

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23643

研究課題名（和文）多項目解析を可能にする新規走査型イオンコンダクタンス顕微鏡の開発

研究課題名（英文）Scanning ion conductance microscopy with a multi-analytical system from imaging sequence

研究代表者

井田 大貴（Ida, Hiroki）

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：80844422

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：走査型イオンコンダクタンス顕微鏡（SICM）は、ナノメートルスケールで生じる細胞膜の変形を計測に最適な手法の一つである。電解質溶液を充填した開口径がナノスケールのガラスピペットを用いて、試料に近接した際に起こる電流値の減少を利用して、細胞にダメージを与えず計測できる。本研究では、取得電流値から新しい情報を引き出し、追加のイメージを同時取得できるSICMの開発を目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SICMの性能が向上することで、今まで把握できなかった細胞現象を可視化することができる。そのため、これまで様々なグループが他の装置との融合や高速化などの装置改善を試みてきた。本研究では、従来主流であったハード面での改善とは異なるソフト面での改善を試み、従来の改良と並行して適用可能な装置改善を試みた。

研究成果の概要（英文）：Scanning ion conductance microscopy (SICM) is one of the powerful measurement techniques for obtaining morphological variations on the cell membrane with nanoscale. The SICM can apply as non-invasive cell measurement from current drop caused by the block of the ionic flow through the tip of the SICM. In this work, we have developed a new SICM system which can obtain a number of additional information from imaging by analyzing the ion current.

研究分野：電気化学計測

キーワード：SICM 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 生細胞計測

1. 研究開始当初の背景

細胞膜は細胞の最外部に位置する細胞の構造であり、物質のやり取りやシグナル伝達など、外環境との直接的な対応を行う窓口と言える。その構造はサブマイクロメートルスケールで動的に変化しており、細胞機能の更なる理解には膜動態の詳細が求められる。透明かつ光学顕微鏡の分解能(約 200nm)以下の変動が起きる膜表面を観察するための手法として、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)は最適な技術の一つである(図1)。SICMは、ガラスキャピラリーの先端部分をナノメートルスケールに先鋭化したガラスナノピペットに電解液を充填した物を探針に用いて、先端を通るイオンの流れが試料近傍で阻害されることを電流値から検出する。このイオン流の阻害は、試料との物理的な接触を伴わないため、測定対象が生細胞でもストレスを与えずにその動態を計測できる。

SICMで計測できる情報は一般的には試料の形状情報に限定されており、一度の計測で1細胞の局所領域しか可視化できないなどスループットにも課題があった。以上の課題に対し、これまでは蛍光顕微鏡や他の電気化学計測と組み合わせることによって形状以外の情報の補完や^{[1][2]}、走査の高速化によるスループットの向上^[3]で対処してきた。

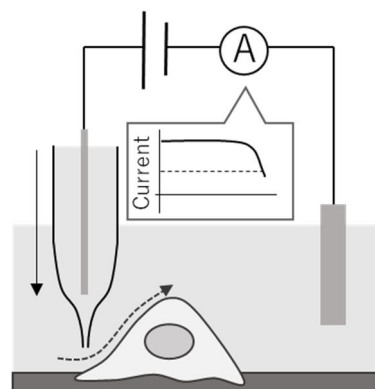


図1 SICM計測の模式図。試料の存在で電流値が減少し、その時のナノピペットの停止位置を各測定点で記録することで形状像を取得できる。

2. 研究の目的

本研究では、取得している電流値から新しい情報を引き出し、追加情報を有するイメージを同時取得できるSICMおよび計測方法を開発することを目的とした。これにより、SICM計測によって形状以外にも評価可能となり、単位時間あたりに取得できる情報量が増加する。また、このようなソフト面での改良は、これまで研究されてきたハード面での改良と併存でき、既存の様々な装置へ適用可能であることが期待できる。

