

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31日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23810016

研究課題名（和文） 蛍光ダイヤモンドナノ粒子を使った回転揺動の定量評価法の確立

研究課題名（英文） Quantitative analysis of rotational fluctuation by use of fluorescent nanodiamond

研究代表者

吉成 洋祐 (YOSHINARI YOSUKE)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・准教授

研究者番号：00501834

研究成果の概要（和文）：蛍光ダイヤモンドナノ粒子に内在する窒素-空隙センター（NVC）から出射される蛍光の強度データをシミュレーションに基づいて解析し、回転運動を定量評価する手法確立を目指した。スペクトル取得が可能な遅い回転運動の場合、生きた試料に導入された粒子の回転運動をモニターすることに世界で初めて成功した。速い回転運動では、蛍光時系列データから計算される自己相関関数の緩和時間が複数の NVC から構成される複合体の次元性に依存することを見出した。

研究成果の概要（英文）：A computational analysis for a time trajectory of fluorescence intensity emitted from nitrogen-vacancy center in fluorescent diamond nanoparticle was evaluated for investigating quantitatively rotational fluctuation on the particle. We found that it is possible to clarify a slow rotation by analyzing the spectra taken for a living sample. As for random fluctuation, the autocorrelation function reveals different relaxation times dependent on a dimensionality of complex constituted of multiple NVCs' in the particle.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成23年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成24年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：

科研費の分科・細目：ナノ材料、ナノバイオサイエンス

キーワード：1分子計測、ダイヤモンド

1. 研究開始当初の背景

生きた細胞や動物の器官内部で起こる様々な生物学的活動の動的振舞いを観察するには、蛍光色素で目印を付けた分子を試料内に導入し、その蛍光を顕微鏡で観察する方法が有用である。しかし、蛍光色素には①退色、②ブリンキング（星が瞬くような光の明滅）、③自家蛍光物質（生体内に蛍光色素と同じように励起光によって蛍光を出す物質）との混在、などの問題が存在し、細胞や個体に対する安定した蛍光観察は非常に困難と

されている。また、光計測に基づく計測技術であるために波長の半分程度の空間分解能しか期待できず、蛍光色素の微小な並進運動や回転運動を精度よく計測できる手法が望まれている。特に、従来の蛍光計測による回転運動の測定は、意図的に蛍光イメージのデフォーカスを行い、蛍光色素の電気双極子方位を露出させた輝点に対して行われており、蛍光輝点のイメージは荒く、角度精度は20°程度と考えられている。

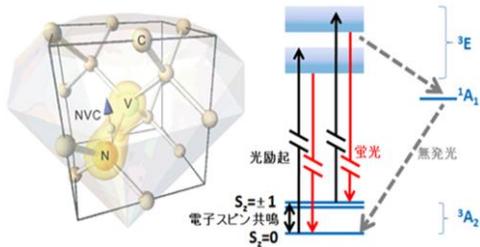


図1 (左) ダイヤモンド結晶構造と NVC の模式図。(右) 電子スピン共鳴と蛍光現象のエネルギー準位と遷移過程。

蛍光ダイヤモンドナノ粒子に内在する窒素-空位中心 (以後、NVC と略) は、不純物として結晶内に混入した窒素原子と炭素の空隙が隣接したときに生ずる格子欠陥の一種で、従来の蛍光色素に見られた上記①②の問題を払拭し、細胞など生きた試料に対する 1 分子計測に極めて有効な蛍光物質であることが最近の研究で明らかになってきた (A. Gruber et al., SCIENCE 276, 2012 (1997))。NVC はスピン三重項状態を形成する基底状態を持つと共に、放射される蛍光強度がスピン状態に依存するという極めて希な物性を持つために、電子スピン共鳴 (ESR) 実験、即ちスピン状態を光計測で検出する光検出磁気共鳴計測が可能である。また、NVC は磁気異方性を持つために、通常の ESR 実験と同様に外部から印加された磁場方位に対してその光検出磁気共鳴スペクトルが顕著に変化し、数° の角度変化の計測も可能である。

