

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04365

研究課題名(和文) 高分解能変動電位透過観察技術の開発と液中生物試料の解析

研究課題名(英文) Development of a scanning-electron assisted dielectric-impedance microscopy and observation of biological specimens in water

研究代表者

小椋 俊彦 (Ogura, Toshihiko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：70371028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,700,000円

研究成果の概要(和文)：溶液中の生物試料や有機材料をそのままナノレベルで観察することは、生命現象の解明や材料の構造分析にとって必須である。本提案では、水液中の生きた細胞や蛋白質等をナノレベルの高分解能で観察する新たな観察技術(走査電子誘電率顕微鏡)を開発し、これを用いた様々な生物試料の観察を行った。その結果、水溶液中の生きたマウス乳癌細胞を誘電率顕微鏡により観察し、細胞内部の小胞や顆粒、フィラメント構造等を極めてクリアに撮像することが出来た。さらに、膜蛋白質にナノビーズを付着させて、細胞内部の構造とナノビーズとの同時観察を可能とした。本装置は、生物試料だけでなく有機材料、ナノ粒子等の液中観察に広く活用が可能である。

研究成果の概要(英文)：To better understand various biological functions, observation of the nanometer structures of cells in water is essential. Here, we developed a new imaging technology called a scanning-electron assisted dielectric-impedance microscopy system based on SEM. Our system provides high-contrast imaging of the intact biological specimens in water. We demonstrate the nanoscale observation of living cultured mammalian cells using SE-ADM system with a newly developed culture dish holder. As a result, intact cells and organelles are clearly visible in high-contrast and high-resolution images in medium. Moreover, we successfully observe nanobeads directly binding to living cancer cells via anti-CD44 antibody in a medium and their intracellular structure at the same time. Furthermore, our system can be applied to diverse liquid samples across broad range of scientific fields, for example, nanoparticle, nanotube and organic materials.

研究分野：ナノバイオテクノロジー

キーワード：誘電率 液中観察 培養細胞 ナノ粒子 走査電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

水溶液中の細胞や細菌・ウイルス等の生物サンプルをナノレベルの高解像度で観察することは、生物機能の解明において極めて重要な役割を果たす。特に生きた状態でその動的ダイナミクスの観察が出来れば、細胞内のタンパク質複合体の働きやシナプス伸長等の動的メカニズムの解明が飛躍的に進展する。これまでの生物サンプルの観察方法としては、光学顕微鏡に代表される細胞レベルでの観測法と電子顕微鏡によるタンパク質レベルでの観察方法が主に用いられている。光学顕微鏡による観察では、生物サンプルを水溶液中で生きたまま観測することが可能であるが、非染色かつ非ラベルの生物試料の分解能は、光の波長による制約を受けるため約 $0.2\mu\text{m}$ である。そのため、タンパク質やその複合体あるいはウイルスの構造を直接観察することは困難である。一方、電子顕微鏡による観察では、生物サンプルは電子顕微鏡内部の高真空下に設置されるため、真空による変性を受け、水分がほぼ失われる。さらに電子線損傷が大きいため、生きた状態での観察は非常に困難である。

2. 研究の目的

本提案では、水液中の生きている細胞や細菌をナノレベルの高分解能で観察する新たな観察技術である高分解能変動電位透過観察法(誘電率顕微鏡)を開発し、これを用いた様々な細胞の動的メカニズムの解明を目標とする。本装置では、従来の走査電子顕微鏡(SEM)では観察が困難であった、水溶液中の非染色・非固定の生物サンプルをナノスケールの分解能で電子線のダメージが無く、高コントラストでの撮像を可能とする。さらに、生物試料の組成情報を同時に検出することで、細胞内の構造をより詳細に解析する。本提案システムを用いて、生きた細胞内のタンパク質やその複合体の構造的な挙動の解明に繋げたい。こうした技術は、生体内の生理機能や増殖過程、薬理特性の解析等の生物学全般にわたる研究を飛躍的に進展させるものと期待される。

