

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18190

研究課題名（和文）細胞膜の局所ナノスーツ膜化による細胞内外ナノ観察のためのMEMS液体セル

研究課題名（英文）MEMS liquid cell for visualization of nanostructures inside cell through local polymerized cell membrane

研究代表者

石田 忠（Ishida, Tadashi）

東京工業大学・工学院・准教授

研究者番号：80517607

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では細胞を破壊せずに、細胞が有する細胞膜を局所的に電子線透過膜に改変し、細菌内現象をナノレベル観察する手法を開発するために、単一の細菌をナノ孔で捕捉し、ナノ孔越しに細胞壁除去するための要素技術を開発した。単一細菌をナノ孔で捕捉するためにシリコン基板にサブマイクロメートルサイズの貫通孔をシリコンの異方性エッチングと収束イオンビームを用いて形成した。模擬ナノ孔を用いて単一細菌を捕捉し、露出部のみに試薬を送液するための技術開発を行った。また、細菌内部の観察を行うため、細菌内部の金属標識のために、細菌サイズリポソームの形成技術の開発を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シリコン基板にサブマイクロメートルサイズのナノ貫通孔を形成でき、そこに単一細菌を捕捉して、試薬をナノ貫通孔越しに接触できるようになった。これにより細菌の細胞壁を除去するリゾチームを部分的に単一細菌に作用することが可能となり、細菌表面の一部を電子線透過膜化できる可能性が上がってくる。また、本技術は細菌を全体ではなく部分的に改変することを可能とする技術として非常に重要である。一方、細菌サイズのリポソームを作製する技術であるが、これが実現すれば、細菌に大きな分子や物質を導入することが可能となる。今回は正電金ナノ粒子を導入することになるが、細胞のゲノムなど大規模な細菌の改変が可能となる。

研究成果の概要（英文）：We developed devices required for visualization of nanostructures inside a bacterium through locally polymerized cell membrane, such as formation of nanoscaled pore to capture a bacterium and to remove cellular wall through nanoscaled pore. We achieved a 500-nm square pore on a silicon substrate by the combination of anisotropic wet etching and focused ion beam etching. We also achieved capture a bacterium using a simulated nanoscaled pore and exposed the bacterium to chemical solution through the nanoscaled pore. For the electron microscope imaging, it is difficult to observe the inner structures of bacteria made of light materials and the structures should be covered with heavy materials. For this purpose, we developed double focus microchannel to generate bacteria-sized liposomes including positive charged gold nanoparticles for electro cell fusion.

研究分野：マイクロ流体

キーワード：細菌用マイクロ流路 電子顕微鏡 局所改変 ナノスーツ膜 内部標識

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、世界的な課題であるウイルスの感染は、ウイルスの吸着、ウイルス DNA(デオキシリボ核酸)の導入、細胞 DNA の分解、ウイルス DNA の増幅、ウイルス部品の合成、ウイルスの増幅、ウイルスの放出が繰り返される。しかし、従来の高分解能観察では細菌表面のウイルスの吸着と放出しか観察できず、ほとんどの過程を観察できない。しかも異なる細胞で各過程を観察するため、各過程の間におけるナノ構造の形成や構築、移動といった動態を調べられない。そこで、同一細胞内部の動態を高分解能観察する手法が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究では細胞を破壊せずに、細胞が有する細胞膜を局所的に電子線透過膜に改変し、細胞内現象、特にウイルスの感染過程を電子顕微鏡(SEM)観察する手法を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本申請の目的を達成する細胞内外観察用 MEMS 液体セルを開発するには、(A)細菌への局所ナノスーツ膜形成技術、(B)細菌内部の標識のためのリポソーム形成技術を開発する必要がある。

