

局在プラズモンシートによる細胞接着ナノ界面の 超解像度ライブセルイメージング

Super-resolution live-cell imaging of
cell-attached nanointerface using LSPR sheets

課題番号：19H05627

玉田 薫 (TAMADA Kaoru)

九州大学・先導物質化学研究所・教授



研究の概要

本研究では、局在プラズモンシート（メタ表面）の光閉じ込めおよび蛍光増強効果を用いて、微粒子界面から～20 nm 以下の細胞接着ナノ界面を高解像度・高速イメージングし、界面における接着細胞の分子レベルでの動態を明らかにするとともに、得られたナノの解像度の細胞画像をハイスループット細胞活動診断システムとして完成させることを目指す。

研究分野：工学

キーワード：局在プラズモン共鳴，自己組織化，ライブセルイメージング，超解像度

1. 研究開始当初の背景

2014年のノーベル化学賞以来、ナノの解像度をめざす超解像度光学顕微鏡の開発が世界中で進められているが、これらの手法では、①強力なレーザ光照射の細胞への影響、②特殊な色素の必要性、③長い画像取得・解析時間（数分～数時間）、④高額な装置といった様々な問題が指摘されていた。空間分解能に関しても、Z軸方向100nm以下のナノ界面領域の観察は極めて困難であり、また高解像度と高速イメージングの両立はできておらず、生細胞内の分子レベルでの動態を観察する手法がこれまでなかった。

2. 研究の目的

我々はこれまでの研究で、金属ナノ粒子の自己組織化膜からなる局在プラズモンシートを蛍光イメージング基板として用いることで、光閉じ込め効果により、世界最薄（～20 nm）の実時間超解像度イメージングが可能であることを明らかにした。

本研究では、このイメージング法を生細胞の接着界面における分子レベルでの動態観察に応用し、幹細胞の分化評価やがん細胞の悪性度診断など、基礎生化学・医学分野の重要な課題に対して、新たな情報を提供することを目指す。さらにこのイメージング技術を深層学習と組み合わせることで、ハイスループット細胞活動診断シ

ステムとして完成させる。

3. 研究の方法

課題1：超解像度超高速ライブイメージング用局在プラズモンシートの作製（2019-2021）

超解像度超高速ライブイメージングの実現に向けて、さらに安定で且つ強力な光電場形成を目指し、ナノロッドあるいはナノディスク等の異形ナノ粒子の合成と自己組織化を行う。電場増強効果を最大にする構造最適化は電磁気計算によって実施する。

課題2：細胞接着ナノ界面の創製と界面における分子ダイナミクス直接イメージング（2019-2022）

細胞接着界面での分子レベルでの動態活動の可視化のためのライブセルイメージングシステムを構築する。さらに細胞ダイナミクスを故意に誘発する手法の開発や、接着斑のZ軸方向の変位や接着牽引挙動を検出するメカノバイオロジー研究を遂行する。

課題3：幹細胞・がん細胞のハイスループット観察（2022-2023）

ナノ界面の超解像度イメージング技術を、幹細胞ならびにがん細胞の分化評価、再生医工学における細胞評価・活性診断基材等のスクリーニング等に応用する。最終年には高画質・ハイスループット画像をビッグデータ解析や深層学習と組み合わせ、

細胞接着ナノ界面のハイスループット自動解析システムとして完成させる。

4. これまでの成果

課題1では、DNA ブラシを鋳型にして金ナノロッドを基板上に安定で高密度に自己組織化させる手法を開発した。さらに辺長が 30 nm 以下の三角形銀ナノプリズムを合成し、二段階化学修飾によって cm の大面積に自己組織化させることに成功した。電磁気計算の結果、これらの粒子膜を金属薄膜上に配置することで、共鳴ピークが著しく先鋭化し、さらなる発光増強効果が期待されることが明らかになった (図1)。

