果3)。学習には、目視で拾い上げた200枚の粒子画像と200枚のバックグラウンド画像を用いた。細胞内のメラノソームの認識では、粒子の境界が曖昧で多くの粒子が集まっている箇所が存在する。畳み込み演算層を用いた深層学習を用いる事で、ほぼ100%の認識精度を得る事が出来た。こうした高精度の深層学習ネットワークを用いる事で、自動的にメラノサイトやMNT-1細胞内のメラノソームを認識し拾い上げる事が可能となった。さらに、拾い上げたメラノソームの画像から長軸や短軸、真円度等を解析するためには、粒子画像の輪郭を認識し、粒子の範囲をマスク処理する必要がある。この処理は、従来人が目視により行う事が多く、多数の粒子を高速に処理する事は困難であった。そこで粒子の認識と同様に多層畳み込みニューラルネットワークを用いて、自動マスク処理のシステムを開発した。ニューラルネットワークの学習後にメラノソームの自動マスク処理を行った結果、96%の精度でマスク処理が可能である事が確認された。残りの4%は、学習データとした人が処理したマスク画像のプレと考えられる。こうした自動マスク処理のメラノソームの画像から自動的に粒子の特徴量を計算し、その分布を明らかにする事に成功した。こうした成果を論文としてまとめ国際誌に発表した(研究成果3)。

#### (4) 走査電子線を用いた新規のインピーダンス顕微鏡の開発

走査電子線を用いた新たな多波長インピーダンス顕微鏡の開発を行った。具体的には、20 kHz ~ 250 kHz の信号範囲で 8 本の信号を混合して試料へと印加するシステムと、この信号検出のための周波数信号の分離が可能なシステムを構築した。このシステムでは、二つの周波数信号を出力可能なファンクションジェネレータを 4 台用いて 8 波長の出力を混合器へと導入し、この混合信号を試料下部の端子へと印加する。さらに、試料薄膜の上部からの検出信号を独自に開発したアンプ回路を用いて増幅させ、これを 2 検波同時検出が可能なロックインアンプ 4 台を用いることで、高精度な同時 8 波長検出システム開発成功に繋がった。初段の増幅回路の帯域を 1 MHz まで伸ばすことが出来たため、検出信号の範囲が 20 kHz ~ 1000 kHz までの 8 波長の同時インピーダンス画像の取得が可能となった。さらに、組成の異なるビーズや金属、大気圧下での細胞の観察を行い、インピーダンス信号からの組成分析の基礎原理の検証を進めた。2022 年にこうした成果を国際紙に発表した（研究成果 4）。本研究を推進する過程で、偶然にも SiN 薄膜のポリスチレンビーズに特殊な光学作用が生じる事を見出した。蛍光の生じない通常のポリスチレンビーズを SiN 薄膜上に分散させ、励起光を入射すると、外周部に波長の長いリング状の光が生じる。これは、ビーズ外周部を周回する光と SiN 薄膜の非線形光学特性によるものと推測され、この結果を国際紙に発表した（研究成果 5）。

#### < 研究成果 >

T. Ogura\*, T. Okada, M. Hatano, M. Nakamura, T. Agemura, 2022. Development of General-purpose Dielectric Constant Imaging Unit for SEM and Direct Observation of Samples in Aqueous Solution, *Microscopy and Microanalysis*, ozad030 (2023)

T. Okada, T. Iwayama, S. Murakami, M. Torimura, T. Ogura\*; Nanoscale observation of PM2.5 incorporated into mammalian cells using scanning electron-assisted dielectric microscope, *Sci. Rep.*, 11(1), 228 (2021)

T. Okada, T. Iwayama, T. Ogura, S. Murakami, T. Ogura\*; Structural analysis of melanosomes in living mammalian cells using scanning electron-assisted dielectric microscopy with deep neural network, *Comput. Struct. Biotech. J.*, 21, 506-618 (2023)