#### (A)細菌への局所ナノスーツ膜形成技術

細菌表面に局所的にナノスーツ膜を形成するためには、細菌をナノ孔で捕捉し、ナノ孔越しに細胞壁の除去して細胞膜を露出させる必要がある。

(1)細菌捕捉のためにナノ孔をシリコン基板に形成する。シリコンの結晶異方性を用いたウェットエッチングで結晶面に応じたナノ孔を形成することを試みた。他にも、シリコンのウェットエッチングにより貫通直前まで加工した上で、逆面から nm レベルの研磨する手法、収束イオンビーム(FIB)でサブ $\mu\text{m}$  レベルで加工する手法を試みた。

(2)ナノ孔の形成と並行して、微小開口に細菌を捕捉し、その微小開口のみに試薬を暴露することを試みた。模擬ナノ孔を有するマイクロ流路を作製した。模擬ナノ孔に細菌を捕捉し、捕捉した細菌に対して捕捉部分のみの試薬の送達を行った。

#### (B)リポソームを用いた細菌内部の標識技術

細菌の内部構造は炭素、酸素、水素、窒素が主成分であり、直接電子顕微鏡観察することは難しい。そこで、細菌の内部構造を重元素で標識し、反射電子や二次電子の発生量を増やす必要がある。細菌内部構造は府に帯電していることが多く、正帯電の金ナノ粒子を懸濁した細菌サイズリポソーム形成し、細菌のプロトプラストとリポソームを細胞融合することで実現する。そこで、直径 1  $\mu\text{m}$  のリポソーム形成技術を開発した。

### 4. 研究成果

#### (A)細菌への局所ナノスーツ膜形成技術

(1)TMAH を用いたシリコンのウェットエッチングでは 6  $\mu\text{m}$  角程度の開口を作製できたが、細菌をトラップできる大きさではなかった(図 1(a))。シリコンのウェットエッチングと研磨の組み合わせでは、研磨時に穴の貫通を検出できず数百 $\mu\text{m}$  角の開口が開いた(図 1(b))。シリコンのウェットエッチング後に収束イオンビームで加工したところ、500 nm 角の開口が得られた(図 1(c))。

(2)模擬ナノ孔として、PDMS 製のくびれ付きマイクロ流路を作製した。くびれのサイズは 1  $\mu\text{m}$  x 1  $\mu\text{m}$  の開口であり、くびれに単一枯草菌を捕捉し、捕捉した枯草菌に対して捕捉部分のみの

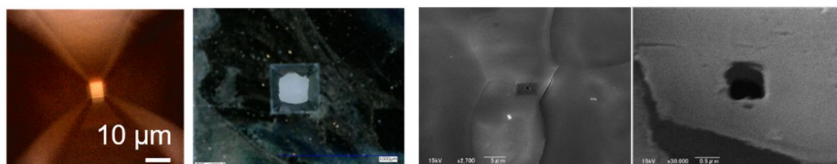


図1 作製したナノ孔。(a)ウェットエッチングのみ。(b)ウェットエッチング&研磨。(c)ウェットエッチング&FIB。

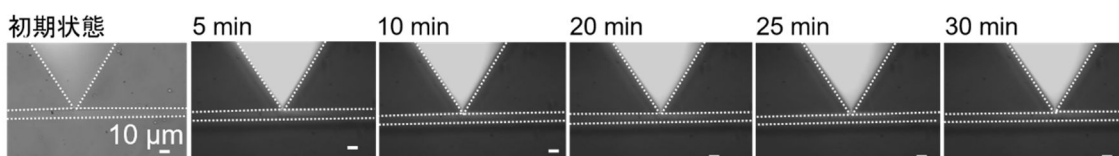


図2 模擬ナノ孔に捕捉した細菌への30分間局所試薬暴露。

フルオロセイン溶液の送達を行った。圧力制御によりくびれ露出部をフルオロセインに 30 分間暴露した(図 2)。一部のフルオロセインは主流路に流れ込み、枯草菌の下流側部分にフルオロセインが残留した。

