

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2012

課題番号：23680052

研究課題名（和文）電子線の水溶液中励起作用による1分子操作と細胞ナノ加工技術の開発

研究課題名（英文）Electron-beam induced single molecular manipulation and nano processing of living cell in aqueous solution

研究代表者

星野 隆行 (HOSHINO TAKAYUKI)

東京大学・大学院情報理工学系研究科・講師

研究者番号：00516049

研究成果の概要（和文）：

本研究は、コンピュータモデルに従い細胞膜のダイナミクスやドメイン構造を電子的に任意の状態に制御して、細胞膜の機能性を解析・理解することを目的としている。本研究では細胞膜を電子線による電気化学的反応により直接加工し、細胞膜の生体分子システムをリアルタイムに任意の状態に制御してその応答を解析することで、細胞膜の運動特性が細胞機能に与えるメカニズムを調査する研究を提案している。

研究成果の概要（英文）：

Our study reports a new method of in situ EB lithography in a non-vacuum liquid environment for a complete living cell; in the future, this research could lead to nano-surgery by molecular mechanics on a cell membrane. We expect this first demonstration of in situ nano processing and cellular nano stimulation can be utilized for real time analysis of changes in membrane protein dynamics. Our nano processing on a culturing living cell using an EB-induced reaction could directly manipulate the molecular physical dynamic function and chemical property of the environment. Moreover, theoretically, the EB had less than a nanometer scale wavelength, and the electron range in water was also 10s nm. Therefore this method can provide new approaches for in situ molecular level dynamics manipulation on membrane dynamics-related disorders, for example cancer metastasis, and repairing and regenerating neurons after injury; by combining it with single molecule imaging it can be used to understand how spatio-temporal dynamics affects their mechanisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	16,200,000	4,860,000	21,060,000
2012年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
年度			
総計	19,400,000	5,820,000	25,220,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体情報・計測，電子線描画，1分子計測

1. 研究開始当初の背景

細胞を解析する方法論では1分子単位の機

能計測技術の発達により分子システムの有機的なつながりを解析することが可能となっている。1分子機能計測は、生体分子に蛍光分子やビーズを標識して光学的に観察する方法である。このような1分子計測手法はまさに今活動している細胞内で計測する方法論であるので、細胞システムのダイナミックな動作を可視化して取り扱うことができる。

一方で分子システムを解析する際に観察の対として刺激方法が重要な要素であるが、タンパク質を1分子単位で任意の時刻、任意の場所で刺激する方法がまだ確立されていない。従来から用いられている受容器などへの刺激方法は、遺伝子工学的に光感受性タンパク質を発現させ光刺激を行う、あるいは多光子吸収したレーザー光の衝撃波効果で細胞膜を破壊する方法、原子間力顕微鏡のカンチレバーによる力学的刺激を与える方法などがとられていた。しかしながら可視域のレーザー光や機械式のスキャナを用いるこれらの手法はいずれも時間・空間的な解像度が分子のレベルに達していないことが問題点として挙げられる。任意の時刻に、任意の場所のタンパク質に対してダイナミックな刺激を与えることができる方法が必要である、リアルタイムに分子を操作する手法があれば、1分子機能計測手法と融合させ、生物のダイナミクスが分子解像度で解析が可能になる。分子の化学的な素過程と生物の創発的な機能のつながりを解析でき、疾患に対する薬効や幹細胞から分化誘導されるメカニズムを定量的に理解することが期待できる。

2. 研究の目的

細胞の機能が1分子計測により解析されている一方で、細胞を生かしたまま1分子を加工する方法はいまだ確立されていない。そこで本申請では、平成22年度までに研究代表者が実証した電子線励起による培養液中でのナノ造形および細胞加工の原理を応用し、細胞を生かしたまま電子線を照射し分子単位で加工・制御すること研究目的とする。任意の時刻、任意の場所の細胞膜を刺激・操作して細胞内のダイナミクスを解析することに挑戦する。

3. 研究の方法

窒化シリコン (SiN) ナノ薄膜を透過して電子線を培養用液に照射することで、培養細胞や細胞膜のナノ加工と観察をリアルタイムに行うことができるシステムを構築した。水溶液中での電子線の吸収エネルギーの分布は数10 nmの領域に分布し、2.5 keVの低加速電子においてはその範囲は細胞膜と同様のスケールとなることがシミュレーションによって明らかとなった。本装置ではこの水溶