通常の ESR 計測に比べ 5 桁も高感度な蛍光計測を利用する本計測手法は、細胞内に導入されたナノメートルサイズの粒子に内在する数個の NVC からの信号を検出することも可能である。このような使い方は、正に NVC を原子サイズの磁気センサーとして、その周囲環境を局所的に測定できる究極の磁気共鳴手法であり、測定に 10^8 個もの電子スピンを必要とする集団平均値を計測する従来の ESR と比較しても極めて優れている。

しかしながら、結晶構造上、ナノ粒子内には sp^3 軌道に由来する 4 つの等価な NVC が存在するほか、NVC を記述する磁気相互作用の対称性から、試料内に存在する粒子の絶対方位を決定する方法は未着手のままである。また、回転運動を定量的に解析する手法は未だ確立されていない。

2. 研究の目的

本研究では、複数の NVC を含むダイヤモンドナノ粒子に対して、その微小な回転運動ならびにその時系列データの解析手法の確立を目指し、計測実験パラメータの最適化に関する指針、回転運動の振幅強度・周波数な

での導出方法を検討した。また、実際の細胞などに導入されたダイヤモンドナノ粒子に対する実験結果に適応できるように、上記物理量の絶対値を比較・検討する手法確立を目的とした。

3. 研究の方法

主に数値計算に基づいた。粒子の方位を与える角度情報を用意し、それを基にスペクトルを計算した。計算にあたっては、NVC の基底スピン状態を記述するハミルトニアンにゼーマン相互作用を加えたハミルトニアンを出発点とし、行列の対角化による厳密解を求めた。なお、粒子内部には sp^3 軌道に由来する 4 つの等価な NVC が存在するので、各 NVC に対して上記対角化を行い、全 NVC または個数を指定した場合のスペクトルを計算した。

① 遅い回転運動の場合

スペクトルを測定する時間内では粒子の回転が無視できると仮定した。NVC の回転に関しては、4 方位の NVC を実験室系に固定し、外部磁場の方位を極座標表示の 2 つの角度で指定することで NVC の回転を表現した。

② 速いランダム回転運動の場合

印可する磁場方向を実験室系に固定した。そして、粒子の方位を指定するために、3 つのオイラー角を一組として、最大 10^7 組の角度時系列データを作成した。3 つの角度に対しては等方的な正規分布を仮定して独立に乱数を発生させ、逐次計算によりランダムウォークを行わせた。なお、オイラー行列は作用させる順番に依存して対象物の方位が変化してしまう。その事実を考慮したランダムウォーク回転行列が提唱されていたので、それを採用した (Daniel A. Beard and Tamar Schlick, Biophysical Journal 85, 2973 (2003))。

速い回転運動の場合にはスペクトルを取得する時間はないので、高周波磁場の照射周波数を固定し、その位置における蛍光強度を計算した各スペクトルから抽出した。その時系列データから統計解析や自己相関関数を計算し、解析を実施した。

③ 周期性のある振動の場合

角度の時系列データに周期性を盛り込み、対応するスペクトルを計算した。指定した高周波周波数位置での蛍光強度を抽出し、蛍光強度の時系列データを収集した。その時系列データに対してフーリエ変換による周波数スペクトルの解析を実施した。

4. 研究成果

① 遅い回転運動の場合

生きた線虫の腸内に導入されたダイヤモンドナノ粒子に対して測定されたスペクトルを解析した。その結果を図 2 にまとめる。図 2(b) は、測定スペクトルに対しフィッティングを実施した例を示す。10 分毎に取得した各スペクトルから 2 つの角度を導出し、その時系列変化を極座標プロットしたのが図 2(c) である。生きた生体試料である線虫の腸内でサブミクロンの大きさを持つ粒子がゆっくりと転がる詳細な様子を得ることに世界で初めて成功した。図 2(d) は、測定開始から 20 分後のスペクトルに対しフィッティングの残差分布を計算した結果である。 C_{3v} の結晶対称性とハミルトニアン の性質により、他の角度でも同等な残差を与える組合せが存在することがわかった。回転の様子を把握するには初期角度の周辺に位置する解を注意して追跡する必要がある。

一方、一連のシミュレーションを通して、磁場方向と粒子回転軸が一致した場合には、回転運動はスペクトルに反映されないことも判明した。これを解決するには、複数方向に磁場を印加したスペクトルを測定し、同時にフィッティングを実施することで回避できることがわかった。

