

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02582

研究課題名(和文) ナノスケールの構造変化とシグナル伝達をリンクするプローブ顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Development of new scanning probe microscopy for correlative analysis of nanoscale structure change and signal transduction

研究代表者

高橋 康史 (Takahashi, Yasufumi)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：90624841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：メンブレントラフィックや、細胞遊走などのダイナミックな動きは、細胞内シグナル伝達により調整されている。これまで、Forster resonance energy transfer (FRET) バイオセンサーを活用することで、細胞内で不均一に生じるシグナル伝達の可視化が行われてきた。しかし、シグナルにより生じる細胞のナノスケールの構造変化をとらえることが困難であった。そこで、走査型プローブ顕微鏡と、FRETバイオセンサーの同時イメージング技術を開発し、葉状仮足の構造変化とシグナル伝達の評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光学顕微鏡の高機能化では達成できないナノスケールの構造とシグナル伝達の間をプローブ顕微鏡と光学顕微鏡の融合により達成した。リガンドの局所投与や形状変化により生じる細胞内シグナル伝達は、これまで一貫して捉えることが困難であったが、一連の細胞の表面構造変化からシグナル伝達までを可視化できるようになった。さらに、本システムは、センシング・イメージングに加え、ナノピペットを用いた細胞表面のナノスケールのマニピュレーションを行うことが可能であり、化学物質の局所投与や回収や、局所的な化学刺激に伴うシグナル伝達の評価も実現できる。

研究成果の概要(英文)：Dynamic cellular structural changes such as membrane trafficking and cell migration are regulated by intracellular signaling. Until now, heterogeneous intracellular signaling within single cells has been visualized by utilizing Forster resonance energy transfer (FRET) biosensors. However, it has been difficult to capture the nanoscale structural changes in the cell caused by the signal transduction. Therefore, we developed a simultaneous imaging technique using a scanning probe microscope and a FRET biosensor to evaluate the relationship between the structural changes at the lamellipodia and signal transduction.

研究分野：走査型プローブ顕微鏡

キーワード：単一細胞解析 バイオイメージング ナノピペット シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

電子顕微鏡と蛍光顕微鏡の隙間を埋める技術として、超解像度顕微鏡などバイオイメージングの新たな可能性が示されている。その一方で、メンブレントラフィック、細胞遊走などのダイナミックな動き(形状変化)は、細胞内シグナル伝達により調整されている。シグナル伝達の起源となる受容体の刺激に関する感受性、刺激の強度や周期、表面形状変化との関係など、複雑な細胞機能のシームレスな理解には、ナノスケールの表面構造変化とシグナル伝達の間をリンクさせる必要がある。

ナノピペットを用いて、生細胞の表面形状変化を可視化できる走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)は、イメージングだけでなく、細胞への局所的な化学物質の投与や、細胞質を回収可能である。これまで、共焦点顕微鏡と併用し、エンドサイトーシスに関与する生体分子の動きとエンドサイトーシスピットの消失をナノスケールで捉えた。このような細胞骨格と、細胞表面形状の変化の相関性が評価されてきた。しかし、従来法ではシグナル伝達との関係を評価できない。

そこで、本研究では、シグナル伝達を可視化するため Forster resonance energy transfer (FRET) バイオセンサーを導入し、ナノスケールの形状測定とともに、ナノピペットから任意の位置に化学物質を投与可能な SICM と組み合わせることで、局所的な刺激の印可と、シグナル伝達の可視化、さらに、そのシグナルにより生じる細胞のナノスケールの形状変化を捉える。具体的な応用として、神経細胞のカーゴ輸送、免疫シナプスの形成、一次繊毛の伸縮など局所刺激に伴うナノスケールの構造変化とシグナル伝達の間を明らかにする。

2. 研究の目的

刺激・シグナル伝達・構造変化を直接リンクするため、SICM と FRET バイオセンサーの融合技術を開発した。光学顕微鏡の高機能化では達成できないナノスケールの構造とシグナル伝達の間をプローブ顕微鏡と光学顕微鏡の融合により達成できる。リガンドの局所投与や形状変化により生じる細胞内シグナル伝達は、これまで一貫して捉えることが困難であったが、一連の細胞の表面構造変化からシグナル伝達までを可視化する。さらに、本システムは、センシング・イメージングに加え、マニピレーションを行うことが可能であり、化学物質の局所投与や回収や、局所的な化学刺激に伴うシグナル伝達の評価も実現できる。

3. 研究の方法

SICM-FRET の開発と応用

SICM-FRET 融合技術は、SICM を搭載した倒立顕微鏡に、電動フィルターイクスチェンジャーを導入し、蛍光シグナルを切り替え、CFP と YFP のシグナルを sCMOS カメラにより取得した。2種類の蛍光シグナルを取得後に、FRET バイオセンサーの利用は、松田道行教授(京都大学)らとの共同研究で進めた。小分子 G タンパク質は、特異的な標的分子に結合して細胞内シグナルを伝達する分子スイッチとして機能する。ターゲットとして、葉状仮足の構造変化に関与する Rho ファミリーの Rac1 の活性を捉える FRET バイオセンサーを、HeLa 細胞にトランスフェクションにより一過的に発現させたものと、COS-7 に恒常発現させたものを実験に用いて進めた。