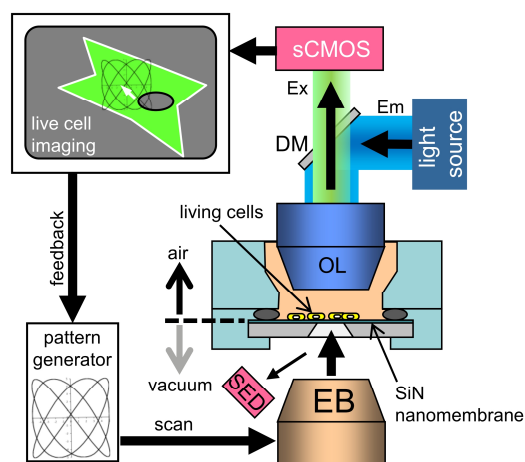


図1. 電子線描画装置の概略図。電子線光学系と蛍光顕微鏡が対向しており、描画中の様子をリアルタイムに観察できる。

液中での電子線励起領域を可視化し、その反応過程をリアルタイムに観察した。

電子線を液中の細胞膜に送達するために膜厚100nm以下の極薄膜で仕切られた真空・培養チャンバを作製した。

4. 研究成果

電子線を照射する細胞培養溶液中に導電性候分子の前駆体 EDOT を溶解させておくことで、励起エネルギーにより EDOT を重合、堆積させる様子をリアルタイムに計測することに成功した。高感度カメラによる電子線励起領域の可視化と、堆積反応のリアルタイム観察から、電子線が水中の化学反応に及ぼす効果を明らかにすることができた。2.5-5 keVの電子線照射による励起領域は267-473 nmの半値幅を持っていることが確認された。

(図2) また、10 mMのEDOT水溶液中では一辺約2 μm矩形領域が約10 sで造形できることがリアルタイム観察により確認された。

(図3) 同様の手法は生きた細胞 (C2C12, Hep G2) に適用することで、生細胞膜上のナノパターンを造形することが可能で、加工後の細胞膜には損傷が無いことが確認されている。(図4) 電子線描画後の細胞の分裂能は損なわれずに C2C12 細胞は照射後11時間で分裂している。これまでの基礎的な実験として、実際に培養細胞に電子線を走査し、細胞膜に「NANO」の文字を描画することに成功している。この造形技術を応用して細胞へのリアルタイムに任意のパターンを呈示するナノディスプレイを構築することで、実質的に等価な細胞膜のダイナミクスをナノ空間に実際にディスプレイして細胞のダイナミクスの解析ができると考えている。

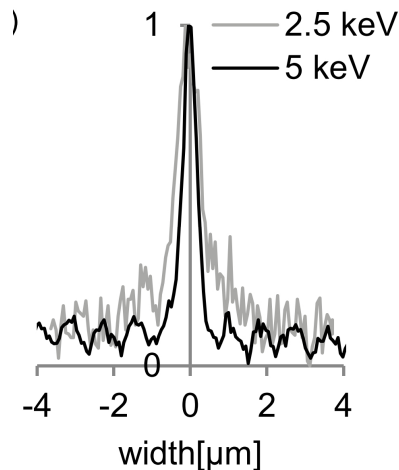


図2. 電子線照射による励起領域のプロファイル.

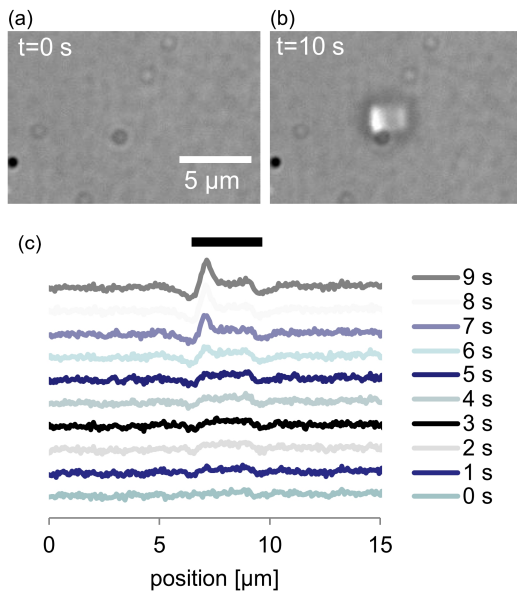


図3. 造形のリアルタイム観察. 10 mM の EDOT 水溶液中で 2.5 keV の電子線を矩形にスキャンした様子.

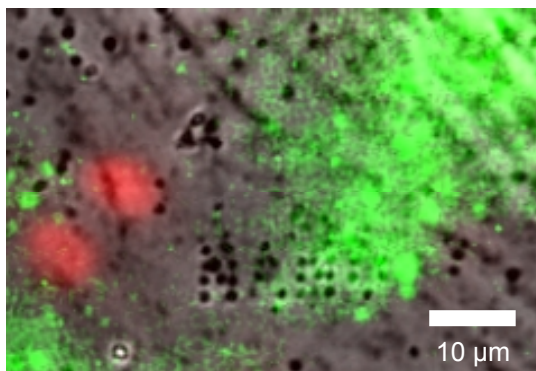


図4. 生きた細胞 (緑色) に「NANO」の文字を描画した. 描画中に細胞膜非透過性の赤色染色液を添加している. 細胞膜に損傷がある

と核が赤色に染色される. ターゲットの細胞 (右上) は核が染色されていないので膜損傷がないことがわかる

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

[1] Takayuki Hoshino, Kunihiro Mabuchi, "Closed-looped in situ nano processing on a culturing cell using an inverted electron beam lithography system," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 432 (2), pp. 345-349, (2013).