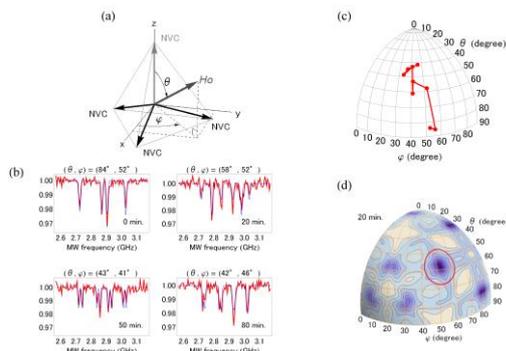


図 2 (a)等価な 4 方位の NVC と磁場方向の定義。(b)測定スペクトルにフィッティングをかけた例。(c)導出した角度時系列変化の極座標プロット。(d)測定開始から 20 分後のスペクトルに対しフィッティングの残差分布を計算した例。

② 速いランダム回転運動の場合

図 3 に時系列データから計算した自己相関関数を semi-Log プロットした結果を示す。赤、緑、オレンジ、青の緩和曲線は、それぞれ、NVC の方位数を 1、2、3、4 に設定した場合に相当する。特徴的な事は、NVC 方位数が 1~3 の場合には、緩和曲線が拡散係数: D の約 6 倍 (6D) で減少する一方、NVC 方位数が 4 になると、約 20D で急激な減衰を示すことである。

上述した相違の原因を探るために、面内に複数の NVC が横たわる系と、X, Y, Z の直交座標系の各軸に NVC が配向している 3NVC

を持つ系、を仮想的に作り、同様な計算手順を経て自己相関関数を計算した。その結果、NVC が面内に存在する場合には、緩和時間は 6D となり、一方で 3 次元性が増すと 20D となることがわかった。この結果は、ランダムな運動であっても系の次元性が時系列データに反映されることを意味し、蛍光体の形状を考慮した正しい解析が粘性係数などの導出には必須であることを意味する。

時系列データのヒストグラムは、印可する磁場強度が増えていくと低強度側の分布頻度が減少する傾向を示した。これは磁場強度が強すぎると信号が定点観測の周波数から大きく離れてしまい、信号が存在しないバックグラウンドを計測する頻度が多くなることによる。この状態は運動のコヒーレンスが分断されることを意味し、定量的な解析を妨げる。信号が分裂しても信号成分を捉え続けるためには、大きな分裂を誘発させない 0.5mT 程度の磁場印可を最大値とすべきであることがわかった。

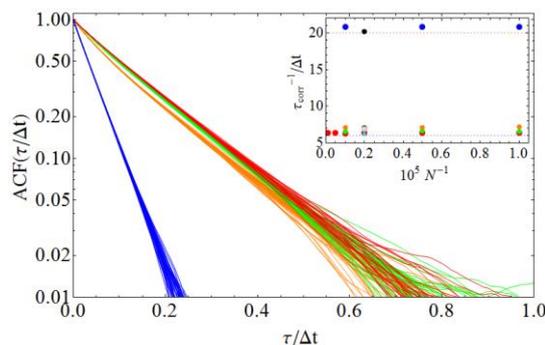


図 3 10^6 個の蛍光強度時系列データをシミュレーションによって作り、その自己相関関数を計算した。D=1 を仮定した。赤、緑、オレンジ、青は NVC 方位数を 1、2、3、4 とした時の緩和曲線である。それぞれ 40 回の独立した乱数発生に基づく時系列データを作成し結果を検証した。内挿図: 減衰時定数の時系列データ個数依存性。シアン、グレー、黒の各点は、前者二つは面内に 4NVC、6NVC を持つ系、後者は X, Y, Z 各方位に配向した 3 つの NVC を持つ系、を想定し、同様な計算をした結果。

③ 周期性のある振動の場合

磁場方向と同じ回転軸を持って振動している場合には、ハミルトニアン の性質から各 NVC と外部磁場との成す角度に変化がないために、時系列データには運動が反映されなかった。このような場合に望まれる測定方法は、磁場を複数の方向に変えながら、時系列データを取得することである。磁場方位の変更は、別途開発した任意方向に最大 3mT の磁場を印加できる三軸電磁石システムを用いることで解決できる。

