

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16089

研究課題名(和文) 高度に機能制御されたナノダイヤモンド量子センサーの創出と応用

研究課題名(英文) Construction and application of highly functionally controlled nanodiamond quantum sensor

研究代表者

外間 進悟 (Sotoma, Shingo)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：00757635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ領域の温度計測が可能な蛍光性ナノダイヤモンド(FND)と発熱する高分子であるポリドーパミン(PDA)を組み合わせ、一体型ナノヒーター/温度計(FND-PDA)を開発した。このFND-PDAを使うことによってナノ領域の熱伝導を計測可能であることを実証した。細胞内にFND-PDAを導入して熱伝導率を計測し、細胞の熱伝導率の絶対値を計測することに成功した。その結果、細胞の熱伝導率は水と比較しておよそ6分の1程度であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内の熱伝導率はこれまで細胞1個の平均値としてしか知ることができず、細胞局所の熱伝導率を計測する方法は確立されていなかった。本研究では、蛍光性ナノダイヤモンド(FND)を用いた細胞内ナノ領域の熱伝導計測法を開発し、それが水よりも6分の1程度小さくまた細胞内に渡って大きなばらつきを持つことを明らかにした。細胞内における小さな熱伝導率と大きなばらつきは、細胞内に大きな温度勾配を作り出すことが可能であり、細胞内温度が細胞機能を制御するという新しいメカニズムが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have developed a new integrated nano heater/thermometer by combining fluorescent nanodiamonds (FNDs) and polydopamine (PDA). Using the FND-PDA, we demonstrated that it is possible to measure heat conductivity in the nano-region. The FND-PDA was introduced into a cell and the absolute value of the thermal conductivity of the cell was successfully measured. As a result, it was clarified that the thermal conductivity of cells is about one-sixth that of water.

研究分野：生物物理

キーワード：ナノダイヤモンド 量子センサ 熱伝導率 細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内の温度計測は比較的研究が進んでいる一方、細胞内でどのように熱が伝導するのか、すなわち、細胞の熱伝導率に関する研究はそれほど進んでいない。

(2) Park らのグループは、細胞の外にある熱源（ヒーター）から発せられた熱を、細胞の外にある温度計で計測することにより細胞の熱伝導率を計測する方法(3-法)を用いて研究を行い、その値は水と同じ  $0.6 \text{ W/m}\cdot\text{K}$  であることを報告している[1]。しかし、このような手法で得られる熱伝導率は細胞の平均値であり、細胞外マトリックスや周囲の水を含んでしまうという問題があった。

(3) 細胞内の熱伝導率はこれまで細胞 1 個の平均値としてしか知ることができず、細胞局所の熱伝導率を計測する方法は確立されていなかった。細胞の熱伝導計測を達成するためには、加熱も温度計測も細胞内で同時に達成される必要があり、そのような技術開発が望まれていた。

2. 研究の目的

ナノ領域の熱伝導率を定量可能な、温度計とヒーターが一体となったハイブリッドプローブを創出し、細胞の熱伝導率を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ナノ領域の温度計測が可能な FND と発熱する高分子であるポリドーパミン(PDA)を組み合わせて、一体型ナノヒーター/温度計(FND-PDA)を開発した。

(2) FND の光検出磁気共鳴(ODMR)技術を応用することによって、FND-PDA を用いたナノ領域の熱伝導計測が可能であることを実証。

(3)細胞内に FND-PDA を導入して熱伝導率を計測し、細胞の熱伝導率の絶対値を計測した。

4. 研究成果

(1) **FND-PDA の合成**：pH 8.5 の水溶液中で FND とドーパミン分子を反応させることにより、FND 上に PDA の層を形成させることに成功、また、その厚みはドーパミンの濃度によってコントロール可能であり、ダイヤモンドの大きさにはあまり依存しないことが明らかとなった。本研究では、粒子径 100 nm の FND に対して、ドーパミンの濃度が  $500 \mu\text{g/ml}$  のものを利用しており、その厚みは 60 nm 程度である。