オルガネラの自動認識と局所的な化学刺激・回収技術の開発

ナノピペットでは、開口が微細なため、圧力制御での試薬の出し入れは困難である。そこで、有機電解液と化学刺激用の試薬を含む水溶液をナノピペットに充填し、液液界面における張力変化を電気化学的に誘導し、界面位置を上下させ、数百 fL レベルでの回収量の制御を実現する電気化学シリッジを用いて、SICM イメージングとの融合システムを構築した。さらに、単一ミトコンドリアの回収を実現し、mRNA の解析にも成功した。さらに、独自開発した XY 電動ステージを組み込み、35 mm ディッシュ内全域の細胞の自動形状・蛍光イメージングおよびオルガネラの自動識別・回収を可能とするシステムの開発を行った。

高速イメージングのための超高速電流計測の開発

SICM では、数 pA のノイズレベルで微小電流計測を行う必要がある。しかし、微小電流計測器は、この 30 年間ほとんど技術的な進展がなく、数 kHz の計測が限界であり、高速イメージングのボトルネックとなっている。そこで、微小電流計測器を独自開発することで、50 kHz の応答速度を有する微小電流計測器を開発に取り組んだ。

4. 研究成果

SICM-FRET の開発と応用

SICM-FRET 融合技術では、SICM によりナノスケールの表面形状を捉えるために、sCMOS を空冷

する際のファン由来の振動を除く必要があった。そこで、倒立顕微鏡と CMOS カメラの接続部の工夫や、CMOS カメラの水冷を試みることで解決した。また、FRET 観察時には、短波長の励起光を長時間露光することになるため、できるだけ露光時間を減らすことや、励起光の強度の最適化を行うことで、2 時間の FRET のタイムラプス計測で細胞に対して、励起光由来のダメージが生じない条件を見つけ出した。このような、系の最適化を行い、SICM と FRET バイオセンサーによる HeLa 細胞について、Rac1 の活性の同時イメージングし、細胞の葉状仮足の変形の直前に Rac1 が活性化する様子を可視化することに成功した。細胞への Rac1 活性化のための刺激として、上皮成長因子 (EGF) を利用し、ディッシュ全体に EGF (100 ng/mL) を加えることで刺激を行った。現在、COS-7 にて同様の実験を進めている。イメージング時間に関しては、約 4000 点の計測点を 3-4 分ほどでイメージングしており、FRET バイオセンサーの撮像時間に比べ非常に時間がかかることが課題であり、下記のように SICM イメージングのボトルネックとなっている微小電流計測について、高速化を進めている。

オルガネラの自動認識と局所的な化学刺激・回収技術の開発

ナノピペットを用いて、局所的に EGF を投与するための条件最適化を行った。ナノピペットに正の電圧を印加することで、電気浸透流を介して、EGF を細胞に対して投与することができる。この際に、ナノピペットの開口径やピペット内に充填する溶液の電解質濃度が重要であり、その最適化を行うことで、まず、フルオレセインを電圧印加によりピペット先端からの放出に取り組み、電圧印加のオン/オフによる制御が可能であることを確認した。現在、Alexa 標識された Alexa を用いて、同様の実験を行い、電圧値や電圧印加時間、ナノピペットの開口径の最適化を行っている。

