

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01838

研究課題名(和文) 蛍光ダイヤモンドを用いた1生体分子NMR観察法の確立

研究課題名(英文) Establishment of single biomolecule NMR observation method using fluorescent diamond

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光性ダイヤモンド内部に存在する窒素空孔中心(NVC)の電子スピンは $m_s = 0$ と縮退した $m_s = \pm 1$ の2つ量子状態を有しており、この量子状態間の磁気共鳴周波数(D)は温度によって変化する。そこで我々は蛍光性ナノダイヤモンド(FND)を使って、我々が開発した光検出磁気共鳴顕微鏡でDの値を計測することによって、FND周辺の温度を知ることができる。本研究では、FNDの温度計測能が周囲の環境に影響を受けない性質を利用して、細胞内の絶対温度を計測する方法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温度は、生体機能の維持や細胞内反応を包括的に制御している最も基本的な物理量である。細胞の機能を深く理解するためには、細胞内の生体分子の振る舞いやそれを支配する温度の解明が不可欠である。これまでに、温度感受性のポリマーや蛍光タンパク質、蛍光色素を用いて、細胞内の温度を計測する研究が行われてきた。しかし、いずれの方法も、温度の時間変化や墓所による温度の違いなどの検出には有効であるが、絶対温度を計測することは非常に困難であった。今回FNDが周囲の環境にロバストである性質を利用して絶対温度を計測できるようになったことで、細胞機能への温度の影響を明らかにする研究の進展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The electron spin of the nitrogen vacancy center (NVC) existing inside the fluorescent nanodiamond (FND) has two quantum states of $m_s = 0$ and degenerate $m_s = \pm 1$, and the magnetic resonance between these quantum states. The frequency (D) changes with temperature. That is, the temperature around the FND can be known by measuring the value of D with the optical-detected magnetic resonance microscope we have developed. In this study, we developed a method to measure the absolute temperature inside cells by utilizing the property that the temperature measurement ability of FND is not affected by the surrounding environment.

研究分野：生物物理学

キーワード：ダイヤモンド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

蛍光性ナノダイヤモンド(FND: Fluorescent nanodiamond)は直径が 5-100 nm 程度の蛍光性ナノ粒子である。蛍光は内部に存在する不純物に由来しており、一口に FND と言っても内在する不純物によって発せられる蛍光は異なり、現在までに様々な発光を発する FND やその作製方法が報告されている^{1,2)}。そのなかでも、窒素空孔中心(NVC: nitrogen-vacancy center)を有する FND はその稀有な蛍光特性から、バイオイメージング、バイオセンシングプローブとして高い注目を集めている¹⁾。

ダイヤモンド結晶中の NVC が稀有な電子特性を示すことは 1997 年に Wrachtrup らのグループによって Science 誌報告されている³⁾。彼らは室温で NVC の電子スピンを操作できることを報告しており、この性質は様々なパラメータ(温度、磁場、電場など)を定量的に検出する可能性を秘めている。2005 年に台湾の Chang らのグループによって NVC をナノサイズのダイヤモンドに閉じ込めたいわゆる FND を生体計測に応用する研究が報告された⁴⁾。FND は一般的に用いられる蛍光プローブ(低分子蛍光プローブや蛍光タンパク質など)で問題となる光褪色が一切起こらず生体毒性も低いことから生体イメージング用プローブとして非常に優れている。2008 年には同グループによって FND の大量合成方法が報告されている⁵⁾。以降、NVC をバイオイメージングやバイオセンシングに応用する研究は目覚ましい発展を遂げている。

NVC は 550 nm 程度の光で励起されると 600-800 nm の近赤外領域の蛍光を発する。量子収率は 0.7 以上と高く、吸収断面積は $3 \times 10^{-17} \text{ cm}^2$ 程度と報告されている⁶⁾。FND から発せられる蛍光の強度は NVC の数に依存するため大きな粒子ほど大きな蛍光を発する。一般にバイオイメージングに用いられる FND の粒子系は 100 nm 程度であり、その中には 1000 個程度の NVC が含まれている。FND から発せられる蛍光は非常に安定で光褪色や明滅性を示さないことから長時間のイメージングが可能であり、また、FND は物理化学的に非常に安定で細胞毒性を示さないことから、生体イメージングに好適である。