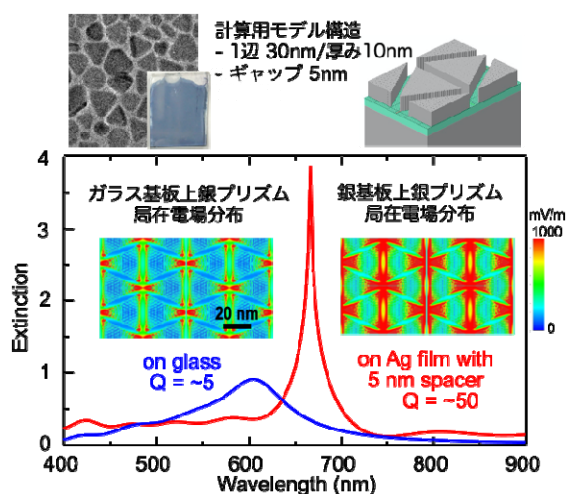


図1 ガラスおよび金属薄膜上銀ナノプリズムシートにより励起される局所電場 (電磁気計算)

課題2では、Venus-Paxillin-3T3 生細胞の高速ライブセルイメージングにおいて、接着斑蛋白質パキシリンのクラスター形成過程をナノの解像度 (65 nm/pixel) で実時間観察することに成功した (図2)。ここでは微粒子シートのメタ表面の光学効果によって、世界最薄 (~20 nm) の軸方向

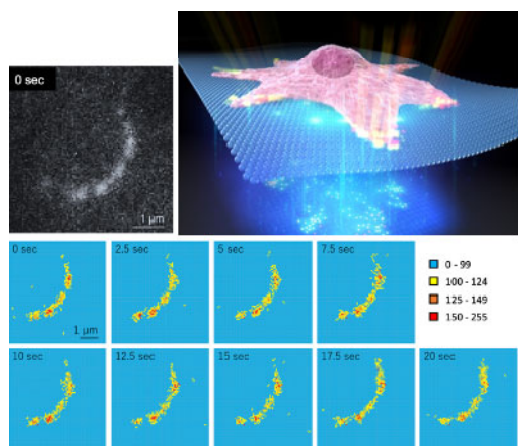


図2 生細胞の高時空間分解能イメージ: ナノの領域でのパキシリンの動き (65nm/pixel)

の解像度に加えて、面内方向においても回折限界に迫る高い面内解像度が得られた。さらにプラズモン-励起子結合の効果で光退色が大きく抑制されることがわかった。これらの成果は日本経済新聞にて次世代技術 NextTech 2030 として紹介されるとともに、海外のメディアにも注目され (13 社にて報道)、Altmetric Score 100 (Top 5% 注目論文) を獲得した。

5. 今後の計画

課題1では、図1の構造を利用した反射型イメージング法を当初計画の透過型イメージング法と合わせて検討する。課題2では、すでに成果が出始めている新生ナノ接着体の動態画像を利用して、深層学習による細胞診断法について基盤技術を確立し、再生医工学へと速やかに応用する。課題3の幹細胞・がん細胞のハイスループット観察は、課題1・課題2で確立した技術とともに、医学・生化学研究者と連携して実施する。細胞診断システムの構築に向けて、細胞自体は無染色のまま、蛍光性基板を用いて細胞接着牽引挙動を評価するメカノバイオロジー研究を並行して進める。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. High axial and lateral resolution on self-assembled gold nanoparticle metasurfaces for live-cell imaging, S. Masuda, T. Kuboki, S. Kidoaki, S-T. Lee, S. Ryuzaki, K. Okamoto, Y. Arima, K. Tamada*, ACS Appl. Nano Mater. 3, 11135-11142 (2020).
2. Flexibly tunable surface plasmon resonance by strong mode coupling using a random metal nanohemisphere on mirror, K. Okamoto*, K. Okura, P. Wang, S. Ryuzaki, K. Tamada, Nanophotonics, 9, 10, 3409-3418 (2020).
3. Strategy for Finely Aligned Gold Nanorod Arrays using Polymer Brushes as a Template, S. Nakamura, H. Mitomo*, Y. Sekizawa, T. Higuchi, Y. Matsuo, H. Jinnai, K. Ijiro*, Langmuir, 36, 3590-3599 (2020).
4. Synthesis of Ag Nanoprisms with Precisely-tuned Localized Surface Plasmon Wavelengths by Sequential Irradiation of Light of Two Different Wavelengths, N. Takeshima, K. Sugawa*, M. Noguchi, H. Tahara, S. Jin, K. Takase, J. Otsuki, K. Tamada, Chem. Lett., 49, 3, 240-243 (2020).

他 24 報

招待講演 12 件 一般講演 23 件

7. ホームページ等

<http://www.cm.kyushu-u.ac.jp/ktamada/>