

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25600052

研究課題名(和文) 表面プラズモン増強効果を利用した細胞内分子マニピュレーション手法の開発

研究課題名(英文) Development of molecular manipulation in biological cells with surface plasmon resonance based optical trapping

研究代表者

細川 千絵 (Hosokawa, Chie)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：60435766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、表面プラズモン共鳴効果を利用した細胞内分子操作手法について検討した。プラズモニックチップ上で神経細胞を培養し、細胞表面に局在する量子ドット標識神経細胞接着分子にレーザー光を照射したところ、レーザー集光領域における平均通過時間がカバーガラスで培養した結果と比較して長くなることを見出した。同様の結果はナノ粒子分散系においても確認された。以上の結果から、表面プラズモン共鳴効果に基づき光捕捉力が増大し、単一ナノ粒子の粒子運動や細胞表面の分子運動が強く束縛されたと考えられ、本手法が細胞の局所光操作に有用であることを実証した。

研究成果の概要(英文)：We demonstrate surface plasmon resonance based optical trapping using a plasmonic chip toward realizing effective manipulation of molecules on the surface of neurons. Surface-plasmon-enhanced optical trapping was evaluated by the fluorescence analysis of nanoparticles suspended in water and neural cell adhesion molecules (NCAMs) labeled with quantum dots (Q-dots) on rat hippocampal neurons. The motion of nanoparticles in water and the molecular dynamics of NCAMs on neuronal cells cultured on a plasmonic chip were constrained at the laser focus more effectively than those on a glass substrate because of the surface plasmon resonance effect.

研究分野：応用物理学

キーワード：光ピンセット ナノバイオ 表面プラズモン共鳴 神経細胞

1. 研究開始当初の背景

集光レーザービームの光放射圧に基づく光ピンセット技術は、微小物質を非接触に操作する手法として広く利用されている。一方、金属ナノ構造に光を照射すると、表面プラズモン共鳴場による増強電場が誘起され、集光レーザーよりも遥かに大きい放射圧が粒子に働くこと期待される。このようなプラズモン励起に基づく増強放射圧をナノ粒子の光捕捉に応用する研究は、理論研究より進展しており、新たな光ナノマニピュレーション技術として近年注目を集めている。しかしながら、これらの研究のほとんどは金属ナノ粒子やナノ構造による局在プラズモン共鳴場を利用するものであり、増強電場の局在に限られ、任意の位置に増強電場を誘起することができないことから、自己組織的に成長する細胞内の分子動態のマニピュレーション手法として利用することは困難となる。

そこで本研究では、従来の光ピンセット用近赤外レーザーを波長オーダーの周期構造を有する金属回折光子(プラズモニックチップ)に集光し、表面プラズモン共鳴場による増強電場を利用することにより、集光レーザービームの光捕捉力を増大する手法について検証した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、顕微鏡下において光ピンセット用近赤外レーザーをプラズモニックチップに集光することにより、表面プラズモン共鳴効果を利用した新規光マニピュレーション手法を開発し、細胞表面に局在する特定分子のマニピュレーション手法として応用するものである。

プラズモニックチップは入射光をチップ界面に結合させることにより基板表面に増強電場を局在させることが可能である。電場の増強に伴う光捕捉力の増大について検証するためには、最適な条件の探索が必要となる。さらに、プラズモニックチップを用いた細胞内分子のマニピュレーションの実現のため、プラズモニックチップ上で細胞を培養し、蛍光標識した細胞内機能分子に適用することにより、細胞内分子の捕捉、操作について検証した。蛍光解析により、プラズモニックチップ上で培養した細胞表面の特定分子の拡散、会合、反応特性を明らかにし、細胞局在分子の高次操作技術への応用を探索する。

3. 研究の方法

本研究では、従来の光ピンセット用近赤外レーザーをプラズモニックチップに照射し、表面プラズモン共鳴効果により界面近傍に局在する分子やナノ粒子をマニピュレーションする技術を開発し、細胞内の特定分子の操作技術として応用する。以下に研究方法の詳細を示す。