DOI 10.1016/j.bbrc.2013.01.100

査読あり.

[2] Takayuki Hoshino, Keisuke Morishima, "Electron-Beam Direct Processing on Living Cell Membrane", *Applied Physics Letters*, 99, pp.174102, (2011)

Doi:10.1063/1.3653278

査読あり.

[3] Takayuki Hoshino, Itsuro Saito, Reo Kometani, Kazuyuki Samejima, Shinji Matsui, Takafumi Suzuki, Kunihiro Mabuchi, and Yasuhiro X. Kato, "Improvement of Neuronal Cell Adhesiveness on Parylene with Oxygen Plasma Treatment", *Journal of Bioscience and Bioengineering* 113(3), pp. 395-398 (2012).

doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.11.003

査読あり.

[4] Takayuki Hoshino, Itsuro Saito, Haruka Takano, Kazuyuki Samejima, Kunihiro Mabuchi, and Yasuhiro X. Kato, "Neurite Outgrowth of PC12 cells on diX (Parylene) Family Materials," *Biotechnology Progress*, 28 (2), pp. 587-590, (2012).

doi: 10.1002/btpr.739

査読あり.

[学会発表] (計9件)

[1] 星野隆行, 満洲邦彦, "水溶液中の電子線励起堆積およびアブレーションによる生細胞への電子線直接描画(第3報) 電子線励起反応のリアルタイム観察と制御," 第60回応用物理学会春季学術講演会, 28p-G16-13(口頭発表), 神奈川工科大学(神奈川), 2013.3. 28.

[2] 星野隆行, "バーチャル分子リアリティをつくる ~電子線照射による細胞膜上のリアルタイムナノ加工~", 第3回NMMSセミナー(新学術領

域研究「ナノメディシン分子科学」), 東京大学,
(Jan. 31 2013.)

[3] 星野隆行, “細胞に「機能を描く」-電子線走査によるバーチャル分子システムの可能性-”, 細胞を創る研究会 5.0, P-84(ポスターセッション 口頭発表), 東京工業大学 すずかけホール (東京), 2012.11.21-11.22.

[4] Takayuki Hoshino, Keisuke. Morishima, “Closed-looped Nano Stimulation Microscope for Living Cell Membrane”, *Proc. 2012 7th IEEE International Conference on Nano/MicroEngineering and Molecular Systems (NEMS 2012)*, T4C-6, pp. 117-120, Kyoto (Japan), (March 5-8, 2012) (Oral).

[5] 星野隆行, 森島圭祐, “Electron-Beam Direct Processing on Living Cell Membrane Toward Ultra High-speed Molecular Manipulation”, *細胞を創る研究会 4.0*, P-63, pp.137, 千里ライフサイエンスセンター (大阪), 2011.10.24-18.

[6] 星野隆行, 森島圭祐, “水溶液中の電子線励起反応を用いたナノ空間の細胞膜の機能制御”, 日本機械学会第 3 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム講演論文集, 2-5, 船堀 (東京), 2011.9.26.

[7] 星野隆行, 森島圭祐, “水溶液中の電子線励起堆積およびアブレーションによる生細胞への電子線直接描画 (第2報) -低加速電子線励起による細胞培養液中の堆積反応-”, 第 72 回応用物理学会学術講演会, 山形大学(山形), 1a-V-12, 2011.9.1.

[8] 星野隆行, 森島圭祐, “電子線励起作用による細胞膜上のナノパターン生成と生体分子操作にむけた応用 (On Cell Membrane Nano Patterning Using Electron-Beam Induced Chemical Reaction Toward Single Bio Molecule Manipulation)”, 第 49 回日本生物物理学会年会, 兵庫県立大学(姫路), 1J1348, 2011.9.16.

[9] 星野隆行, 森島圭祐, “液相中の電子線励起化学成長法による細胞膜のナノ加工と導電性細胞インターフェースへの応用”, 第 29 回日本ロボット学会学術講演会論文集, 芝浦工業大学 (東京), 1D3-2, 2011.9.7.

[その他]

ホームページ等

<http://space.geocities.jp/takahoshino/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 隆行 (HOSHINO TAKAYUKI)
東京大学・大学院情報理工学系研究科
・講師
研究者番号 : 00516049

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし