

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26286028

研究課題名(和文) 蛍光ダイヤモンドナノ粒子を使った生体分子のダイナミクス解析

研究課題名(英文) Dynamics analysis of biomolecules using fluorescence diamond nanoparticles

研究代表者

原田 慶恵 (Harada, Yoshie)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：10202269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：倒立型蛍光顕微鏡をベースに、任意方向の外部磁場を印加してダイヤモンド内のNVセンターのODMRスペクトルを測定する装置を開発するとともに、ダイヤモンドナノ粒子の向きを正確に決定するための制御・解析プログラムを作成した。EGF受容体が多数存在するA431細胞を用い、抗EGF受容体抗体を介してEGF受容体にダイヤモンドナノ粒子を特異的に標識した。ODMRスペクトルを数分毎に測定し、ダイヤモンドナノ粒子の向きを逐次決定することで、EGF受容体の動きすなわち、細胞膜のゆらぎ運動を検出することができるようになった。今後は、この技術を様々な生体分子ダイナミクス計測に発展させていく。

研究成果の概要(英文)：We have developed a device and computer programs to measure and analyze ODMR spectra of NV centers in diamond based on an inverted fluorescence microscope, and succeeded in determining the precise orientation of each diamond nanoparticle by applying external magnetic fields sequentially in four inequivalent directions. Diamond nanoparticles were specifically labeled on the EGF receptor via anti-EGF receptor antibody in the cell membrane of A431 cells. By measuring the ODMR spectrum every few minutes and determining the orientation of the diamond nanoparticles, it has become possible to detect the movement of the EGF receptor, that is, the fluctuation motion of the cell membrane. From now on, we will develop this technology to measure various biomolecular dynamics.

研究分野：生物物理学

キーワード：ナノバイオ 生物物理学

1. 研究開始当初の背景

ダイヤモンドナノ粒子内に存在する窒素-空孔センター（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孔が隣接したときに生ずる格子欠陥の一種である。従来の蛍光色素に見られる退色やプリンキングと言った問題を払拭し、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明らかになっている (A. Gruber et al., SCIENCE 276, 2012-2014(1997))。また、NVC は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安定な電子系であり、単一 NVC に対しても室温で定量性を持つ光検出磁気共鳴計測が可能である (C.-C. Fu et al., PNAS 104, 727-732 (2007)、図 1)。最近では、ダイヤモンドナノ粒子と前記計測手法を組み合わせ、ナノ領域の磁場計測 (ナノテスラ感度) や温度計測 (ミリケルビン感度) を報告する結果が相次ぐ他、生体試料に無毒、表面化学修飾が可能であるなど、生物試料内部のナノ領域の物性を定量計測する複合的イメージングプローブとしても期待が高い。

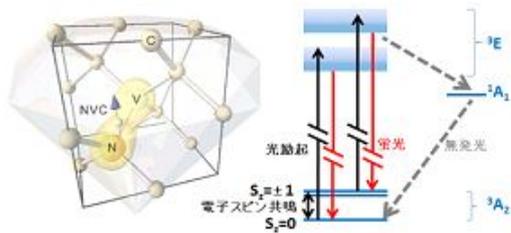


図 1. (左)ダイヤモンド結晶構造と NVC の模式図。(右)電子スピン共鳴と蛍光現象のエネルギー準位と遷移過程。

我々はこの類い稀な蛍光特性を持つダイヤモンドナノ粒子を使い、生きた生体試料内で起こる生命現象を視野計測する光検出磁気共鳴顕微鏡の開発と研究を進めてきた。不要な自家蛍光を完全に除去しながらリアルタイムで NVC の蛍光観察を実施できる手法 (特願 2010-021619, Nano Letters 12, 5726 (2012)、図 2) や、生きた線虫腸管に導入されたダイヤモンドナノ粒子が生命活動によって回転する様子を数度の角度精度で三次元画像化する手法、など世界初の実用性を暗示する成果を示してきた。こういった新規結果が生み出される背景には、通常の磁気共鳴計測に比べ5桁も高感度な光計測を利用する光検出磁気共鳴計測が室温で利用できることがあり、108 個もの電子スピンを必要とす

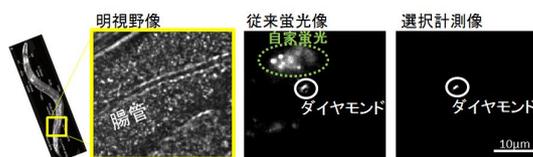


図 2. 線虫腸内ダイヤモンドナノ粒子の選択的計測

る従来の電子スピン共鳴法に対し、究極の磁気共鳴計測を提供する機会となっている。

2. 研究の目的

本研究では、我々が現在開発している、ダイヤモンドナノ粒子をプローブとし、高感度かつ高精度で角度変化の時系列を測定することができる光検出磁気共鳴顕微鏡法を用いて、生体分子の動きを観察し、その分子レベルのダイナミクスを解析する手法を確立することを目的とする。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いた (E. Toprak et al., PNAS 103, 6495-6499 (2006))。しかし、蛍光輝点のイメージは荒く、角度精度は 20 度程度と考えられている。本研究は、磁気共鳴技術を導入して初めて可能になる、異方的磁気物性と光の密接な相互作用を利用した新規の蛍光計測法を使って、生体分子の動きを単なる並進運動だけではなく、回転方向の動きを数度の精度で計測する国内外で初めての試みとなる。

3. 研究の方法

NVC は外部から静磁場を印加した状態では、N-V 結合方向と静磁場となす角度に依存して磁気共鳴が起こる高周波の周波数が変化する性質がある。すなわち、N-V 結合方向と外部静磁場のなす角度によって、照射する高周波の周波数による蛍光強度変化のパターン (ODMR スペクトルという) が変化する。4 つの異なる向きの外部磁場を印加し、得られた ODMR スペクトルを解析することで、ダイヤモンドナノ粒子の角度を決定する。本研究では、そのための装置及びプログラムを開発する。開発したシステムを使ってダイヤモンドナノ粒子を結合させた生体分子の動きの解析を行う。

4. 研究成果

任意方向の外部磁場を印加してダイヤモンド内の NV センターの ODMR スペクトルを測定できる装置 (図 3) を開発するとともに、ダイヤモンドナノ粒子の向きを正確に決定するための制御・解析プログラムを作成した。

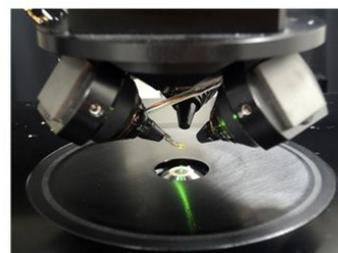


図 3. 三軸電磁石システム

クラミドモナス鞭毛軸系の微小振動を測定するために、ビオチン化修飾したダイヤモ

ンドナノ粒子表面に、ストレプトアビジンを介してビオチン化修飾した鞭毛軸系を結合させた。ダイヤモンドの ODMR スペクトル変化から微小振動の様子を明確に示すデータは得られなかったが、これは軸系の振動によるダイヤモンド粒子の運動が主に並進方向に起こり回転角はごく小さかった可能性が考えられる。

そこで、大きな角度変化が期待される、細胞膜を形成する膜タンパク質に着目した。膜タンパク質である EGF 受容体の数が多く存在するヒト上皮様細胞癌由来の A431 細胞を使い、EGF 受容体に、抗 EGF 受容体抗体を介してダイヤモンドナノ粒子を特異的に標識し、ダイヤモンドナノ粒子内の NVC の ODMR スペクトルを数分ごとに記録し、そのパターンから、角度を決定した(図 4)。

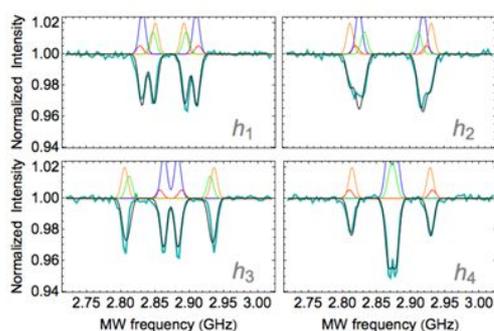


図 4. 4 つの異なる向きの外部磁場を印加し得られた ODMR スペクトルの例

その結果、EGF 受容体の動きを観察することができた。この EGF 受容体タンパク質の動きは、受容体の膜内の拡散運動というよりも、細胞膜の動きを反映しているものと思われる。そこで、細胞膜の動きを変化させるであろう、細胞膜骨格を、破壊する試薬や逆に細胞膜骨格をより強固にする試薬を作用させ、EGF 受容体の動きを計測してみる実験を行う。EGF を作用させ、細胞骨格をより強固にした A431 細胞の EGF 受容体に結合させたダイヤモンドナノ粒子の動きと、細胞膜骨格の主要成分であるアクチンフィラメントを脱重合させるラトランキュリン A を作用させた A431 細胞の EGF 受容体に結合させたダイヤモンドナノ粒子の動きを、すでに計測した、何もしていない A431 細胞の EGF 受容体に結合させたダイヤモンドナノ粒子の動きを比較した。その結果、EGF を添加すると、EGF 受容体の動きが抑制された。反対にラトランキュリン A 処理し、アクチンフィラメントを脱重合させると、EGF 受容体すなわち細胞膜の動きが激しくなった(図 5)。

以上のように、本研究で我々が開発した手法を用いることで、細胞膜のゆらぎ運動を検出することができるようになった。今後は、様々な生体分子ダイナミクス計測に発展させていこうと考えている。

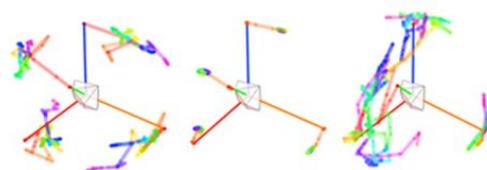


図 5. 細胞膜のゆらぎ(左)未処理(中央)EGF 処理(右)LatA 処理

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 6 件)

Shingo Sotoma, Yosuke Yoshinari, Ryuji Igarashi, Akiyoshi Yamazaki, Shige H. Yoshimura, Hidesato Tochio, Masahiro Shirakawa and Yoshie Harada “Effective Production of Fluorescent Nanodiamond Containing Negatively-Charged Nitrogen-Vacancy Center by Ion Irradiation” *Diamond and Related Materials* 49 (2014) 33-38
DOI:10.1016/j.diamond.2014.07.011

Yosuke Yoshinari, Shigeyuki Mori, Ryuji Igarashi, Takuma Sugi, Hiroaki Yokota, Kazuhiro Ikeda, Hitoshi Sumiya, Ikue Mori, Hidehito Tochio, Yoshie Harada and Masahiro Shirakawa, “Optically Detected Magnetic Resonance of Nanodiamonds in Vivo; Implementation of Selective Imaging and Fast Sampling.”

Journal of Nanoscience and Nanotechnology 15 (2015)1014-1021
DOI:10.1166/jnn.2015.9739

Shingo Sotoma, Ken-ichi Akagi, Saburo Hosokawa, Ryuji Igarashi, Hideto Tochio, Yoshie Harada and Masahiro Shirakawa “Comprehensive and quantitative analysis for controlling the physical/chemical states and particle properties of nanodiamonds for biological applications.”

RSC Advances 5(2015) 13818-13827
DOI:10.1039/C4RA16482B

Shingo Sotoma, Ryuji Igarashi†, Jun Iimura, Yuta Kumiya, Hidehito Tochio, Yoshie Harada & Masahiro Shirakawa

“Suppression of Nonspecific Protein–Nanodiamond Adsorption Enabling Specific Targeting of Nanodiamonds to Biomolecules of Interest” *Chemistry Letters* 44(2015) 354-356
DOI.org/10.1246/cl.141036

Takuma Iwasa, Yong-Woon Han, Ryo Hiramatsu, Hiroaki Yokota, Kimiko Nakao, Ryuji Yokokawa, Teruo Ono and Yoshie Harada “Synergistic effect of ATP for RuvA–RuvB–Holliday junction DNA complex formation” *Scientific Reports* 5 (2015) Article number: 18177

DOI:10.1038/srep18177

Yong-Woon Han†, Hiroshi Sugiyama & Yoshie Harada “The application of Fluorescence-Conjugated”

Pyrrole/Imidazole Polyamides in the Characterization of Protein-DNA Complex Formation Biomaterials Science 4 (2016) 391-399

DOI: 10.1039/C5BM00214A

〔学会発表〕(計 24 件)

Yoshie Harada “Studies on biomolecules using single-molecule imaging techniques” Crossdisciplinary research meeting 2014, Optics and Biology 2014.5.6 (invited) National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan

Yoshie Harada “Studies on biomolecules using single-molecule imaging techniques” TU Chemistry Department Seminar 2014.5.7 (invited) National Taiwan University, Taipei, Taiwan

Yoshie Harada “Studies on biomolecules using single-molecule imaging techniques” The 19th Annual Conference of the Biophysical Society of ROC 2014.5.8 (Plenary Lecture) National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan

原田慶恵 “蛍光ダイヤモンドナノ粒子を使った生体分子イメージング法の開発” ナノ学会第 12 回大会 2014.5.23 (招待講演) 京都大学宇治キャンパス 京都

原田慶恵 “生体内におけるダイヤモンドナノ粒子の光検出磁気共鳴計測” 第 16 回生命科学研究所シンポジウム 2014.7.2 京都大学 芝蘭会館 京都 (2014.7.1~7.2) 口頭発表

Yoshie Harada “Development of a new fluorescence imaging technique using diamond nanoparticles” The 37th Naito Conference on Bioimaging—a paradigm shift for the life sciences 2014.7.16 Hilton Niseko Village, Hokkaido, Japan (2014.7.15~18) 口頭発表 selected

Yoshie Harada “Development of a new fluorescence imaging technique using diamond nanoparticles” 2014.9.1 TWU-KU joint symposium (invited)

