

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22125

研究課題名（和文）生きた細胞内部のナノ動態を直接可視化するナノ内視鏡技術の開発

研究課題名（英文）Development of nanoendoscopy technique for direct visualization of nanodynamics inside living cells

研究代表者

福間 剛士（Fukuma, Takeshi）

金沢大学・ナノ生命科学研究所・教授

研究者番号：90452094

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：生細胞内部でナノ構造・動態を計測できるナノ内視鏡技術を、原子間力顕微鏡（AFM）を基盤として開発した。この技術では、ニードル探針を細胞内を含む3次元空間内で走査し、その間に探針に働く力を記録することで細胞内構造を可視化する。さらに、細胞内に探針を挿入し、そこでAFM観察を行うことで、細胞内の局所構造やその動態を、ナノレベルの分解能で観察できる。また、これらの計測が、細胞に致命的なダメージを与えないことを蛍光アッセイにより確認した。この技術により、従来観察できなかった細胞内現象を直接観ることが可能となり、細胞機能の発現機構に関する理解が進むものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、従来技術では観られなかった生細胞内部のナノ現象が観察できるようになる。これにより、従来間接的な計測結果から予想されてきた細胞内現象の発現機構やそれが関係する疾患の機序を直接観て確認できる。また、従来、細胞外での再構成系で多数のAFM計測が行われてきたが、それが本当に細胞内で生じているのかは、しばしば疑問視されてきた。これらの現象を直接細胞内で観察できれば、過去に報告されてきた膨大な量のAFM実験結果に関して、この疑問に対する解答を与えられる。こうして明らかになった細胞機能や疾患機序の理解は、将来、創薬・医学の発展を通じて、人類の健康増進に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We have developed "nanoendoscopy" that allows to visualize nanodynamics inside living cells based on atomic force microscopy. This technology visualizes intracellular structures by scanning a needle tip in three-dimensional space, including inside the cell, and recording the forces acting on the tip during the scanning. Furthermore, by inserting the needle into the cell and performing AFM observation there, the local intracellular structure and its dynamics can be observed with nano-level resolution. In addition, it was confirmed by fluorescence assay that these measurements do not cause lethal damage to the cells. This technology enables direct observation of intracellular phenomena that could not be observed previously, and is expected to advance our understanding of the mechanisms underlying the expression of cellular functions.

研究分野：ナノ計測工学

キーワード：原子間力顕微鏡（AFM）

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人体を構成する基本単位である細胞の内部では、タンパク質や、代謝物質、核酸などのナノスケールの大きさを持つ生体分子が複雑に相互作用して、様々な細胞機能を発現している。したがって、それらのナノスケールの構造や現象を観て、理解して、制御すること生命現象の理解や疾患の予防、診断、治療のために極めて重要となる。しかし、現在の技術では、生きた細胞の内部にあるナノスケールの構造やその動態を直接観ることは極めて限定的な条件でしか実現しておらず、その実現が強く求められている。

2. 研究の目的

本研究では、生きた細胞の内部を直接観察することのできるナノ内視鏡技術を、原子間力顕微鏡 (AFM) を基盤として開発する。

3. 研究の方法

開発したナノ内視鏡技術の原理を図 1a に示す。この方法では、通常の AFM 探針よりも細長いニードル状の探針を作製し、それを細胞の内部を含む 3 次元 (3D) 空間内で走査する。その間に、探針先端にかかる力を記録して、3D 力分布像を得る。ここで、探針の走査中に、探針先端は細胞内の様々な構造と相互作用するため、得られた 3D 力分布像のコントラストは、細胞内構造を反映したものとなる。

4. 研究成果

(1) 図 1b に示す通り、集束イオンビーム (FIB) 加工装置を用いて、AFM 探針を切削することで、長さ 10 μm 以上、直径 200 nm 以下の細長い Si ニードル探針を作製する技術を確立した。さらに、これを用いて、上記の原理を基に、生きた HeLa 細胞の全体の内部構造を、3D 観察することに成功した (図 1c)。

(2) 共焦点蛍光顕微鏡とこのナノ内視鏡を組み合わせることで、これらの手法による相関イメージングを実現した。図 2 に示した例では、生きた繊維芽細胞内部のアクチン繊維の 3D 分布を両手法で観察した。図 2a で、白黒で示した部分はアクチン繊維の蛍光像である。一方、図 2b に示した 3D 像はナノ内視鏡観察像である。この像のプロジェクトマップを図 2a に半透明の挿入図として示してあるが、蛍光像と良く一致していることが分かる。このようにして、ナノ内視鏡で観察した構造が何に相当するのかを確認することができる。