(1) 表面プラズモン共鳴を用いた細胞内分

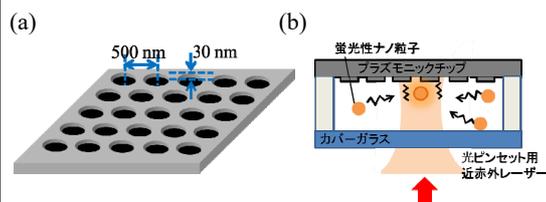


図1 プラズモニックチップ(a)、およびナノ粒子の光捕捉実験手法(b)の模式図。

子マニピュレーションのための蛍光解析システムの構築と溶液中ナノ粒子のマニピュレーションの実証

光ピンセット用近赤外レーザーとプラズモニックチップとを組み合わせた蛍光解析システムを構築し、蛍光性ナノ粒子を用いてプラズモニックチップの有効性について検証した(図1)。プラズモニックチップとして、カバーガラス上にピッチ 500 nm の二次元周期構造を作製し、金属層(銀)と消光抑制層(シリカ層)を成膜したものをを用いた。蛍光性ナノ粒子として、粒径 40 nm の蛍光性ポリスチレンナノ粒子(蛍光ピーク波長 560 nm)、粒径 15-20 nm の蛍光性量子ドット(Q-dot)ナノ粒子(発光ピーク波長 655 nm)を用いた。ナノ粒子の水分散液をカバーガラスに滴下し、スぺーサーを介してカバーガラス、もしくはプラズモニックチップにより封入する実験系を構築した。

光ピンセット光源として、波長 1064 nm の Nd:YVO₄ レーザーを用いた。レーザー光を倒立顕微鏡に導入し、100 倍の油浸対物レンズ(N.A. 1.3)により試料に集光した。細胞の蛍光観察用の励起光源として、水銀ランプの WIG 励起を使用した。試料からの蛍光は EM-CCD カメラで蛍光像を取得した。蛍光相関分光測定では、レーザー集光領域における蛍光をアバランシェフォトダイオードにより検出し、コリレーターを用いて蛍光強度の自己相関関数を取得した。

(2) 表面プラズモン共鳴効果による細胞表面分子のマニピュレーションの実証

細胞表面分子のマニピュレーションの実証実験のため、ラット海馬由来神経細胞を用いた。胚令 18 日目のラット胎児脳より海馬領域を取り出し、トリプシン処理により細胞を解離した後、カバーガラス、またはプラズモニックチップ基板の上にシリコンゴム製チャンバーを接着した培養皿に細胞を播種し、37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。

神経細胞表面に局在する神経細胞接着分子(NCAM)を生細胞条件で可視化するため、培養神経細胞に対して固定処理、膜透過亢進処理を省いて免疫蛍光染色を行った。一次抗体としてマウス抗ラット NCAM 抗体、二次抗体として Q-dot 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を用いて蛍光染色した。

4. 研究成果

(1) 表面プラズモン共鳴を用いた細胞内分子マニピュレーションのための蛍光解析システムの構築と溶液中ナノ粒子のマニピュレーションの実証

粒径 40 nm の蛍光性ポリスチレンナノ粒子水分散液を封入したカバーガラス表面に光ピンセット用レーザーを集光すると、レーザー集光領域において粒子からの二光子励起蛍光が検出され、蛍光相関分光測定により単一ナノ粒子の拡散運動の計測が可能であることを確認した。次に、ナノ粒子を封入したプラズモニックチップ表面にレーザーを集光すると、カバーガラスでの結果と比較して、レーザー集光領域における粒子運動が遅くなり、より強く束縛されることを見出した。以上の結果は、表面プラズモン共鳴効果に基づいて光捕捉力が増大した可能性を示唆している。

次に、表面プラズモン共鳴効果を用いた光ピンセットの有効性について検証するため、単一 Q-dot ナノ粒子の光捕捉過程の蛍光解析を行い、光捕捉力の増大機構について考察した。Q-dot 水分散液をカバーガラス、もしくはプラズモニックチップにより封入し、蛍光相関分光測定により Q-dot ナノ粒子の粒子運動を計測した。プラズモニックチップの周期構造表面に光ピンセット用レーザーを集光すると、レーザー集光領域における Q-dot 粒子からの二光子励起蛍光強度の自己相関関数の減衰時間はカバーガラスでの結果と比較して遅くなり、ナノ粒子が集光領域を通過する平均時間が増加した。周期構造表面における平均通過時間は、周期構造のないフラットな金属表面と比べて増加したことから、表面プラズモン共鳴効果に基づく光捕捉力の増大が示唆された。さらに、照射レーザー光強度やプラズモニックチップの銀膜厚を変化させ、効率よくナノ粒子を光捕捉するための条件について検討した。照射レーザー光強度が高い場合、或いはプラズモニックチップ表面の銀膜厚の増大に伴い、ナノ粒子の平均通過時間の増加が顕著にみられた。以上の結果は、照射レーザー光強度やプラズモニックチップの銀膜厚の変化が光捕捉力の増大に関与しており、効率良く単一ナノ粒子が捕捉される可能性を見出した。