2. 研究の目的

特筆すべき NVC の性質に、内部の電子スピンその光検出磁気共鳴である。NVC には 2 つの荷電状態が存在する。1 つは NV⁰、もう 1 つは NV⁻である。NV 周りに電子が 1 つ多いものである。これは、近傍に存在する窒素原子より電子を 1 つ得ることによるものである。NVC 内部に存在する電子はスピン三重項状態であり、基底状態は $m_s = 0$ と縮退した $m_s = \pm 1$ にエネルギー分裂している。このエネルギー分裂はゼロ磁場分裂(D)と呼ばれ、外部磁場のない状態では 2870 MHz 程度になる。興味深いことに、 $m_s = \pm 1$ から励起された電子は、その一部が項間交差を経て蛍光を発することなく、 $m_s = 0$ へと緩和する。一方、 $m_s = 0$ から励起された電子は蛍光を発して元の $m_s = 0$ へと緩和する。よって、一定時間 NVC を光励起し続けると、電子を $m_s = 0$ へと高偏極させることができる。このように $m_s = 0$ へと高偏極した電子に、2870 MHz に相当するマイクロ波を照射すると $m_s = 0$ から $m_s = \pm 1$ へと電子スピン共鳴に基づく遷移が起こる。そうして $m_s = \pm 1$ へと遷移した電子の一部は、蛍光を発することなく $m_s = 0$ へと緩和することから、 $m_s = 0$ と $m_s = \pm 1$ の間で生じる磁気共鳴現象を蛍光強度の変化として計測することができ、このような現象は光検出磁気共鳴(ODMR: optically detected magnetic resonance)と呼ばれる。図 1a は高周波周波数依存性な蛍光強度の変化をプロットしたものである(ODMR スペクトル)。例えば、温度に対する中心周波数 D の変化(図 1b)、磁場に対するスペクトルの分裂幅(図 1c)を計測することによって、これらを定量的に知ることができる。

またスピンの緩和時間を計測することによって、周囲の磁気ノイズを計測することも可能である。この NVC がナノ領域に閉じ込められている FND を用いることによって細胞内の物理パラメータを定量的に計測することが期待されている。本研究では、FND を用いた細胞内温度センシング法を確立することを目的とした。

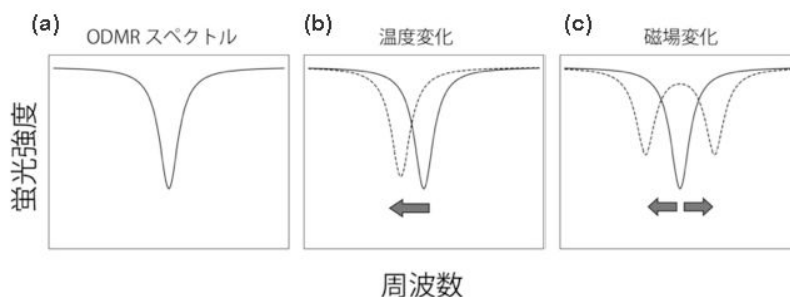


図 1. ODMR スペクトルの変化

(a) ODMR スペクトル (b) 温度上昇時の変化 (c) 磁場強度による変化

3. 研究の方法

細胞内温度計測を達成するために我々が開発した ODMR 顕微鏡の概略図を図 2 に示す。一般的な倒立蛍光顕微鏡に、サンプルステージ上の温度をコントロールするための温調ステージ、温度をモニタリングするための熱電対、高周波磁場を印加するための高周波コイルを設置している。532nm のレーザーで励起された FND の蛍光はロングパスフィルター（590nm）を通して励起光を除いた後、EMCCD カメラで検出している。FND サンプルに対して ODMR スペクトルを取得、ローレンツ関数にフィッティングし中心周波数 D を算出することによって温度を計測することができる。