3. 研究の方法

本研究提案では、生きた状態の細胞やバクテリアをナノレベルの高分解能で観察する新たな観察技術を開発し、これを用いて様々な生物試料の動的メカニズムの解明を目標とする。具体的には、走査電子顕微鏡 (SEM)

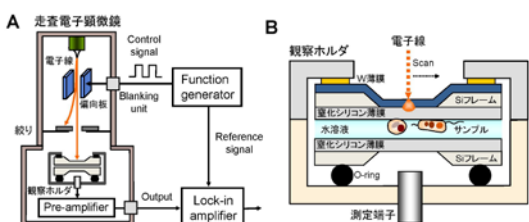


図1 変動電位透過観察法の概要
(A) 走査電子顕微鏡内に導入した変動電位観察システムの概要
(B) 水溶液観察ホルダの概要

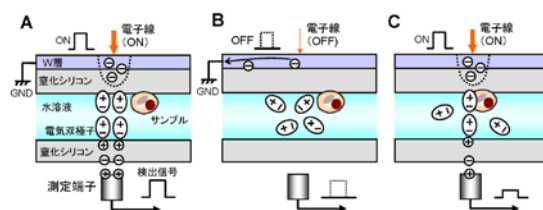


図2 変動電位透過観察法の観察機構の概要
(A) 電子線照射によりタングステン層にマイナス電位が発生し測定端子で信号検出 (B) 電子線がOFFとなりマイナス電位が消失し信号が0となる (C) サンプルにより透過電位が減少し出力が減少

をベースとする間接的な電子線照射による観察技術(走査電子誘電率顕微鏡)と高解像能水溶液観察ホルダの開発である。水溶液中の生物サンプルは、耐圧性が高く極めて薄い2枚の窒化シリコン薄膜で挟み込み封入する(図1)。これにより、SEM内の高真空でも水溶液の状態を保持できる。上部の窒化シリコン薄膜には、重金属であるタングステンの薄膜層を形成し、この層に低加速度の電子線を照射する。入射された電子の多くは、タングステン層で散乱・吸収され、入射部分に負の電位を生じる。この電子線は、偏向板により30kHz以上の周波数でオン・オフを繰り返しており(図1)、電子線が入射された際には負の電位が形成され、電子線がオフの場合には0V電位となる。こうした電位変化は、水溶液サンプルを透過し、下部の検出端子により検出される。水は比誘電率が80と高いため電位変化を良く透過し、生物試料を構成するタンパク質は2~3程度と低いため透過が阻害される。こうした比誘電率の差により、染色処理を施すことなく極めて高いコントラストで水溶液中の生物試料を観察することが可能となる(図2)。さらに、入射電子は、ほぼ全てタングステン層で散乱・吸収されるため、生物試料には照射されず、電子線ダメージを完全に防ぐことができる。さらに、その分解能も電子線の直径は数nm以下に絞ることが可能なため、原理的には10nm以下にまで向上させることが可能となる。

本研究提案では、走査電子誘電率顕微鏡システムの高分解能化・高速化を行い、その分解能を10nm以下にまで向上させる。これを達成するために、高増幅度で高速な初段アンプを開発し、高分解能の電界放射型走査電顕内に設置する。これにより、細胞内部の顆粒やタンパク質複合体、さらには膜タンパク質の組成を解析し、その動的メカニズムの解明に繋げる予定である。これに加えて、生きた生物サンプルを封入する試料ホルダを開発することで、生きた状態の培養細胞の高分解能観察とその動的観察を行うシステムを開発する。

4. 研究成果

(1) 誘電率顕微鏡による培養細胞の観察

生きた培養細胞を観察するため、市販の培養ディッシュに誘電率観察用のホルダを結合させ、直接薄膜表面に細胞を培養する方法を確立した(図3)。さらに、生きた培養細胞をそのまま大気圧ホルダ内へと導入し、誘