3. 研究の方法

微小電流計測機の帯域とサンプリングレートに依存するが、一度のSICMで得られる電流値はおよそ数GB程度である。しかし、SICM計測は、ナノピペットを介して得られるイオン電流が試料によって“変動”することを利用しており、電流値が設定した閾値に到達したときのZ方向のピペットの位置を取得する事で形状測定を行っている。即ち、これまでの多くのSICM計測では殆どの電流情報を切り捨てており、利用するデータはkBオーダーのピエゾステージ(ナノメートルスケールの位置制御が可能な装置)の変位情報がメインであった。そこで、本研究ではSICM計測中に得られる電流値を大量に記録・解析する事で、一度のイメージングから複数の画像を取得した。

4. 研究成果

(1)装置開発

イオン電流は、試料との距離が近くなるほど変動が大きくなる。そのため、ナノメートルレベルの振動でも、ナノピペットが試料に近接している状態では影響が甚大となり、最悪の場合ピペットへの試料の吸着や破損によって計測が失敗する。そこで、除震構造による外部振動との切り離しや、ステージの高剛性化などの装置系を刷新した。また、ノイズ対策を意識とした装置設計と、制御アルゴリズムの改善により、微小電流増幅器の計測帯域を3kHzに上げて通常SICM計測が可能となった。取り回しや熱膨張によるドリフトも改善しており、様々な面において従来の装置系からの大幅な改善を達成した。

(2)実測定

細胞表面近傍での電流値を周波数解析により評価した結果、現時点では生細胞ではノイズが大きく判別可能な像を取得することは困難であった。特に、微絨毛(細胞膜表面に存在するアクチン繊維からなる突起構造)の先端部分ではおそらく、微絨毛の動きに起因する像の乱れが大きく、更なる低ノイズ化や電流計測機の計測帯域の向上が求められる。一方、固定化細胞の計測では、微絨毛などの形状とは対応しないイメージの取得に成功した。以上のイメージは、細胞膜あるいは細胞膜下の構造に関連する事が予測され、蛍光顕微鏡との同時観察によって取得したイ

メーシが何に起因するかを調査予定である。また、今後は深層学習を利用することで、埋もれていた情報を抽出する事を計画している。

<引用文献>

[1] Hiroki Ida, *et al.*, “Nanoscale Visualization of Morphological Alteration of Live-Cell Membranes by the Interaction with Oligoarginine Cell-Penetrating Peptides” *Anal. Chem.*, 93(13), pp 5383 - 5393, 2021.

[2] Yasufumi Takahashi, Hiroki Ida, *et al.*, “3D electrochemical and ion current imaging using scanning electrochemical-scanning ion conductance microscopy”, *Phys.Chem.Chem.Phys.*, 19, pp 26728-26733, 2017.

[3] Hiroki Ida, *et al.*, “High Speed Scanning Ion Conductance Microscopy for Quantitative Analysis of Nanoscale Dynamics of Microvilli”, *Anal. Chem.*, 89(11), pp 6016-6021, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroki Ida, Yasufumi Takahashi, Akichika Kumatani, Hitoshi Shiku, Tomo Murayama, Hisaaki Hirose, Shiroh Futaki, and Tomokazu Matsue	4. 巻 93(13)
2. 論文標題 Nanoscale Visualization of Morphological Alteration of Live-Cell Membranes by the Interaction with Oligoarginine Cell-Penetrating Peptides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 5383-5393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c04097	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 Noriko TaNoriko Taira, Yuji Nashimoto, Kosuke Ino, Hiroki Ida, Takuto Imaizumi, Akichika Kumatani, Yasufumi Takahashi, and Hitoshi Shiku	4. 巻 93(11)
2. 論文標題 Micropipet-Based Navigation in a Microvascular Model for Imaging Endothelial Cell Topography Using Scanning Ion Conductance Microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 4902-4908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c05174	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井田 大貴
2. 発表標題 単一細胞を対象とした電気化学を基盤とするナノプローブ技術の開発と応用
3. 学会等名 化学系学協会東北大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------	---------