

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770168

研究課題名(和文) 金属増強効果による超安定1分子計測法の確立

研究課題名(英文) Metal enhanced effect for stable single molecule imaging

研究代表者

新井 由之 (ARAI, Yoshiyuki)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：20444515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：1分子蛍光観察は、生体分子の動態を直接観察することができる強力な手法であるが、蛍光分子の褪色やゆらぎにより、長時間安定して観察することは難しい。そこで、本研究では、金属ナノ粒子による金属増強効果を利用して、安定した1分子観察法の確立を目的とした。金を核とした銀ナノ粒子基板を用いることで、蛍光1分子の蛍光シグナル増強の観察ができた。さらに、銀ナノ粒子によりコートした基板の上にさらにSiO₂をコートすることにより、細胞の状態を保ったまま、蛍光EGF分子の細胞膜上での金属増強効果の観察ができた。

研究成果の概要(英文)：Single molecule imaging is a powerful technique for the direct observation of dynamics of biomolecules. However, photo-bleaching and signal fluctuations of fluorophores prevent long time observation. To overcome this problem, here, we made stable single molecule observation system by using nano-particle metal enhancement effect for fluorescent probes. We could observe signal enhancement of single molecule fluorescence by Ag nano-particles with Au as core. In addition, by coating SiO₂ on Ag nano-particles coated glass surface, we could maintain the mammalian cell state and could observe metal enhanced fluorescent signals of fluorescently labeled epidermal growth factor.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：1分子 金属増強効果 金属ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

1 分子計測 (single molecule imaging) は、蛍光分子からのシグナルを、高感度検出器を用いて 1 分子レベルで検出することのできる技術である。背景光を劇的に減少させた、全反射顕微鏡により溶液中での蛍光標識したタンパク質 1 分子の観察から 19 年の年月が経過した (Funatsu, T. et al. (1995))。今日では、性能が向上した高開口数対物レンズやダイクロイックミラー、蛍光フィルターや、電子増倍型 CCD (EMCCD) カメラやアバランシェフォトダイオード (APD) に代表される高感度かつ低ノイズ検出器により、高いシグナル/ノイズ比での観察が可能となってきた。一方、従来からよく用いられている、テトラメチルローダミンに代表される、高い蛍光量子効率を持つような蛍光プローブや、Cy3, Cy5 などの、蛍光量子収率は低いが高いモル吸光係数、短い蛍光寿命を持つ Cyanine 系の明るい蛍光プローブは、1 分子計測が始まった当初から現在まで幅広く用いられている。また、Alexa シリーズや ATTO シリーズなど様々な蛍光プローブも開発されており、蛍光プローブの選択性はかなり高い。一方、遺伝的にコードされる蛍光タンパク質群も、特に細胞内の観察において広く使われている。Enhanced GFP (EGFP) をはじめ、Venus, mCherry 等が蛍光タンパク質の 1 分子イメージングによく用いられている (Yu, J. et al (2006), Seefeldt, B. et al (2008))。

1 分子計測を行う上で対面する問題点として、蛍光プローブの褪色や蛍光強度ゆらぎ (蛍光プローブの明滅現象) のために、一つの蛍光プローブを長時間安定して観察することは難しい点がある。特に、ライブセルイメージングで最もよく用いられる EGFP 等の蛍光タンパク質分子は、1 分子観察での条件下では、蛍光褪色までの時間が数秒程度であり、カメラの時間分解能が 30 フレーム/秒の場合、平均してたかだか数~10 数点程度のデータポイント数しか得る事ができない。これらの問題点を回避する為に、テトラメチルローダミンなどの蛍光プローブをタンパク質に標識したて計測が行われており (Matsuoka, S. et al. (2008))、蛍光タンパク質を使う場合に比べ、若干の改善が見られるが、細胞による観察の場合は褪色防止剤を併用することはできない為に、やはり蛍光褪色等の問題が付きまとう。1 分子観察に用いられる蛍光プローブは、一般に高いモル吸光係数や蛍光量子収率が求められる。そのため、特に CFP や群青色蛍光タンパク質 Sirius (Tomosugi, W. et al. (2009)) など、青色系の蛍光プローブの 1 分子観察例はなく、1 分子レベルでの多色同時観察を妨げる要因となっている。