T. Ogura\*; Development of multi-frequency impedance scanning electron microscopy, *PLOS ONE* 17, e0263098 (2022).

T. Ogura\*; Raman scattering enhancement of dielectric microspheres on silicon nitride film, *Sci. Rep.*, 12(1), 5346 (2022)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Ogura Toshihiko	4. 巻 17
2. 論文標題 Development of multi-frequency impedance scanning electron microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0263098(1-15)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0263098	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 Ogura Toshihiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Raman scattering enhancement of dielectric microspheres on silicon nitride film	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5346(1-11)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-09315-5	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 Okada Tomoko, Iwayama Tomoaki, Murakami Shinya, Torimura Masaki, Ogura Toshihiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Nanoscale observation of PM2.5 incorporated into mammalian cells using scanning electron-assisted dielectric microscope	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80546-0	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 Okada Tomoko, Ogura Toshihiko	4. 巻 22
2. 論文標題 Scanning Electron-Assisted Dielectric Microscopy Reveals Autophagosome Formation by LC3 and ATG12 in Cultured Mammalian Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1834 ~ 1834
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22041834	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 Ogura Toshihiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Direct observation of unstained biological samples in water using newly developed impedance scanning electron microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0221296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0221296	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 Fukuda Eriko, Mori Masatoshi, Shiku Hiroshi, Miyahara Yoshihiro, Kawamura Yoshifumi, Ogawa Koji, Ogura Toshihiko, Goshima Naoki	4. 巻 25
2. 論文標題 Development of INSOL tag for proteome wide protein handling and its application in protein array analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 41 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12735	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 Iwayama Tomoaki, Okada Tomoko, Ueda Tsugumi, Tomita Kiwako, Matsumoto Shuji, Takedachi Masahide, Wakisaka Satoshi, Noda Takeshi, Ogura Taku, Okano Tomomichi, Fratzl Peter, Ogura Toshihiko, Murakami Shinya	4. 巻 5
2. 論文標題 Osteoblastic lysosome plays a central role in mineralization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaax0672
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aax0672	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 該当する

1. 著者名 Ogura Toshihiko, Okada Tomoko, Hatano Michio, Nakamura Mitsuhiro, Agemura Toshihide	4. 巻 29
2. 論文標題 Development of General-purpose Dielectric Constant Imaging Unit for SEM and Direct Observation of Samples in Aqueous Solution	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microscopy and Microanalysis	6. 最初と最後の頁 1037 ~ 1046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/micmic/ozad030	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 Okada Tomoko, Iwayama Tomoaki, Ogura Taku, Murakami Shinya, Ogura Toshihiko	4. 巻 21
2. 論文標題 Structural analysis of melanosomes in living mammalian cells using scanning electron-assisted dielectric microscopy with deep neural network	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Computational and Structural Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 506 ~ 518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.csbj.2022.12.027	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 -

[学会発表] 計10件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 小椋俊彦、岡田知子
2. 発表標題 Direct observation of biological fine particles in water by scanning-electron assisted dielectric microscopy
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小椋俊彦
2. 発表標題 走査電子誘電率顕微鏡の開発と水溶液中の試料の直接観察
3. 学会等名 第45回静電気学会全国大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小椋俊彦
2. 発表標題 走査電子誘電率顕微鏡による溶液中のコロイド粒子や生物試料の直接観察
3. 学会等名 コロイド先端 技術講座「先端バイオ計測技術」(招待講演)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 小椋 俊彦、伊藤 徹二、岡田 知子
2. 発表標題 High-resolution imaging of proteins and cells under aqueous condition using scanning-electron assisted dielectric microscopy (SE-ADM)
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小椋 俊彦
2. 発表標題 革新的液中ナノ顕微鏡開発と細胞外微粒子の包括的解明
3. 学会等名 日本分析化学会第69回年会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小椋 俊彦、岡田 知子
2. 発表標題 Nanoscale observation of biological specimens in aqueous condition by scanning-electron assisted dielectric microscopy
3. 学会等名 OKINAWA COLLOIDS 2019 conference(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小椋 俊彦、岡田 知子
2. 発表標題 Nanoscale imaging of unstained biological specimens in water using newly developed scanning-electron assisted dielectric microscopy
3. 学会等名 5th International Kyushu Colloid Colloquium(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 小椋 俊彦、岡田 知子
2. 発表標題 走査電子誘電率顕微鏡によるナノ・マイクロプラスチックの細胞への影響解析
3. 学会等名 産総研・シンポジウム「マイクロプラスチックの計測・評価を考える」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小椋 俊彦、岡田 知子
2. 発表標題 Nanoscale imaging of intact biological specimens in water using scanning electron assisted dielectric microscopy
3. 学会等名 第8回メタロミクスに関する国際会議 (ISM-8) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小椋 俊彦
2. 発表標題 走査電子誘電率顕微鏡による溶液中のコロイド粒子や生物試料の直接観察
3. 学会等名 コロイド先端 技術講座「先端バイオ計測技術」(招待講演)
4. 発表年 2022年

〔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
研究 分担 者	山本 条太郎  (Yamamoto Johtaro)  (20585088)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員    (82626)	2020年度以降は、所内のコロナ禍対策等により本提案の実験への参画が困難となる。

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	岡田 知子  (Okada Tomoko)  (30344146)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・総括研究主幹    (82626)	2020年度において退職となる。

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