電率観察を行うシステムを開発した (図3)。これにより、培養液中の生きた生物試料をそのまま観察することが可能となった。我々は、マウス乳癌細胞をこの特性ディッシュ上で培養し、非染色・非固定の生きた状態で観察を行った (図4)。走査電子誘電率顕微鏡による観察では、細胞内の小胞や顆粒、フィラメント構造等を高分解能かつ高コントラストで観察することが可能であった (図4)。小胞状の構造の多くはフィラメントに結合されており、誘電率の差に起因するコントラストにより、これがクリアに観察可能であることが確認された。さらに、本方法では撮像によるダメージが少ないため、細胞の同じ観察箇所を4回撮像し、その変化を観察することにも成功した。

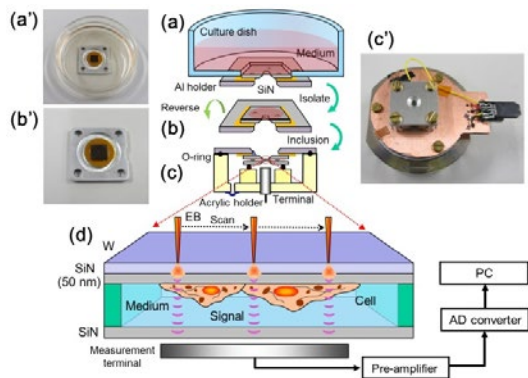


図3 高分解能誘電率顕微鏡による培養細胞観察システムの概要
(T. Okada & T. Ogura, Sci. Rep., 2016)

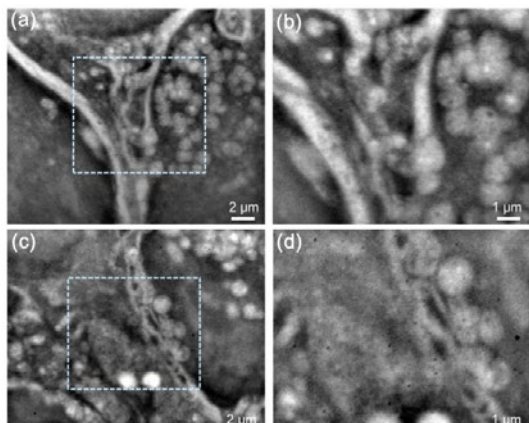


図4 高分解能誘電率顕微鏡によるマウス乳癌細胞の観察結果
(T. Okada & T. Ogura, Sci. Rep., 2016)

(2) ナノビーズ直接観察と細胞へのラベリ化

次に我々は、ナノビーズを細胞膜の所定の蛋白質にラベリし、細胞内部の構造とラベリとを同時に観察する実験を行った。使用したナノビーズは直径100nmのポリスチレンビーズであり、これを膜蛋白質のCD44に抗体を用いて結合させ観察を行った。まず、水溶液

中のポリスチレンビーズを誘電率顕微鏡で直接観察が可能かを確認した (図5)。その結果、水溶液中のビーズを極めてコントラストが高くクリアに観察することに成功した。ポリスチレンビーズの比重は、水とほぼ同じ1.0のため、通常の電子顕微鏡では周辺部の水と電子線散乱の差が出ずコントラストが極めて低くなるが、誘電率観察では、比誘電率の差を検出するため、容易に観察が可能であることを確認した。さらに、ビーズにIgG抗体を付着させると、ビーズ周辺にとげ状の構造が多数観察され、その直径も若干広がった。これは、ビーズ表面の抗体による影響と考えられる。

このビーズを抗CD44抗体によりマウス乳癌細胞へと結合させ、誘電率顕微鏡による観察を行った (図6)。その結果、細胞内の構造観察と同時にCD44に付着したビーズを直接観察することが可能であった。これにより、走査電子誘電率顕微鏡を用いることで、細胞内の構造とラベリによる蛋白質の同定が可能であることが確認された。

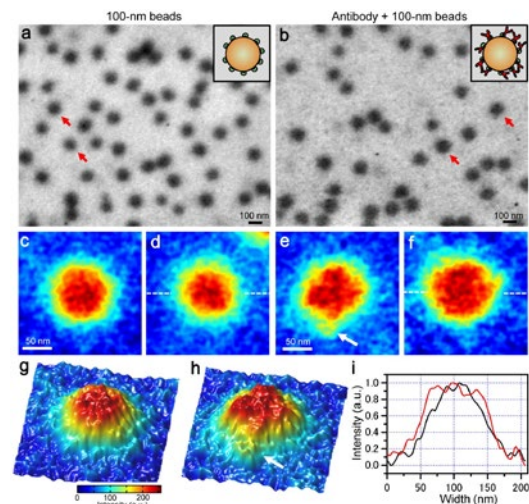


図5 誘電率顕微鏡によるナノビーズの観察
(T. Okada & T. Ogura, Sci. Rep., 2017)