図 4 は磁場方位に依存して出現するピーク周波数が異なる例を示している。NVC を含

む粒子に 1Hz の振動を与えたが、印可する磁場方向によっては、基準信号は出現せず 2 倍高調波成分がパワースペクトルに現れることもあった (図 4 右図)。これは時系列データ取得に際し、指定した高周波周波数位置に等価な NVC に帰属される信号成分が頻繁に出入りするためと考えられる。最も低い周波数成分が真の周波数成分であるとは限らず、この場合でも複数方向に磁場を印加した測定を実施し、多次元的な解析を実施する必要があることがわかった。また、振動の検出感度も磁場方位に依存した。

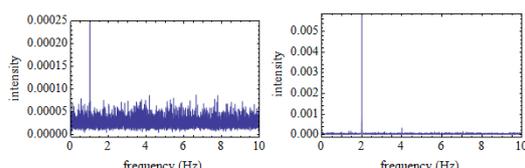


図 4 1Hz の周期振動を仮定し、磁場方位を 90° 変えた時の時系列データから計算されたパワースペクトル。

ダイヤモンドナノ粒子の回転運動計測は、外部磁場が印可された環境下でスペクトルが顕著に変化する特徴を利用した手法である。速い回転運動に対するシミュレーションから得られた知見は、2.87GHz に高周波周波数を設定して蛍光強度を計測する条件が粒子の運動情報を含む時系列データを取得する上で最も汎用性が高い条件と思われる。

④ 実試料に対するデータ収集

光ピンセット技術を使って約 100nm の平均粒径を持つダイヤモンドナノ粒子のトラップを行い、回転揺動の計測を試みた。しかし、トラップ光の照射パワーに依存して信号強度の減少または消失が確認された。吸収バンドの存在や試料温度の上昇、電子状態の変化などが示唆される。

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 0 件)

論文準備中

[学会発表] (計 7 件)

- ① 森重之、五十嵐龍二、横田浩章、白川昌宏、吉成洋祐、原田慶恵、「蛍光ダイヤモンドナノ粒子を使った新規 1 分子イメージング法の開発」、第 35 回分子生物学会、2012 年 12 月 11 日～14 日、福岡国際会議場
- ② 吉成洋祐、「Selective Imaging and Observation of Fluorescent Diamond introduced in living biological

sample」、Workshop on Quantum Information Using NV Centers in Diamond、2012 年 12 月 02 日～08 日、Bonamanzi Lodge(南アフリカ)(招待講演)

- ③ 吉成洋祐、「少数スピンの磁気共鳴計測技術」、スピンと生命の融合—バイオスピントロニクスの可能性を探る—(新世代研究所)、2012 年 11 月 27 日、東京大学・本郷(招待講演)

- ④ 森重之、吉成洋祐、五十嵐龍治、外間進悟、横田浩章、栃尾豪人、白川昌宏、原田慶恵、池田和寛、角谷均、「ナノダイヤモンドを用いた光検出磁気共鳴顕微鏡装置の開発と生物試料への応用」、第 51 回 NMR 討論会、2012 年 11 月 8 日～10 日、ウイックあいち

- ⑤ 吉成洋祐、「光検出磁気共鳴と生物試料への応用」、大阪大学蛋白質研究所セミナー、2012 年 07 月 31 日～08 月 01 日、大阪大学蛋白質研究所(招待講演)

- ⑥ 吉成洋祐、「Selective Imaging and Observation of Fluorescent Diamonds Embedded in Live Cell and C. elegans」、Materials Research Society、2012 年 04 月 09 日～13 日、Moscone West Convention Center, San Francisco, CA(アメリカ)(招待講演)

- ⑦ 吉成洋祐、「Optically detected magnetic resonance and its application toward nano-scale in-vivo imaging」、日本分光学会、2011 年 11 月 30 日、理化学研究所横浜研究所(神奈川県)(招待講演)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉成 洋祐 (YOSHINARI YOHSUKE)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・准教授

研究者番号：00501834