近年、金属増強効果を利用した蛍光シグナルの増強が行われるようになってきた (Lakowicz, JR et al. (2003))。金や銀などの金属分子が蛍光プローブと約 100 nm 程度の

近傍にあるとき、金属表面の自由電子の振動 (局在プラズモン) と蛍光プローブの電気双極子モーメントとの相互作用により、蛍光プローブの励起効率、発光効率は数倍~数 10 倍程度増強されることが知られている。また、蛍光分子の蛍光寿命が短くなることから、励起された蛍光プローブがすぐに基底状態に戻るため、不安定な励起状態に留まる時間が短くなり、結果として蛍光褪色までの時間も長くなる。特に、蛍光量子収率の低い蛍光プローブに対する金属増強効果は著しい。これまでの研究により、蛍光プローブである Cy5 や蛍光タンパク質 EGFP 1 分子を金属増強効果により観察した例や、細胞膜上の蛍光タンパク質の観察例があり (Fu, Y. et al (2006), Moal, E. et al., (2007), Fu, Y. et al. (2008))、現在は蛍光強度や蛍光寿命の計測など、蛍光プローブの物理量計測にとどまっているが、今後ますます発展していくことが予想される。

2. 研究の目的

そこで、本研究計画では、金属増強効果により長時間・安定して蛍光プローブ 1 分子を簡便に再現性良く観察することができるシステムを開発することを目的とした。また、これまで 1 分子観察に用いることが出来なかったような、CFP や Sirius 等の蛍光量子収率の低い青色系の蛍光プローブの 1 分子可視化観察技術を確立することで、多色同時 1 分子観察を実現することを目的とした。

3. 研究の方法

金属ナノ粒子をガラス基板上に調整する方法として、金属イオンを還元して金属原子、金属クラスターを経てナノ粒子に調製し、ガラス基板上に沈着させる化学的方法 (Lakowicz, JR. et al (2001)) と、バルク金属を真空蒸着、あるいはスパッタリングで金属薄膜を形成したり、エッチングによるナノ構造形成等の物理的方法がある (Moal, E. et al (2007), Cui, X. et al (2010))。化学的方法では特別な装置がなくても、通常の生化学的な実験ができる設備であれば簡便に作成可能である。金属としては、銀が最も高い増強効果を得られるためこれを用いた。

金属による増強効果を得る為には、金属原子と蛍光プローブ間が約 100 nm 程度であることが望ましい。金属原子から距離が遠いと増強効果を得る事はできず、逆に近すぎると、今度は金属原子による消光により、返って蛍光シグナルの低下を招いてしまう為である。現在、銀と蛍光プローブの距離を離すために、アクリルアミドゲル中に蛍光プローブを包埋するといった方法が用いられている。本研究計画においては、金属層の上に、シリカ (SiO₂) の層を積層させることで、金属原子と蛍光タンパク質間の距離を変えることを試みた。

4. 研究成果

(1) 銀による金属増強効果観察

金属増強効果を得るためには、数 10~100nm 程度の大きさの金属ナノ粒子を基板の上に配置する必要がある。そこで、硝酸銀をグルコースで還元する、いわゆる銀鏡反応を用いて、厚み 0.12~0.17 mm のカバーガラス上に、銀ナノ粒子を構築した(3)。作成した銀ナノ粒子コートガラスは SEM (JSM-6700FT、日本電