(2) **レーザー光照射による発熱と温度計測**：空气中で FND-PDA にレーザー光を照射し、PDA の発熱を FND で検出できるか検証を行った。実験は、蛍光顕微鏡上で、レーザー光強度に対する ODMR 信号を計測することによって行っている。0.95 - 25mW の範囲で ODMR 信号を計測したところ、温度上昇に伴う ODMR 信号の変化が確認され、25mW でおおよそ 15 度程度の温度上昇が見られた(図 1a-c)。またこのような温度上昇は、FND 単体では見られなかったことから、PDA の発熱が FND によって計測されていることを確認した。PDA の光安定性を確認するために、連続して 9 回 25 mW で照射し温度計測を繰り返したところ(n = 11)、すべてのサンプルにおいて PDA の分解に伴う温度上昇の変化が見られなかったことから、PDA-FND は安定して利用可能であることが確認された。

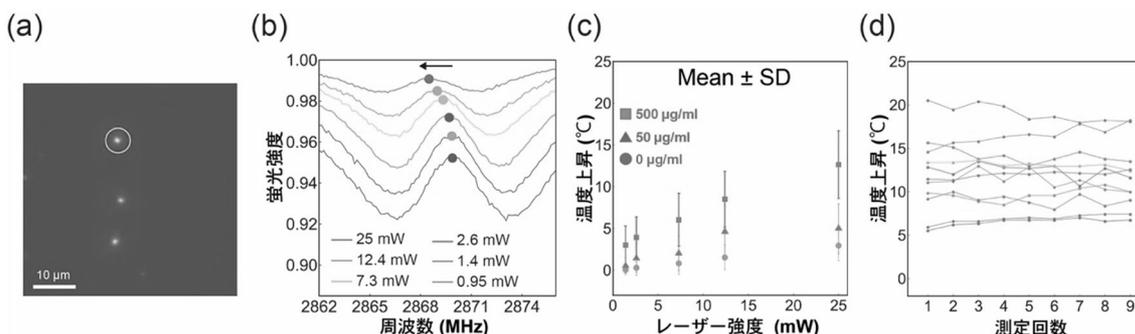


図 1. (a) FND-PDA の蛍光顕微鏡像と(b)レーザー光強度に対する ODMR 信号の変化 . (c) レーザー光強度に対する FND-PDA の温度上昇 . (d)繰り返し照射に対する FND-PDA の安定性評価 .

(3) **PDA-FND の細胞毒性・取り込み・局在の評価**：FND-PDA の細胞への毒性評価を行った結果、その毒性は低く、 $100 \mu\text{g/ml}$  の高濃度で培養液に添加した細胞であっても、その生存率が 90% 程度あることがわかった。のちに行う細胞の熱伝導計測は  $1 \mu\text{g/ml}$  以下の低濃度で行うため、PDA-FND が細胞へ与える影響は無視できるほど小さいと考えられる。次に共焦点顕微鏡により

細胞への取り込みの評価を行ったところ、そのほとんどが細胞内に取り込まれていることが確認された。次に取り込みのメカニズムをフローサイトメトリーにより検証した。これまでの研究から FND はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることが報告されている。PDA-FND についてもエンドサイトーシスによる取り込みが考えられることから、 $\text{NaN}_3$  を用いて細胞のエンドサイトーシスを阻害したところ、細胞への取り込みが阻害された。また、緑色蛍光蛋白質(GFP)を発現したリソソームベシクルとの共局在が確認されたことから、エンドサイトーシスで取り込まれリソソームに局在していることが明らかとなった。