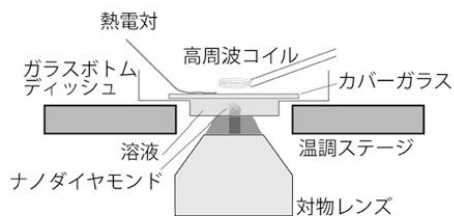


図 2. ODMR 顕微鏡の模式図

4. 研究成果

我々はまず、FND の温度計測能の環境依存性について調べた。1 mM 塩酸水溶液、1 mM 水酸化ナトリウム水溶液、3 M 塩化ナトリウム水溶液、グリセロール、ポリエチレンイミン分子の表面吸着、エタノール中における D の温度依存性の評価を行った。その結果、いずれの条件であっても温度依存性は報告されているおよそ $-70 \text{ kHz/}^\circ\text{C}$ を示していた(図 3)。FND の温度計測能がこれら環境に影響を受けない、すなわち細胞内という複雑な環境下においても温度のみを正確に計測できることを実験的に立証した。

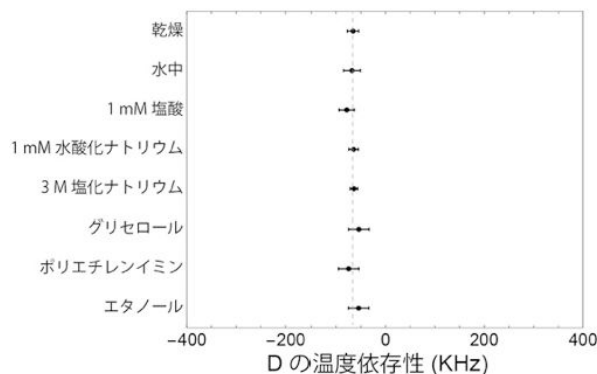


図 3. 温度計測能の環境依存性

次に FND を用いて細胞内の絶対温度を計測する技術開発を行った。一般的に用いられる温度計測プローブ（タンパク質型やポリマー型温度プローブなど）は、*in vitro* において信号（蛍光強度、蛍光寿命など）が温度に対してどのように変化するか、すなわちキャリブレーションライン