原田慶恵 “ナノダイヤモンドで細胞機能を視る・操作する” バイオイメージング学会 第 23 回学術集会公開講座プログラム 2014.9.6 銀杏会館 大阪大学 (2014 9.4~6) 招待講演

原田慶恵 “蛍光ダイヤモンド粒子を用いた生体イメージング技術の開発” ISSP ワークショップ 機能性融合科学研究会シリーズ (1)「光機能」2014 年 12 月 4 日 東京大学物性研究所 招待講演

原田慶恵 “1 分子イメージング技術を使った生体分子機能解析” 大阪大学蛋白質研究所

未来コロキウム 2014 年 12 月 8 日 大阪大学蛋白質研究所 招待講演

Yoshie Harada “Measurement of cellular dynamics using diamond nanoparticles”

The 18th iCeMS International Symposium & The 15th International Membrane Research Forum March 2, 2015 Kyoto University (invited)

Yoshie Harada “Application of fluorescent diamond nanoparticles to bio-imaging” Diamond Quantum Sensing Workshop 2015 Kagawa International Conference Hall 2015.8.7 Takamatsu, Japan (August 5-7, 2015) (invited)講演 8/7

Ryuji Igarashi, Shingo Sotoma, Masahiro Shirakawa and Yoshie Harada “Application of fluorescent diamond nanoparticles to bio-imaging” JSAP-OSA Joint Symposia 2015 Bio-and Medical Photonics 応用物理学会

September 16, 2015, Nagoya, Japan 名古屋国際会議場 招待講演

外間進悟、五十嵐龍治、朽尾豪人、原田慶恵、白川昌宏 蛍光性ナノダイヤモンドによる超解像イメージング及び角度計測に関する研究 第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会 BMB2015 2015 年 12 月 3 日 神戸ポートアイランド (ポスター発表)

外間進悟、五十嵐龍治、朽尾豪人、原田慶恵、白川昌宏 蛍光性ナノダイヤモンドによる超解像イメージング及び角度計測に関する研究 第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会 BMB2015 2015 年 12 月 4 日 神戸ポートアイランド (口頭発表)

Yoshie Harada “Development of a new fluorescence imaging technique using diamond nanoparticles” International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 Pacifichem 2015 December 16 2015 the Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA (Invited)

Yoshie Harada “Digital counting of DNA-protein interaction” Asian Chemical Biology Initiative 2016 Jakarta Meeting, (oral) January 31st, 2016

Yoshie Harada The new bioimaging method using fluorescent diamond nanoparticles March 11, 2016, MANA International Symposium 2016, Tsukuba International Congress Center EPOCHAL TSUKUBA (Invited)

Yoshie Harada “Development of a new fluorescence imaging technique using nanodiamonds” E-MRS (European Materials Research Society) 2016 Spring Meeting May 3, 2016 Lille Grand Palais, France (invited) May 2-6

Yoshie Harada “Application of

Fluorescent Nanodiamonds to Bio-imaging” BISC 16:Biomedical Imaging and Sensing Conference 2016 May 20, 2016 Pacifico Yokohama (invited) May 17-20,

① Yoshie Harada Functional Analysis of Biomolecules using Single-molecule Imaging Technique 第 77 回応用物理学会秋季学術講演会 2016 年 9 月 13 日 朱鷺メッセ 新潟市 (招待講演) 2016 年 9 月 13 日 ~ 16 日

② 原田慶恵 1 分子イメージング技術による生体分子の機能解析蛋白質研究所リトリート Functional Analysis of Biomolecules using Single-molecule Imaging Technique 15th IPR Retreat 2016 年 11 月 22 日 口頭発表

③ Yuji Hatano , Kosuke Tahara , Takayuki Iwasaki , Susumu Yasuda , Yoshie Harada , Mutsuko Hatano “Prototype Magnetometer with diamond NV centers for scalable applications” MRS Fall Meetings November 27—December 2, 2016 Boston, Massachusetts (oral)

④ Yoshie Harada “Studies on Biomolecules Using Single-Molecule Imaging Technique” RIKEN Joint Retreat 2017 February 2, 2017, Hamanako Royal Hotel (招待講演)

〔図書〕(計 2 件)

原田慶恵 蛍光ダイヤモンド粒子を用いた生体イメージング技術の開発 応用物理 vol. 84 No.1 56-60 (2015)

原田慶恵 7.1.5 ダイヤモンドナノ粒子 558-561

発光の事典 基礎からイメージングまで 木下修一、太田信廣、永井健治、南不二雄編 朝倉書店 2015 年 9 月 20 日

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.ccc.osaka-u.ac.jp/protein/nano-biology/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

原田慶恵 (HARADA, Yoshie)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号 : 10202269