(2) 表面プラズモン共鳴効果による細胞表面分子のマニピュレーションの実証

従来、単一分子での光捕捉が困難とされている神経細胞表面に局在する分子に着目し、Q-dot で標識した神経細胞接着分子 (NCAM) に対して、プラズモン光ピンセットによりその分子動態が効率よく光捕捉されるかについて検証した。まず比較実験として、カバーガラス基板上で培養した神経細胞 (培養 15 日目) に局在する NCAM を Q-dot により標識し、光ピンセット用レーザー (レーザー光強度 100 mW) を照射すると、レーザー集光領域において Q-dot 標識 NCAM からの二光子励起蛍光が観測された。蛍光相関分光測定によ

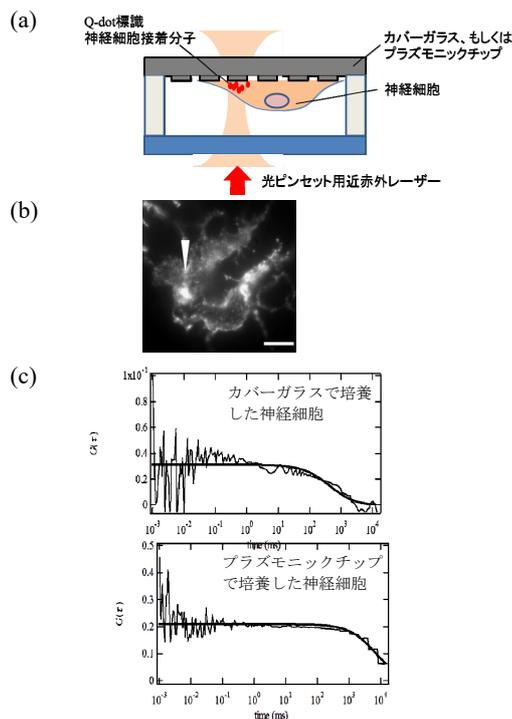


図 2 (a) 神経細胞に局在する Q-dot 標識 NCAM の光捕捉の模式図。(b) プラズモニックチップで培養した神経細胞に局在する Q-dot 標識 NCAM の蛍光像。(c) Q-dot 標識 NCAM のレーザー集光領域における蛍光強度の自己相関関数。

り Q-dot 標識 NCAM の平均通過時間 τ_D は、 1096 ± 1013 ms ($N = 9$) と得られた。これに対して、プラズモニックチップで培養した神経細胞に対して免疫蛍光染色を行い、レーザーを集光して蛍光相関分光測定を行った結果、蛍光強度の自己相関関数の減衰時間が遅くなる傾向がみられた。Q-dot 標識 NCAM の平均通過時間 τ_D は、プラズモニックチップの周期構造表面では 4806 ± 3823 ms ($N = 7$) と得られ、カバーガラス上で培養した神経細胞での τ_D と比べて約 4 倍に増加した。プラズモニックチップで培養した神経細胞表面に局在する Q-dot 標識 NCAM は、レーザー集光領域において強く束縛されることを見出した。これらの結果は、表面プラズモン共鳴効果に基づき光捕捉力が増大したことに起因すると考えられる。

以上の結果から、表面プラズモン共鳴効果を利用した光ピンセットにより光捕捉力が増大し、単一ナノ粒子の粒子運動や細胞表面の分子運動が強く束縛されることを見出し、本手法が神経細胞の細胞表面分子のマニピュレーションに有用であることを実証した。

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 8 件)