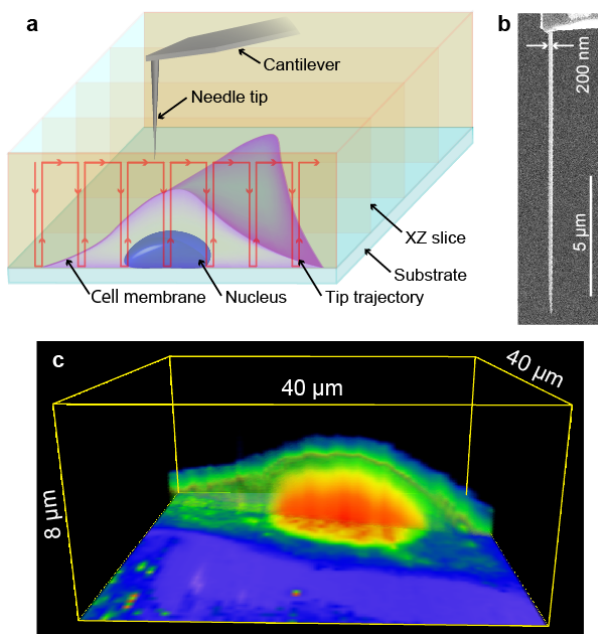


図 1: (a) ナノ内視鏡の原理. (b) ニードル探針. (c) HeLa 細胞の 3D ナノ内視鏡観察像¹.

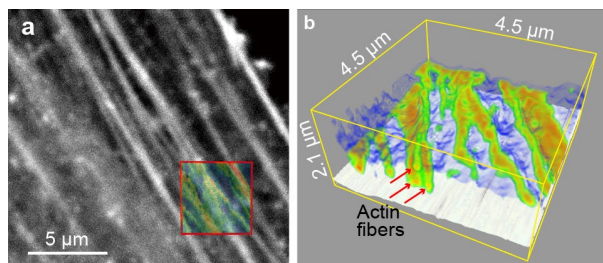


図 2: 生きた繊維芽細胞内のアクチン繊維¹.

(a) 蛍光顕微鏡像. (b) ナノ内視鏡像.

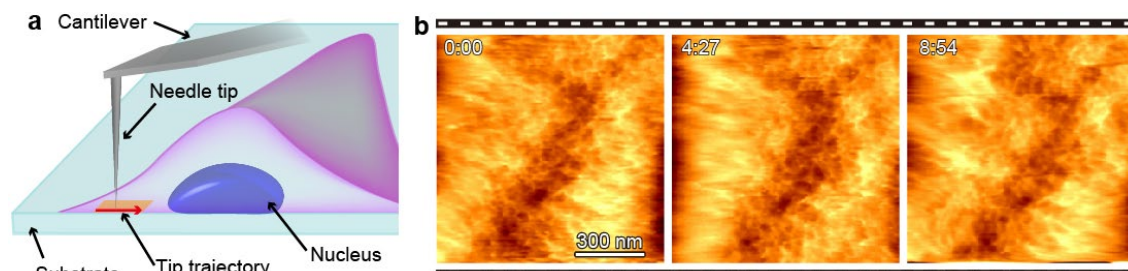


図 3: 生きた繊維芽細胞の細胞膜内側の構造¹. (a) 計測原理. (b) 2D ナノ内視鏡像.

(3) 細胞内に探針を挿入して、その状態で局所構造を 2D/3D-AFM 観察する方法を確立した。例

例えば、図 3 に示した例では、生きた繊維芽細胞の細胞膜の内側表面を、ナノ内視鏡により 2D 観察した。測定された AFM 像には、ナノスケールのメッシュ構造が見られる。これは、細胞膜の裏打ち構造にあたるアクチンメッシュが観察されているものと考えられる。この計測では、連続して同じ場所を観察し、この構造の動的変化を可視化することにも成功した (図 3b)。これらの像を精査すると、10 nm 程度の分解能が得られていることが分かる。これは、AFM にとってはまだまだ改善の余地のある数字であるが、すでにこの段階においても、超解像蛍光顕微鏡の分解能を上回っており、この手法でしか観察できない構造を観察することに成功したと言える。

(4) Calcein-AM と Propidium Iodide (PI) を使った蛍光アッセイにより、2D/3D ナノ内視鏡観察が細胞活性に与える影響を評価した。その結果、3D 観察については、核を含む細胞全体を観察したとしても、細胞活性に変化はなく、細胞に致命的なダメージを与えないことが分かった。また、細胞の局所を 2D 観察した場合には、走査範囲が 2 μm 以下であれば、細胞に致命的なダメージを与えない事が分かった。これらの結果は、ナノ内視鏡観察が細胞活性に与える影響が比較的軽微であることを示唆している。