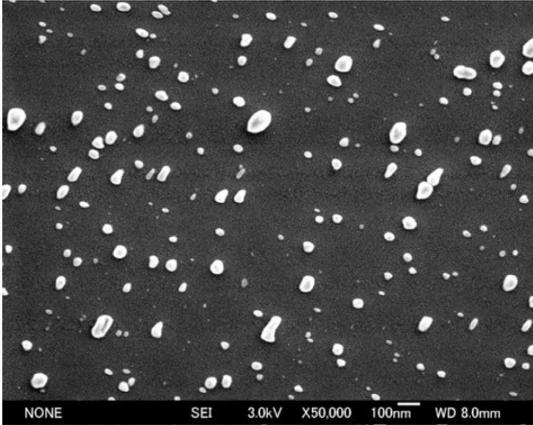


図1 銀をコートしたガラス基板の SEM 像。大小さまざまな大きさの銀粒子がガラス表面に吸着している。

子)により観察を行った。さらに、蛍光タンパク質である EGFP1 分子を全反射照明顕微鏡 (TE2000E、ニコン; Evolve:512, Photometrics) により観察を行った。図1は作成した銀ナノ粒子ガラス基板の SEM 像である。銀ナノ粒子はガラス基板上約 5% 程度カバーしていた。平均粒子数は 51 粒子/ μm^2 であった。緑がかった色となり、420 nm 付近に吸収極大を持っていた。このことは、大きさが数 10 nm 程度の銀ナノ粒子による表面プラズモン効果と考えられる。

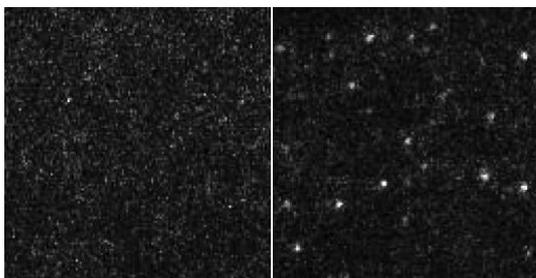


図2 銀による EGFP1 分子の金属増強効果観察。左: 通常のガラス、右: 銀コートされたガラス

図2は作成したガラス基板上における EGFP の蛍光 1 分子観察像を示している。通常のガラス基板上で蛍光がほとんど観察されない程度の弱い励起光でも EGFP の輝点が観察された。このことは、銀粒子による金属増強効果によると考えられる。

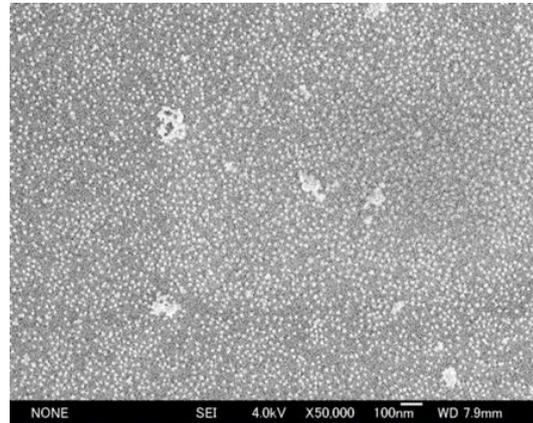


図3 アミノシランコートしたガラス表面へ標識した金粒子の SEM 像。

(2) 金を核とした銀コート基板

銀粒子を直接ガラス表面に結合させる方法は簡便ではあるが、粒子のばらつきが大きく、また、密度も低い。そこで、nm オーダーの金粒子を一旦ガラス表面に結合させ、その金粒子を核とした銀ナノ粒子によりコートされた基板の作成を行った。金ナノ粒子は反応性が高いため、アミノシランより標識したガラス表面に容易に吸着する。ガラスをアミノシランでコーティングする方法はいくつかあるが、蛍光性のゴミがでる頻度が最も少ない方法として、低压にした気相中でのガラ

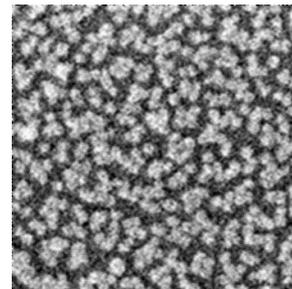


図4 金を核とした銀粒子コートされたガラス基板の SEM 像。長さは 500 nm

ス表面修飾法であることを見出し、これを用いた。金粒子は 9nm の大きさのものを作成した。金粒子の密度は 22.8% と銀のみの場合に比べ非常に高かった。この基板を用いて、還元法による銀の標識を行ったところ、均一な銀粒子基板を作成することに成功した(図4)。