- ① Kohei Miyauchi, Keiko Tawa, Suguru N. Kudoh, Takahisa Taguchi, and Chie Hosokawa, Surface plasmon-enhanced optical trapping of quantum-dot-conjugated surface molecules on neurons cultured on a plasmonic chip, Japanese Journal of Applied Physics, 査読有, Vol. 85, 2016, pp. 06GN04-1-6. DOI: 10.7567/JJAP.55.06GN04
- ② 細川千絵, 集光レーザー摂動による神経細胞ネットワークの局所操作, レーザー研究, 査読有, Vol. 44, 2016, pp. 244-249.
- ③ Keiko Tawa, Chisato Sasakawa, Tsuyoshi Fujita, Kazuyuki Kiyosue, Chie Hosokawa, Junji Nishii, Makoto Oike, and Norihiro Kakinuma, Fluorescence microscopy imaging of cells with a plasmonic dish integrally molded, Japanese Journal of Applied Physic, 査読有, Vol. 55, 2016, pp. 03DF12-1-5. DOI: 10.7567/JJAP.55.03DF12
- ④ 細川千絵, 集光レーザーを用いた神経細胞ネットワークの局所光操作, Molecular Electronics and Bioelectronics, 査読有, Vol. 26, 2015, pp. 69-72.
- ⑤ Chie Hosokawa, Naoko Takeda, Suguru N. Kudoh, Takahisa Taguchi, Laser-induced perturbation into molecular dynamics localized in neuronal cell, Proceedings of SPIE, 査読有, Vol. 9305, 2015, pp. 93052N-1-5. DOI: 10.1117/12.2076348
- ⑥ 武田尚子, 工藤卓, 田口隆久, 細川千絵, 共鳴光ピンセットによる神経細胞接着分子の捕捉, 電気学会論文誌 C, 査読有, Vol. 134, 2014, pp. 1071-1077. DOI: 10.1541/ieejieiss.134.1071
- ⑦ Keiko Tawa, Chikara Yasui, Chie Hosokawa, Hiroyuki Aota, Junji Nishii, In situ sensitive fluorescence imaging of neurons cultured on a plasmonic dish using fluorescence microscopy, ACS Applied Materials & Interfaces, 査読有, Vol. 6, 2014, pp. 20010-20015. DOI: 10.1021/am505579u
- ⑧ 細川千絵, 集光レーザービームの光摂動による神経細胞内分子動態の集合操作, 生物物理, 査読有, Vol. 54, 2014, pp. 325-326. DOI: 10.2142/biophys.54.325
- ⑨ 細川千絵, 集光レーザー摂動による神経細胞ネットワークの局所操作, レーザー研究, 査読有, Vol. 44, 2016, pp. 244-249.
- ⑩ Keiko Tawa, Chisato Sasakawa, Tsuyoshi Fujita, Kazuyuki Kiyosue, Chie Hosokawa, Junji Nishii, Makoto Oike, and Norihiro Kakinuma, Fluorescence microscopy imaging of cells with a plasmonic dish integrally molded, Japanese Journal of Applied Physic, 査読有, Vol. 55, 2016, pp. 03DF12-1-5. DOI: 10.7567/JJAP.55.03DF12
- ⑪ 細川千絵, 集光レーザーを用いた神経細胞ネットワークの局所光操作, Molecular Electronics and Bioelectronics, 査読有, Vol. 26, 2015, pp. 69-72.
- ⑫ Chie Hosokawa, Naoko Takeda, Suguru N. Kudoh, Takahisa Taguchi, Laser-induced perturbation into molecular dynamics localized in neuronal cell, Proceedings of SPIE, 査読有, Vol. 9305, 2015, pp. 93052N-1-5. DOI: 10.1117/12.2076348
- ⑬ 武田尚子, 工藤卓, 田口隆久, 細川千絵, 共鳴光ピンセットによる神経細胞接着分子の捕捉, 電気学会論文誌 C, 査読有, Vol. 134, 2014, pp. 1071-1077. DOI: 10.1541/ieejieiss.134.1071
- ⑭ Keiko Tawa, Chikara Yasui, Chie Hosokawa, Hiroyuki Aota, Junji Nishii, In situ sensitive fluorescence imaging of neurons cultured on a plasmonic dish using fluorescence microscopy, ACS Applied Materials & Interfaces, 査読有, Vol. 6, 2014, pp. 20010-20015. DOI: 10.1021/am505579u
- ⑮ 細川千絵, 集光レーザービームの光摂動による神経細胞内分子動態の集合操作, 生物物理, 査読有, Vol. 54, 2014, pp. 325-326. DOI: 10.2142/biophys.54.325
- ⑯ (依頼講演)
- ⑰ S. Izumi, C. Hosokawa, M. Toma, K. Tawa, Characterization of the surface plasmon-enhanced fluorescence and single-nanoparticle fluorescence imaging on the Bull's eye-plasmonic chip, 9th Asian and Oceanian Photochemistry Conference 2016 (APC2016), 2016.12.04-12.08, Nanyang Technological University, Singapore.
- ⑱ 細川千絵, レーザー光ピンセットによる細胞操作, 第36回ポリマー光部品(POC)研究会, 2016.11.30, 産総研関西センター, 大阪府池田市. (招待講演)
- ⑲ 細川千絵, 集光レーザー摂動による神経細胞ネットワークの局所操作技術の開発, 第8回BioOpto Japanカンファレンス, 2016.09.15, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市. (招待講演)
- ⑳ C. Hosokawa, K. Miyauchi, S. N. Kudoh, T. Taguchi, K. Tawa, Optical trapping of quantum-dot conjugated cell surface molecules of neuronal cell cultured onto a plasmonic chip, The 3rd Optical Manipulation Conference (OMC'16), 2016.05.18-05.20, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
- ㉑ C. Hosokawa, N. Takeda, K. Miyauchi, K. Tawa, S. N. Kudoh, T. Taguchi, Enhanced optical trapping toward direct manipulation of cell surface molecules on neurons, The 9th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2015), 2015.12.11, Mie, Japan. (招待講演)
- ㉒ K. Miyauchi, K. Tawa, S. N. Kudoh, T. Taguchi, C. Hosokawa, Plasmon-enhanced optical trapping of nanoparticles on a plasmonic chip, The 28th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2015), 2015.11.12, Toyama, Japan.
- ㉓ 細川千絵, Direct manipulation of molecular dynamics in neuronal network with laser-induced perturbation, 第53回日本生物物理学会年会, 金沢大学, 2015.09.15, 石川県金沢市. (招待講演)
- ㉔ 宮内康平, 田和圭子, 工藤卓, 田口隆久, 細川千絵, プラズモニクチップを用いた単一ナノ粒子の光捕捉過程の蛍光解析, 2015年第76回応用物理学会秋季学術講演会, 2015.09.15, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市.
- ㉕ 宮内康平, 田和圭子, 工藤卓, 田口隆久, 細川千絵, Optical manipulation of cell surface molecules on neurons with surface plasmon resonance-based optical tweezers, ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2015 (LE2015),