(4) PDA-FND による細胞の熱伝導計測：PDA-FND によって熱伝導率を計測する原理について説明する。PDA-FND が高熱伝導率の環境にある場合、PDA に光照射した際に起こる発熱は外部へ速く拡散するため、FND の温度は上がりにくくなる。逆に低熱伝導率の環境にある場合は FND の温度は高温になる。すなわち、PDA-FND を細胞内に導入しその温度上昇を調べることによって、細胞内の熱伝導率を計測することができると考えた。本実験ではまず、すでに熱伝導率( ) が報告されている、空気、水、ミネラルオイル中で発熱の計測を行い、PDA-FND によって正確に熱伝導率計測が行えるか検証を行った(表 1)。検証の際に最も注意しなければならなかった点は、FND の粒子径や形状のばらつきに由来する計測誤差である。FND は粒子径が 100 nm のものを購入し利用しているが、均一ではなくばらつきを持っている。大きな FND 粒子には多量の PDA がコートされているため大きく発熱し、逆に小さな FND 粒子は小さく発熱するというように、粒子間で発熱に差が生じてしまう。本研究では、十分な測定数を稼ぎベイズ統計解析により検証することによって、粒子間での発熱の違いと、環境(熱伝導率)に由来する発熱の違いを差別化した。実験の結果、空気、水、ミネラルオイル中における温度上昇はそれぞれ、熱伝導率から計算によって予想される温度上昇に非常に近い結果であったことから、熱伝導率計測の原理が正確に機能していることが証明された。そして HeLa 細胞(ヒト子宮頸癌由来) MCF-7 細胞(ヒト乳癌由来)内に PDA-FND を導入し、それぞれについて細胞内の温度上昇を計測した。MCF-7 細胞の実験では、HeLa 細胞測定の際に利用した PDA-FND サンプル(バッチ 1)をそのまま使わず新たに作り直し(バッチ 2)、空気-水-ミネラルオイルを含め独立した 1 セットの実験として細胞計測を行っている。その結果は、 $3.0 \pm 1.0$  (HeLa 細胞) および  $2.9 \pm 0.8$  (MCF-7 細胞)となりそこから見積もられる熱伝導率は、いずれの細胞についても  $0.11 \text{ W/m}\cdot\text{K}$  となり、水より著しく小さいことを世界で初めて明らかにした。この熱伝導率は、脂質や蛋白質( $0.1\text{--}0.2 \text{ W/m}\cdot\text{K}$ )と近い値であった。本研究によって明らかとなった小さな熱伝導率とその大きなばらつきが、細胞内局所の化学反応を制御する新たな可能性が示された[2]。

表 1. 熱伝導計測実験結果および計算値

	温度上昇(バッチ 1) [ ]	温度上昇(バッチ 2) [ ]	熱伝導率(文献 値) [W/m·K]	温度上昇(計算 値) [ ]
空気	$5.6 \pm 1.1$	$5.7 \pm 0.8$	0.026	5.32
水	$0.63 \pm 0.5$	$0.70 \pm 0.3$	0.61	0.84
ミネラルオイル	$1.9 \pm 0.6$	$1.7 \pm 0.4$	0.135	1.76
細胞	$3.0 \pm 1.0$ (HeLa)	$2.9 \pm 0.8$ (MCF-7)	0.11 (本研究)	-

#### 引用文献

1. Kyoo Park, B., Yi, N., Park, J., Kim, D. Thermal conductivity of single biological cells and relation with cell viability. Applied Physics Letters 102, 203702 (2013).
2. Sotoma, S., Zhong, C., Kah, J.C.Y., Yamashita, H., Plakhotnik, T., Harada, Y., et al. In situ measurements of intracellular thermal conductivity using heater-thermometer hybrid diamond nanosensors. Sci Adv 7, eabd7888 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sotoma Shingo, Zhong Chongxia, Kah James Chen Yong, Yamashita Hayato, Plakhotnik Taras, Harada Yoshie, Suzuki Madoka	4. 巻 7
2. 論文標題 In situ measurements of intracellular thermal conductivity using heater-thermometer hybrid diamond nanosensors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabd7888
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abd7888	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 該当する

1. 著者名 Sotoma Shingo, Harada Yoshie	4. 巻 35
2. 論文標題 Polydopamine Coating as a Scaffold for Ring-Opening Chemistry To Functionalize Gold Nanoparticles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 8357-8362
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.langmuir.9b00762	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 外間進悟
2. 発表標題 ダイヤモンドナノ粒子による細胞の熱伝導計測
3. 学会等名 第34回ダイヤモンドシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 外間進悟
2. 発表標題 高度に機能制御されたダイヤモンド量子センサによる細胞内センシングの実践
3. 学会等名 量子生命学会第2回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shingo Sotoma
2. 発表標題 Surface modification of fluorescent nanodiamonds for bioimaging applications
3. 学会等名 E-MRS 2019 FALL MEETING (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shingo Sotoma
2. 発表標題 Surface modification of fluorescent nanodiamonds for temperature sensing inside cells
3. 学会等名 The 6th Awaji International Workshop on "Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>“生きる”とは？私たち生物の細胞が熱を伝えるメカニズムの解明へ。  <a href="https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2021/20210116_1">https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2021/20210116_1</a></p>
--

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
---------	---------