(B) リポソームを用いた細菌内部の標識技術

マイクロ流路技術で開口  $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$  のダブルフォーカス構造を作製し(図 3)、オクタノールを油相として用いることで、リポソームを形成した。しかし、得られたリポソームは直径  $5\ \mu\text{m}$  であり、細胞融合を用いるには大きいものであった(図 4)。また、直径  $2\text{nm}$  の金ナノ粒子懸濁液を内水相の液体として用いたところ、 $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$  の開口が目詰まりした。

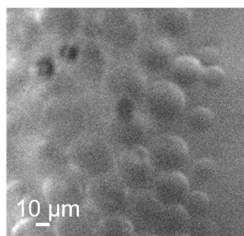
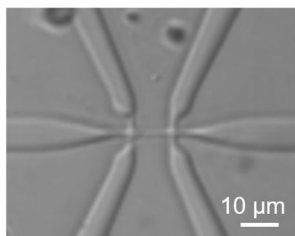


図3 ダブルフローフォーカス流路

図4 リポソーム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Akihiko Sugihara, Tadashi Ishida	4. 巻 12
2. 論文標題 Microfluidic Liquid Cell with Silicon Nitride Super-Thin Membrane for Electron Microscopy of Samples in Liquid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biosensors	6. 最初と最後の頁 1138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/bios12121138	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 Gai Yamauchi, Tadashi Ishida	4. 巻 332
2. 論文標題 Hydraulic microactuator with coarse/fine drive-switching mechanism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators: A. Physical	6. 最初と最後の頁 113082
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.sna.2021.113082	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 石田忠	4. 巻 88
2. 論文標題 液中にいるウイルス・細菌の電子顕微鏡観察のためのマイクロ流路技術	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 精密工学会誌	6. 最初と最後の頁 5-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2493/jjspe.88.5	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9件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 木内翠, 石田忠
2. 発表標題 マイクロ電極間の誘電泳動を用いた枯草菌プロトプラスト対の形成と電氣的細胞融合技術の開発
3. 学会等名 日本機械学会 第34回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木内翠, 石田忠
2. 発表標題 枯草菌の電気的細胞融合の条件探索に向けた並列マイクロ対向電極の開発
3. 学会等名 CHEMINAS46
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関口大雅, 石田忠
2. 発表標題 金属被覆した寒天製マイクロ流路作製技術開発と培養性能評価
3. 学会等名 CHEMINAS45
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関口大雅, 石田忠
2. 発表標題 収縮・膨張抑制による流路つき金属被覆寒天の電子線照射変形の低減
3. 学会等名 CHEMINAS46
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tadashi Ishida
2. 発表標題 MEMS Probes in Electron Microscope for Nanotribology
3. 学会等名 IEEE NEMS 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tadashi Ishida
2. 発表標題 MEMS for electron microscopy of liquid samples,
3. 学会等名 32nd 2021 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仁木 彰太, 石田 忠
2. 発表標題 大気圧電子顕微鏡内における観察と操作を両立する光ピンセット技術の開発
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第64回シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tadashi Ishida
2. 発表標題 Microfluidic device for multiscale biology
3. 学会等名 Fall 2023 Seminar Series, Mechanical & Aerospace Engineering, Samueli School of Engineering, UCLA (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tadashi Ishida
2. 発表標題 Microfluidic Technologies to Study Biology from nm to mm Scales
3. 学会等名 8th International Symposium on Biomedical Engineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 液中試料用顕微鏡装置	発明者 石田忠、仁木彰太	権利者 東京工業大学
産業財産権の種類、番号 特許、2021-173641	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

小俣石田研究室 <a href="http://www.bmm.mech.e.titech.ac.jp/">http://www.bmm.mech.e.titech.ac.jp/</a>
--

#### 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	林 智広  (Hayashi Tomohiro)  (30401574)	東京工業大学・物質理工学院・准教授   (12608)	
研究分担者	宮永 一彦  (Miyanaga Kazuhiko)  (40323810)	自治医科大学・医学部・准教授   (32202)	

#### 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
---------	---------