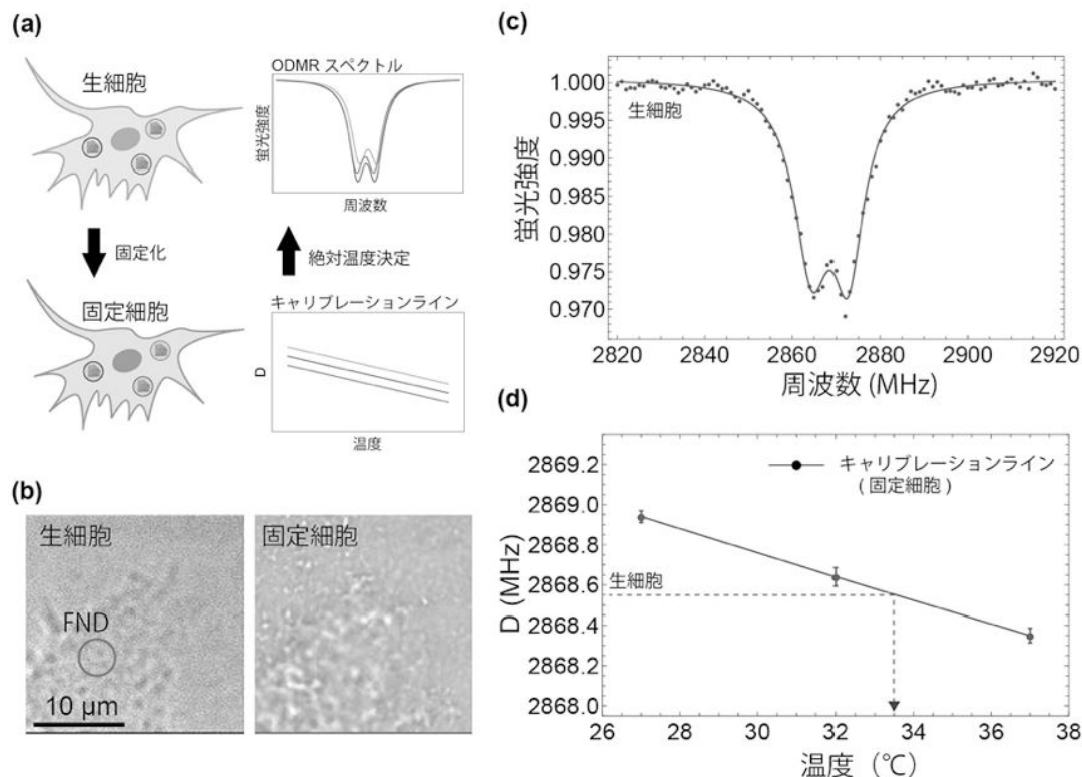


図 4. FND による細胞内温度計測法

(a)方法の概略図。(b) FND を取り込んだ HeLa 細胞の明視野像。左は生細胞、右は固定後の細胞。(c) 生細胞より取得した ODMR スペクトル。(d)固定細胞から得られた検量線。

ンをあらかじめ予め取得しておき、それをもとに細胞内の絶対温度計測を行っている。しかし、

FND のサイズ、形、NVC の数は粒子間で大きくバラついており、個々の粒子がそれぞれのキャリブレーションラインを持つ。そのため、FND 1 粒子を用いて細胞内で絶対温度を計測するためには、in vitro においてキャリブレーションライン(D vs 温度)を予め取得しておき、同一の FND を用いて細胞内で D を計測し絶対温度を決定する必要があるが、このような計測は技術的に非常に困難である。そこで我々は、細胞内に取り込まれたダイヤモンドに対して、蛍光信号を取得し、細胞を固定後にキャリブレーションラインを取得するという奇抜な手法を用いて細胞内の絶対温度を計測するプロトコルを確立した(図 4a)。図 3b は細胞内に取り込まれた FND の明視野像である。この FND は固定後であっても細胞内にとどまっている。図 4b の丸で示した FND に対して、生細胞内から取得した ODMR スペクトルを図 4c に、固定細胞より得られたキャリブレーションラインを図 4d に示している。このキャリブレーションラインを参照し、ODMR スペクトルから得られた D より絶対温度を算出した結果、細胞内の FND の温度が 33.5 °C を示した。細胞培養液の温度は 32.0 °C にコントロールされており、細胞内の温度が 1.5 °C 程度高いことが示唆された。今後は装置をさらに改良し、この高い温度の生物学的な意義について研究を進める予定である。