次に、この基板を用いて、蛍光分子 Cy3 の観察を行った。今日商店顕微鏡を用いて観察を行った所、金属でコートされた基板上のみ、蛍光強度が増幅されていることを確認

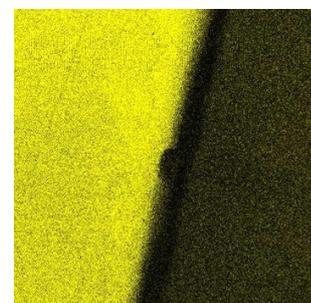


図5 Cy3 の蛍光観察。画面左が金を核とした銀コート基板。右は通常のガラス

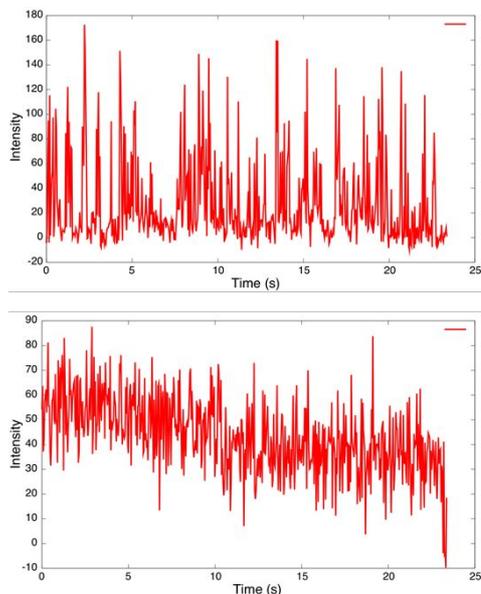


図 6 Venus 1 分子の 1 分子蛍光強度
上：通常ガラス 下：金属コートガラス
した（図 5）。

また、本基板を用いて、蛍光タンパク質 Venus の 1 分子蛍光観察を行った。Venus は明るいが蛍光褪色が非常に速い分子としてよく知られている。通常ガラス基板上では、Venus の蛍光強度は激しくゆらいでいた。一方、銀コートされたガラス基板上では、その蛍光強度はゆらいではいるものの、比較的安定しており、さらに 10 秒以上の観察が可能であった（図 6）。また、Venus 以外にも青色系蛍光タンパク質で、蛍光 1 分子観察には不向きとされてきた CFP 1 分子の金属増強による観察を行うことも確認出来ている。

（ 3 ）SiO₂ 基板を重ねた銀コート基板を用いた生細胞観察

金属による蛍光強度の増強効果のためには、金属と蛍光分子の距離を適切に離す必要

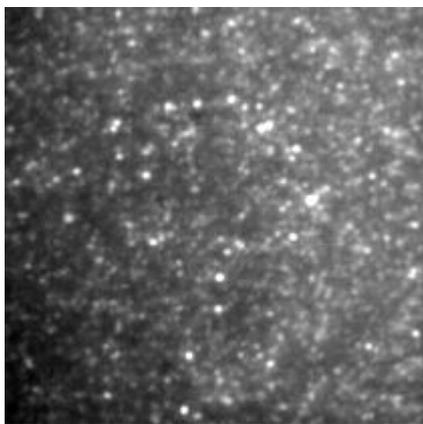


図 7 SiO₂ コートを重ねた銀ナノ粒子コートガラス基板上での、HeLa 細胞に結合した蛍光 EGF 分子の 1 分子観察

がある。金属には蛍光分子を消光する効果があるため、nm オーダーで近接すると蛍光強度が減少してしまう。従って、蛍光分子との距離を適度に離すため、銀コートした基板を SiO₂ でスパッタリングコートしたガラス基板を作成した。その基板上で、HeLa 細胞を培養し、Alexa488 で蛍光標識した EGF を添加し、全反射顕微鏡により蛍光 1 分子観察を行っ