[学会発表] (計 20件)

- ① 細川千絵, 集光レーザー摂動による神経回路網の局所操作, 日本分光学会関西支部平成28年度講演会, 2017.03.03, 産総研関西センター, 大阪府池田市.

- 2015.09.02, 九州工業大, 福岡県北九州市.
- ⑪ Y. Maezawa, C. Hosokawa, S. N. Kudoh, T. Taguchi, Optical trapping dynamics of neurotransmitter receptors on a neuronal cell, 8th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE8), 2015.06.23, Tokyo, Japan.
- ⑫ C. Hosokawa, Y. Maezawa, N. Takeda, S. N. Kudoh, T. Taguchi, Optical trapping and assembling of neurotransmitter receptor proteins localized on a neuronal cell, The 2nd Optical Manipulation Conference (OMC'15), 2015.04.22, Yokohama, Japan. (招待講演)
- ⑬ 細川千絵, 宮内康平, 工藤卓, 田口隆久, 田和圭子, プラズモニクチップ上で培養した神経細胞接着分子の光捕捉, 2015年第62回応用物理学会春季学術講演会, 2015.03.13, 東海大学, 神奈川県平塚市.
- ⑭ C. Hosokawa, N. Takeda, S. N. Kudoh, T. Taguchi, Laser-induced perturbation into molecular dynamics localized in neuronal cell, SPIE Photonics West 2015, 2015.02.07, San Francisco, USA.
- ⑮ C. Hosokawa, N. Takeda, Y. Nakagawa, S. N. Kudoh, T. Taguchi, Optical control of single cell in a neuronal network by a focused laser beam, The 8th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2014), 2014.12.06, Matsuyama, Japan. (招待講演)
- ⑯ K. Miyauchi, K. Tawa, S. N. Kudoh, T. Taguchi, C. Hosokawa, Surface plasmon-enhanced optical tweezers of cell surface molecules on neurons, The 27th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2014), Fukuoka, Japan.
- ⑰ C. Hosokawa, Laser-induced perturbation into living neuronal networks: Toward understanding neurodynamics, 第52回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 北海道札幌市. (招待講演)
- ⑱ 宮内康平, 田和圭子, 工藤卓, 田口隆久, 細川千絵, 神経細胞表面分子の局所操作に向けたプラズモン光ピンセット手法の開発, 平成26年電気学会電子・情報・システム部門大会, 2014.09.05, 島根大学, 島根県松江市.
- ⑲ 細川千絵, 光マニピュレーションの新しい生物科学応用, 日本化学会第94回春季年会, 2014.03.27, 名古屋大学, 愛知県名古屋市. (招待講演)
- ⑳ 細川千絵, 光集合制御による神経細胞

内分子動態の解明, 日本物理学会 2013年秋季大会, 2013.09.27, 徳島大学, 徳島県徳島市. (招待講演)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

<https://unit.aist.go.jp/bmd/gr/cms-4/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 千絵 (HOSOKAWA, Chie)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号: 60435766

(2) 連携研究者

田和 圭子 (TAWA, Keiko)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号: 80344109