< 引用文献 >

- 1) W. Hsiao, Y-Y. Hui, P-C. Tsai and H-C. Chang: *Acc. Chem. Res.* 49 (2017) 400-407.
- 2) L. Cas, S. Zeldin, N. Nunn, M. Torelli, A. Shames, A. Zaitsev, and O. Shenderova: *Adv. Funct. Mater.* 29 (2019) 1808362.
- 3) A. Gruber, A. Dräbenstedt, C. Tietz, L. Fleury, J. Wrachtrup, and C. Borczyskowski: *Science* 27 (1997) 2012-2014.
- 4) S-J. Yu, M-W. Kang, H-C. Chang, K-M. Chen, and Y-C. Yu: *JACS* 127 (2005) 17604-17605.
- 5) Y-R. Chang, H-Y. Lee, K. Chen, C-C. Chang, D-S. Tsai, C-C. Fu, T-S. Lim, Y-K. Tzeng, C-Y. Fang, C-C. Han, H-C. Chang and W. Fann: *Nat. Nanotech.* 3 (2008) 284-288.
- 6) H-C. Chang, W. Hsiao, and M-C. Su: *Fluorescent nanodiamonds*, 1st ed. (Wiley, New Jersey, 2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takeshi Yokoyama, Kodai Machida, Wakana Iwasaki, Tomoaki Shigeta, Madoka Nishimoto, Mari Takahashi, Ayako Sakamoto, Mayumi Yonemochi, Yoshie Harada, Hideki Shigematsu, Mikako Shirouzu, Hisashi Tadakuma, Hiroaki Imataka, Takuhiro Ito	4. 巻 74
2. 論文標題 HCV IRES Captures an Actively Translating 80S Ribosome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 1205-1214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2019.04.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shingo Sotoma, Yoshie Harada	4. 巻 35
2. 論文標題 Polydopamine Coating as a Scaffold for Ring-Opening Chemistry To Functionalize Gold Nanoparticles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 8357-8362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.9b00762	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayato Ozawa, Yuji Hatano, Takayuki Iwasaki, Yoshie Harada, Mutsuko Hatano	4. 巻 58
2. 論文標題 Formation of perfectly aligned high-density NV centers in (111) CVD-grown diamonds for magnetic field imaging of magnetic particles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 S11B26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7567/1347-4065/ab203c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Attilio Marino, Alice Camponovo, Andrea degl'Innocenti, Martina Bartolucci, Christos Tapeinos, Chiara Martinelli, Daniele de Pasquale, Francesca Santoro, Valentina Mollo, Satoshi Arai, Madoka Suzuki, Yoshie Harada, Andrea Petretto, Gianni Ciofani	4. 巻 11
2. 論文標題 Multifunctional temozolomide-loaded lipid superparamagnetic nanovectors: Dual targeting and disintegration of glioblastoma spheroids by synergic chemotherapy and hyperthermia treatment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 21227-21248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9nr07976a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ryuji Igarashi, Takuma Sugi, Shingo Sotoma, Takuya Genjo, Yuta Kumiya, Erik Walinda, Hiroshi Ueno, Kazuhiro Ikeda, Hitoshi Sumiya, Hidehito Tochio, Yohsuke Yoshinari, Yoshie Harada, Masahiro Shirakawa	4. 巻 142
2. 論文標題 Tracking the 3D Rotational Dynamics in Minute Biological Systems	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 7542-7554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.0c01191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shingo Sotoma, Daiki Terada, Takuya F. Segawa, Ryuji Igarashi, Yoshie Harada and Masahiro Shirakawa	4. 巻 8
2. 論文標題 Enrichment of ODMR-active nitrogen-vacancy centres in five-nanometre-sized detonation-synthesized nanodiamonds: Nanoprobes for temperature, angle and position.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-23635-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Daiki Terada, Shingo Sotoma, Yoshie Harada, Ryuji Igarashi and Masahiro Shirakawa	4. 巻 29
2. 論文標題 One-Pot Synthesis of Highly Dispersible Fluorescent Nanodiamonds for Bioconjugation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioconjug Chem.	6. 最初と最後の頁 2786-2792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.8b00412.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeharu Sekiguchi, Shingo Sotoma and Yoshie Harada	4. 巻 15