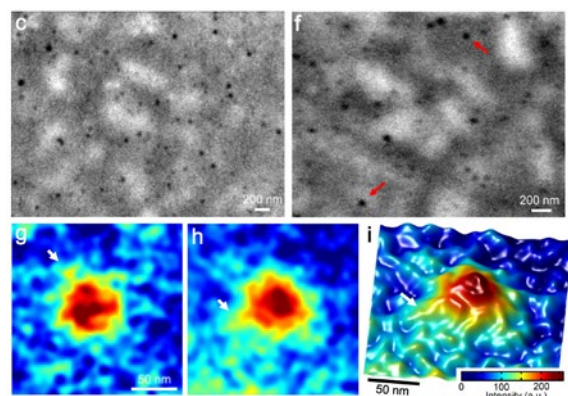


図6 誘電率顕微鏡による細胞膜状のナノビーズの観察
(T. Okada & T. Ogura, Sci. Rep., 2017)

(3) 誘電率顕微鏡による

さらに我々は、牛乳をそのままの状態です誘電率顕微鏡による観察を行った。牛乳は、主に牛乳脂肪とタンパク質のカゼインミセルから構成されており、入手も容易なため生物試料の標準サンプルとして使用することが可能である。溶液中の牛乳を非染色・非固定のまま大気圧ホルダへと封入し、観察した結果が図7である。白い数 μm の顆粒は、牛乳脂肪であり、黒い小さな粒子がカゼインミセルとなる。白い牛乳脂肪の周辺には黒いカゼインミセルが多数結合していることが確認された。さらに、液中電顕や光学顕微鏡の比較を行い、我々が開発した誘電率顕微鏡による観察が、最もコントラストや分解能に優れていることが確認された。

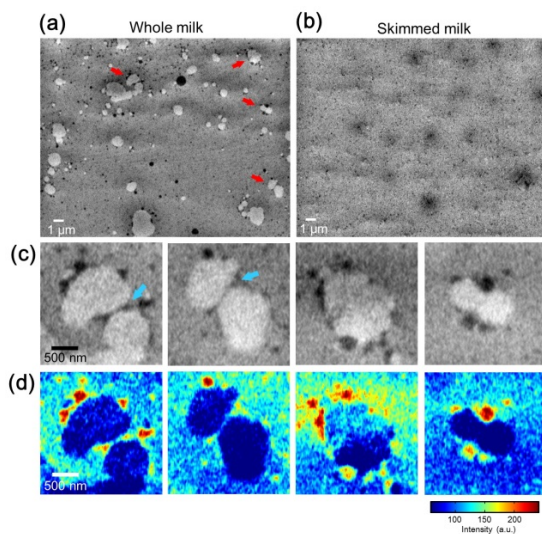


図7 誘電率顕微鏡による牛乳の観察
(T. Ogura & T. Okada, BBRC, 2017)

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)

- ① Hiroki Iwase, Toshihiko Ogura, Hiroshi Sakuma, Kenji Tamura, Yoshiaki Fukushima, “Structural investigation of hectorite aqueous suspensions by dielectric microscopy and small-angle neutron scattering coupling with rheological measurement”, *Applied Clay Sci.*, Vol. 157, pp. 24-30 (2018) (査読有り) DOI: 10.1016/j.clay.2018.02.016
- ② 小椋俊彦、岡田知子、“新規誘電率顕微鏡による水溶液中の生物試料のナノスケール観察”、*顕微鏡*, Vol. 53, No. 1, pp. 42-46 (2018) (査読有り), [ent/uploads/publication/kenbikyoto/53_1/53_1j10to.html](http://microscopy.or.jp/jsm/wp-cont</div><div data-bbox=)