(5) 3D ナノ内視鏡観察では、ニードル探針で繰り返し細胞を貫く必要があるが、この時、貫通に必要な力 (F_p) やインデンテーションの距離 (L_I) は小さいほど細胞への侵襲性は少ないものと思われる。我々は、様々な探針の直径や先端形状について、細胞膜貫通の成功率、 F_p 、 L_I を評価した。その結果、探針の直径や先端径は小さいほど良く、最適な条件では 100% 近い挿入成功率が達成できることが分かった。また、カンチレバー振動の有無による違も調べたが、これは意外にもこれらのパラメータに影響がほとんどないことも分かった²。

(6) 以上の通り、本研究では、ニードル探針を用いて生きた細胞の内部におけるナノ構造・動態の計測を実現するナノ内視鏡技術を開発した。これにより、細胞全体、細胞核、アクチン繊維などが、細胞に致命的なダメージを与えることなく観察できるようになった。今後は、この技術を用いて様々な細胞内のオルガネラやタンパク質集合体の構造や動態を観察し細胞内現象のナノレベルでの理解に挑戦する。また、AFM の持つもう一つの特徴である、ナノ力学計測の可能性も探っていく。

<引用文献>

1. Penedo, M.; Miyazawa, K.; Okano, N.; Furusho, H.; Ichikawa, T.; Alam Mohammad, S.; Miyata, K.; Nakamura, C.; Fukuma, T., Visualizing intracellular nanostructures of living cells by nanoendoscopy-AFM. Sci. Adv. 2021, 7 (52), eabj4990.
2. Penedo, M.; Shirokawa, T.; Alam, M. S.; Miyazawa, K.; Ichikawa, T.; Okano, N.; Furusho, H.; Nakamura, C.; Fukuma, T., Cell penetration efficiency analysis of different atomic force microscopy nanoneedles into living cells. Sci. Rep. 2021, 11 (1), 7756.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Penedo Marcos, Shirokawa Tetsuya, Alam Mohammad Shahidul, Miyazawa Keisuke, Ichikawa Takehiko, Okano Naoko, Furusho Hirotooshi, Nakamura Chikashi, Fukuma Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Cell penetration efficiency analysis of different atomic force microscopy nanoneedles into living cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7756
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-87319-3	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14件（うち招待講演 12件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 福間剛士
2. 発表標題 液中AFMによる界面現象や生命現象のオペランド計測と「次世代」の方向性
3. 学会等名 JST-CRSD科学技術未来戦略ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Fukuma
2. 発表標題 Visualizing Inside of 3D Self-Organizing Systems by 3D-AFM
3. 学会等名 The Virtual Symposium on Scanning Probe Microscopy: Current Status and Future Trends（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Fukuma
2. 発表標題 Visualizing Inside of 3D Self-Organizing Systems by 3D-AFM
3. 学会等名 Virtual RMS AFM & SPM Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Fukuma
2. 発表標題 Visualizing Inside of 3D Self-Organizing Systems by 3D-AFM
3. 学会等名 The 8th Multifrequency Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Miyata, M. P. Garcia, K. Miyazawa, T. Shirokawa, A. M. Shahidul, C. Nakamura, T. Fukuma
2. 発表標題 Visualizing Intracellular Structures with Sub-nanometer Scale Resolution by 3D-AFM in Liquid Environment
3. 学会等名 The 28th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM28) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮澤佳甫、Marcos Penedo Garcia、城川哲也、須崎萌、中村史、福間剛士
2. 発表標題 細胞の三次元内部構造を可視化するナノ内視鏡の創成
3. 学会等名 第81回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福間剛士
2. 発表標題 液中原子間力顕微鏡技術の開発とそのナノバイオサイエンスへの応用
3. 学会等名 第32回バイオエンジニアリング講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福間剛士
2. 発表標題 革新的バイオSPM技術による生命科学における未踏ナノ領域の開拓
3. 学会等名 LINK-Jネットワーキング・ナイト#40 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福間剛士
2. 発表標題 液中高分解能AFM技術の高速化と多機能化
3. 学会等名 日本学術振興会ナノプローブテクノロジー第167委員会 第93回研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福間剛士
2. 発表標題 液中原子間力顕微鏡による生きた細胞の表面および内部のナノ構造計測
3. 学会等名 ナノプローブ表面特性評価技術セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福間剛士
2. 発表標題 液中表面をAFMでみる
3. 学会等名 CSJ化学フェスタ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Fukuma
2. 発表標題 2D/3D-AFM imaging of biological systems and demands for advanced AFM data analysis
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of the Biophysical Society Japan (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福間剛士
2. 発表標題 液中原子間力顕微鏡による2次元および3次元界面計測技術
3. 学会等名 JASISコンファレンス「走査型プローブ顕微鏡を利用した先端分析技術」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福間剛士
2. 発表標題 高分解能液中原子間力顕微鏡技術の開発とその化学分野における応用
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 (招待講演)
4. 発表年 2019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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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