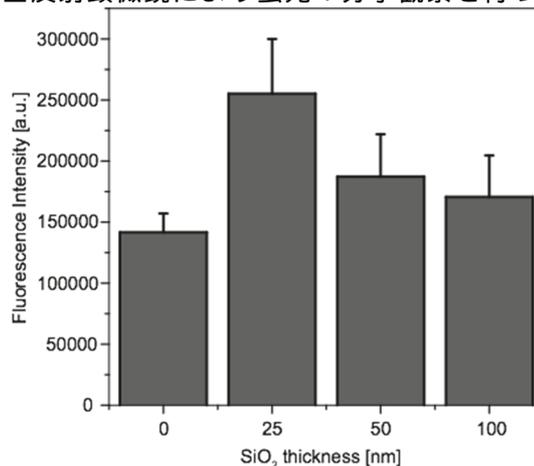


図7 銀コートした基板の上に SiO₂ をコートした場合の蛍光強度変化。25 nm の厚みの SiO₂ でコートした場合に最も蛍光強度が高くなっている

た（図 7）。観察された 1 分子輝点の蛍光強度を自動輝点追跡ツール PTA により解析した。その結果、SiO₂ の厚みが 25 nm の時に、最も蛍光強度が高くなることを見出した（図 8）。また、銀は基本的に生体組織に対する毒性を持っているが、SiO₂ でコートすることにより、その効果を防ぐことができることも見出した。

（ 4 ）まとめ

本研究により、金属によりコートされた基板を用いることで、蛍光 1 分子のシグナルを増強を確認した。また、SiO₂ 基板により、蛍光分子と金属コート基板の間隔を広げることで、より効果的に金属増強が起きることを確認した。従って、蛍光 1 分子を観察を補強する有力な方法であると考えられる。しかしながら、金属ナノ粒子は、その粒子に励起光があたると、散乱効果により弱い蛍光が発生することが知られている。本研究においても金属コートした基板は、蛍光シグナルの増強とともに、背景光が増強する問題が確認されている。これは、金属ナノ粒子の大きさに依存している。金属ナノ粒子の大きさを小さくすれば、その分背景光の上昇は抑えられるが、金属増強効果は逆に弱くなることが報告されている。背景光を抑えつつ、1 分子の蛍光強度を高い S/N 比で観察するためにはさらに条件を最適化する必要があると考えられる。

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 5件)

Uehara, S., Hanasaki, I., Arai, Y., Nagai, T., Kawano, S. (2014). Statistical characterisation of single-stranded DNA motion near glass surface beyond diffusion coefficient. **Micro and Nano Letters**, 9, 257-260, DOI:10.1049/mnl.2013.0668 査読有

Kong, S.-G., Arai, Y., Suetsugu, N., Yanagida, T., and Wada, M. (2013). Rapid Severing and Motility of Chloroplast-Actin Filaments Are Required for the Chloroplast Avoidance Response in Arabidopsis. **Plant Cell** 25, 572-590. DOI:10.1105/tpc.113.109694 査読有

Yamada, M., Kumamoto, K., Mikuni, S., Arai, Y., Kinjo, M., Nagai, T., Tsukasaki, Y., Watanabe, T.M., Fukui, M., Jin, M., et al. (2013). Rab6a releases LIS1 from a dynein idling complex and activates dynein for retrograde movement. **Nature Communications** 4, 1-10. DOI:10.1038/ncomms3033 査読有

Yasuhara, N., Yamagishi, R., Arai, Y., Mehmood, R., Kimoto, C., Fujita, T., Touma, K., Kaneko, A., Kamikawa, Y., Moriyama, T., et al. (2013). Importin alpha subtypes determine differential transcription factor localization in embryonic stem cells maintenance. **Developmental Cell** 26, 123-135. DOI:10.1016/j.devcel.2013.06.022 査読有

Ikezaki, K., Komori, T., Sugawa, M., Arai, Y., Nishikawa, S., Iwane, A.H., and Yanagida, T. (2012). Simultaneous Observation of the Lever Arm and Head Explains Myosin VI Dual Function. **Small** 8, 3035-3040. DOI:10.1002/smll.201200765

査読有

〔学会発表〕(計 1件)

Arai, Y., Fast single molecule particle tracking and analysis plugin with Java Native Interface, ImageJ User and Developer Conference 2012, 2012.10.24-26, Center de Recherche Public Henri Tudor, Luxembourg

〔その他〕

1 分子輝点追跡ソフトウェア Particle Track and Analysis <http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/bse/ImageJcontents/frameImageJ.html>

新学術領域「少数性生物学」第1回トレーニングコース 講師, 大阪大学産業科学研究所, 2013年7月28日-8月10日

新井由之, 輝点自動検出・追跡ツールの開発, 「画像科学」夏の勉強会, 核融合科学研究所(岐阜), 2012年9月25日-28日(招待講演)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 由之 (ARAI, Yoshiyuki)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号: 20444515