- ③ Tomoko Okada, Toshihiko Ogura, “High-resolution imaging of living mammalian cells bound by nanobeads-connected antibodies in a medium using scanning electron assisted dielectric microscopy”, *Sci. Rep.*, Vol. 7, 43025 (2017) (査読有り) DOI: 10.1038/srep43025
 - ④ Toshihiko Ogura, Tomoko Okada, “Nanoscale observation of the natural structure of milk-fat globules and casein micelles in the liquid condition using a scanning electron assisted dielectric microscopy”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 491, pp. 1021-1025 (2017) (査読有り) DOI: /10.1016/j.bbrc.2017.08.00
 - ⑤ Tomoko Okada, Toshihiko Ogura, “Nanoscale imaging of untreated mammalian cells in a medium with low radiation damage using scanning electron-assisted dielectric microscopy”, *Sci. Rep.*, Vol. 6, 29169 (2016) (査読有り) DOI: 10.1038/srep29169
 - ⑥ Taisuke Furuta, Shigeru Miyaki, Hiroyuki Ishitobi, Toshihiko Ogura, Yoshio Kato, Naosuke Kamei, Kenji Miyado, Yukihito Higashi, Mitsuo Ochi, “Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Fracture Healing in a Mouse Model”, *Stem. Cells Trans. Med.*, pp. 1620-1630 (2016) (査読有り) DOI: 10.5966/sctm.2015-0285
- [学会発表] (計9件)
- ① 小椋俊彦、岡田知子「走査電子誘電率顕微鏡による生体試料の液中観測」高分子学会・超分子研究会・生体超分子システムのバイオイメージング、2018年6月1日、中央大学 後楽園キャンパス、東京
 - ② 小椋俊彦、岡田知子「走査電子誘電率顕微鏡の開発と液中試料観察のシンギュラリティ」日本顕微鏡学会 第74回学術講演会、2018年5月29日、久留米市 福岡
 - ③ 小椋俊彦、岡田知子「新規誘電率顕微鏡による溶液中の生物試料やミルク内粒子の直接観察」2017 材料技術研究

協会討論会、2017年12月2日、東京理
科大学・野田キャンパス

- ④ Toshihiko Ogura, Tomoko Okada,
Nanoscale imaging of unstained
biological specimens in aqueous
condition using scanning electron
assisted dielectric microscopy, The
Asian Conference on Oleo Science 2017,
2017年9月13日, Tokyo
- ⑤ Toshihiko Ogura, Tomoko Okada,
Nanoscale imaging of living cells
bound by nanobeads-connected
anti-CD44 antibody in medium using
newly developed dielectric microscopy,
第55回生物物理学会年会, 2017年9月
19日, 熊本大学 熊本
- ⑥ Toshihiko Ogura, Tomoko Okada,
Nanoscale observation of intact
biological specimens in water with
high-contrast imaging by scanning
electron assisted
dielectric-impedance microscopy,
Microscopy & Microanalysis 2017, 2017
年8月10日, St. Louis, USA
- ⑦ 小椋 俊彦 「新規誘電率顕微鏡の開発
と液中生物試料のその場観察」2017 材
料技術研究協会討論会」第41回日本顕
微鏡学会関東支部大会, 2017年2月25
日, 東京お台場
- ⑧ Toshihiko Ogura, Tomoko Okada,
Nanoscale observation of intact
living cells in a medium with low
radiation damage using scanning
electron-assisted dielectric
microscopy, 第54回生物物理学会年会,
2016年11月27日, つくば国際会議場
- ⑨ 小椋 俊彦 「溶液中試料の高分解能・
高コントラスト観察を可能とする新規
誘電率顕微鏡の開発」日本油化学会東支
部, 2016年5月20日, 東京理科大学森
戸記念館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小椋 俊彦 (Ogura Toshihiko)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・
生命工学領域・上級主任研究員
研究者番号：70371028

(2) 研究分担者

岡田 知子 (Okada Tomoko)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・
生命工学領域・総括研究主幹
研究者番号：30344146