高速イメージングのための超高速電流計測の開発

帰還抵抗の選定や独自のフィルタリング技術の開発により、微小電流計測の高速化に取り組み、50 kHz の応答速度を有する微小電流計測器を開発した。この新たな微小電流計測器により、ナノピペットの移動速度を従来の限界であった 500 nm/ms から 2000 nm/ms まで大幅に向上することに成功し、従来の 4 倍以上速いイメージングが可能となった。この微小電流計測器を、SICM - FRET システムに搭載し、タイムラプスイメージングを試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nashimoto Yuji, Abe Minori, Fujii Ryota, Taira Noriko, Ida Hiroki, Takahashi Yasufumi, Ino Kosuke, Ramon Azcon Javier, Shiku Hitoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Topography and Permeability Analyses of Vasculature on a Chip Using Scanning Probe Microscopies (Adv. Healthcare Mater. 21/2021)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Healthcare Materials	6. 最初と最後の頁 2170101 ~ 2170101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adhm.202170101	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 Sato Katsuhiko, Sato Fumiya, Kumano Masayuki, Kamijo Toshio, Sato Takaya, Zhou Yuanshu, Korchev Yuri, Fukuma Takeshi, Fujimura Tsutomu, Takahashi Yasufumi	4. 巻 33
2. 論文標題 Electrochemical Quantitative Evaluation of the Surface Charge of a Poly(1 Vinylimidazole) Multilayer Film and Application to Nanopore pH Sensor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Electroanalysis	6. 最初と最後の頁 1633 ~ 1638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/elan.202100041	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 Ida Hiroki, Takahashi Yasufumi, Kumatani Akichika, Shiku Hitoshi, Murayama Tomo, Hirose Hisaaki, Futaki Shiroh, Matsue Tomokazu	4. 巻 93
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 Taira Noriko, Nashimoto Yuji, Ino Kosuke, Ida Hiroki, Imaizumi Takuto, Kumatani Akichika, Takahashi Yasufumi, Shiku Hitoshi	4. 巻 93
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 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 Ida Hiroki, Takahashi Yasufumi, Kumatani Akichika, Shiku Hitoshi, Murayama Tomo, Hirose Hisaaki, Futaki Shiroh, Matsue Tomokazu	4. 巻 93
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 Taira Noriko, Nashimoto Yuji, Ino Kosuke, Ida Hiroki, Imaizumi Takuto, Kumatani Akichika, Takahashi Yasufumi, Shiku Hitoshi	4. 巻 93
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 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 Zhou Yuanshu, Takahashi Yasufumi, Fukuma Takeshi, Matsue Tomokazu	4. 巻 2
2. 論文標題 Scanning Electrochemical Microscopy for biosurface imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Electrochemistry	6. 最初と最後の頁 100739 ~ 100739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.coelec.2021.100739	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 Kolmogorov Vasilii S., et al.,	4. 巻 13
2. 論文標題 Mapping mechanical properties of living cells at nanoscale using intrinsic nanopipette-sample force interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 6558 ~ 6568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0NR08349F	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 Kanno Yusuke, Zhou Yuanshu, Fukuma Takeshi, Takahashi Yasufumi	4. 巻 34
2. 論文標題 Alkaline Phosphatase based Electrochemical Analysis for Point of Care Testing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Electroanalysis	6. 最初と最後の頁 161 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/elan.202100294	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 Vaneev Alexander N., et al.	4. 巻 94
2. 論文標題 In Vitro/In Vivo Electrochemical Detection of Pt(II) Species	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 4901 ~ 4905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.2c00136	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 Nozawa Kota, Zhang Xuyang, Nakamura Takuo, Nashimoto Yuji, Takahashi Yasufumi, Ino Kosuke, Shiku Hitoshi	4. 巻 449
2. 論文標題 Topographical evaluation of human mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation using scanning ion conductance microscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Electrochimica Acta	6. 最初と最後の頁 142192 ~ 142192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.electacta.2023.142192	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 15件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 高橋康史
2. 発表標題 ガラスナノピペットを用いた単一オルガネラの単離と分析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋康史
2. 発表標題 ガラスナノピペットを用いた細胞のナノ構造・機能解明に資するプローブ顕微鏡の開発
3. 学会等名 第167委員会第98回研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋康史
2. 発表標題 ナノピペットを用いた細胞膜表面の超解像度イメージング
3. 学会等名 コロイド先端技術講座2021（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋康史
2. 発表標題 細胞の表面をナノスケールで 観察する顕微鏡の開発と応用
3. 学会等名 GTR-ITbM-RCMS Seminar
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋康史
2. 発表標題 生細胞表面の超解像度形状イメージング技術の開発
3. 学会等名 ITbM/GTRコンソーシアムワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋康史
2. 発表標題 走査型プローブ顕微鏡による 超解像度ライブセルイメージング
3. 学会等名 九州大学理学研究院化学部門 分析化学特別講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋康史
2. 発表標題 ガラスナノピペットを利用した 新奇プローブ顕微鏡の開発と応用
3. 学会等名 FRIS/TI-FRIS Material Science Seminar（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋康史
2. 発表標題 単一オルガネラ分析に資する走査型プローブ顕微鏡の開発
3. 学会等名 第31回日本バイオイメーキング学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋康史
2. 発表標題 ナノ電極・ナノピペットを用いた電気化学イメージング技術の新展開
3. 学会等名 2022電気化学秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋康史
2. 発表標題 Development of Organelle Collection Technology Using Nanopipette
3. 学会等名 6th NanoLSI Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋康史
2. 発表標題 ナノピペットを用いたライブセルイメージング・センシング
3. 学会等名 基盤医学特論 異分野融合推進セミナー 第2回 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋康史
2. 発表標題 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡を用いた 単一オルガネラ回収技術の開発
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋康史
2. 発表標題 ガラスナノピペットを用いた機能性イメージング技術の創成
3. 学会等名 表面界面スペクトロスコープ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋康史
2. 発表標題 ナノスケールの細胞機能評価を実現する走査型プローブ顕微鏡
3. 学会等名 第37回マルチモーダルバイオイメージセンサ研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋康史
2. 発表標題 機械学習を利用した細胞の自動回収技術の開発
3. 学会等名 細胞の局所コミュニティ研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋康史
2. 発表標題 Super-resolution chemical imaging using scanning probe microscopy
3. 学会等名 Bioinspired Engineering and Biomechanics Center (BEBC) of Xi'an Jiaotong University seminar（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋康史
2. 発表標題 ガラスナノピペットを用いたバイオイメージング
3. 学会等名 生体内情報計測・バイオイメージングのための 先端メディカルデバイス開発の最前線（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ

<http://takahashi.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

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