2. 論文標題 Fluorescent Nanodiamonds as a Robust Temperature Sensor inside a Single Cell	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 229-234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.15.0_229	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yuji Hatano, Takeharu Sekiguchi, Takayuki Iwasaki, Mutsuko Hatano and Yoshie Harada	4. 巻 215
2. 論文標題 Magnetic field imaging of super-paramagnetic particles using high-density, perfectly oriented NV centres in diamond CVD film	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Phys. Status Solidi A	6. 最初と最後の頁 1800254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pssa.201800254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 原田慶恵
2. 発表標題 1 分子イメージング顕微鏡によるタンパク質の機能解析
3. 学会等名 京都産業大学生命科学部バイオフィォーラム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田慶恵、外間進悟、波多野雄治、波多野睦子
2. 発表標題 NVセンターの生命科学計測への応用
3. 学会等名 量子生命科学研究会第1回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshie Harada, Takeharu Sekiguchi, Shingo Sotoma
2. 発表標題 Fluorescent nanodiamond as a robust temperature sensor inside a single cell
3. 学会等名 The third International Workshop on Symbiosis of Biology and Nanodevices (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshie Harada
2. 発表標題 Development of a New Fluorescence Imaging Technique Using Nitrogen Vacancy Centers in Diamond
3. 学会等名 17th Chinese Biophysics Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shingo Sotoma, Yoshie Harada
2. 発表標題 Fluorescent nanodiamonds as a robust temperature sensor inside a single cell
3. 学会等名 E-MRS 2019 Fall Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shingo Sotoma, Feng-Jen Hsieh, Huan-Cheng Chang, and Yoshie Harada
2. 発表標題 Fluorescent nanodiamonds for bioimaging applications
3. 学会等名 E-MRS 2019 Fall Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 波多野 雄治, 多田隈 尚史, 岩崎 孝之, 波多野 睦子, 原田 慶恵
2. 発表標題 磁性粒子とダイヤモンド基板中のNVセンタを用いた細胞計測
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chongxia Zhong, Shingo Sotoma, Yoshie Harada, Madoka Suzuki
2. 発表標題 Application of individual fluorescent nanodiamond as nanothermometer and nanoheater
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chongxia Zhong, Shingo Sotoma, Taras Plakhotnik, James Chen Yong Kah, Yoshie Harada, Madoka Suzuki
2. 発表標題 Dual-functionalized fluorescent nanodiamond as nanoheaters and nanothermometers in cells
3. 学会等名 2020 Annual Meeting - Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 波多野雄治、関口武治、岩崎孝之、波多野睦子、原田慶恵
2. 発表標題 高密度高配向NVセンタを含むダイヤモンドCVD膜によるバイオイメージング
3. 学会等名 量子生命科学研究会・第2回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田慶恵、外間進悟、波多野雄治
2. 発表標題 NVセンターの生命科学計測への適用
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田慶恵
2. 発表標題 NVセンターの生命科学計測への適用
3. 学会等名 蛋白研セミナー：構造生物学と計算科学の融合による動的構造生物学の新しい展開（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshie Harada
2. 発表標題 Fluorescent Nanodiamonds as a Robust Temperature Sensor inside a Single Cell
3. 学会等名 Asian Chemical Biology Initiative 2019 Yangon Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshie Harada
2. 発表標題 Fluorescent nanodiamond as a robust temperature sensor inside a single cell
3. 学会等名 The Second International Workshop by the 174th Committee JSPS on Symbiosis of Biology and Nanodevices（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshie Harada
2. 発表標題 Studies on Biomolecules Using Single-Molecule Imaging Technique
3. 学会等名 Deutsch-Japan Kolloquien（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Hatano, Hayato Ozawa, Takayuki Iwasaki, Mutsuko Hatano, Susumu Yasuda, Takeshi Ohshima, and Yoshie Harada
2. 発表標題 Diamond Sensor - Device and System Construction
3. 学会等名 The 1st International Forum on Quantum Sensing (IFQS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshie Harada, Takeharu Sekiguchi, Takayuki Iwasaki, Mutsuko Hatano, Yuji Hatano
2. 発表標題 Cell imaging with magnetic particle with on a diamond sensor
3. 学会等名 9th FAOPS (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 磁気画像計測装置	発明者 原田慶恵、波多野雄治、多田隈尚史、波多野睦子、岩崎孝之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-97873	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

大阪大学 蛋白質研究所 原田慶恵研 研究テーマ https://www.ccc.osaka-u.ac.jp/protein/nanobiology/research/
--

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------