

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21360032

研究課題名（和文） 生体分子カイネティクスを解明するナノ光計測

研究課題名（英文） Optical nano-instrumentation for observation of molecular dynamics

研究代表者

井上 康志（INOUE YASUSHI）

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：60294047

研究成果の概要（和文）：金属ナノ粒子、半導体量子ドット、金属ナノクラスターなど新規のナノ光学マテリアルを利用した生体分子のカイネティクスや分子認識メカニズムを解明するナノ光計測法の開発を行った。さらに、生体分子のダイナミクス観察に適したナノダイマーやナノクラスターなどの金属ナノ構造体の作製方法を確立するとともに、構造の最適化や生体分子への修飾法についての技術開発も行った。

研究成果の概要（英文）：We have developed optical nano-instrumentation for observation of biomolecular kinetics and molecular recognition mechanism by using novel optical nano-materials, such as metallic nano-particles, semiconductor quantum dots and metallic nano-clusters. We have also established fabrication methods of metallic nano-structures e.g., nano-dimers and nano-clusters which are suitable for observation of biomolecular dynamics besides optimization of nano-structures and development of chemical modifications.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 7,800,000 | 2,340,000 | 10,140,000 |
| 2010年度 | 3,900,000 | 1,170,000 | 5,070,000 |
| 2011年度 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,500,000 | 4,350,000 | 18,850,000 |

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎 応用光学・量子光工学

キーワード：ナノ光計測、計測機器開発、金属ナノ粒子、生体分子カイネティクス、1分子計測、ナノプラズモニクス、金属ナノクラスター

1. 研究開始当初の背景

光計測法は、光の持つ低エネルギー性により、計測、観察対象に対して優しい測定法であり、水中、大気中においても利用できるため、生体を生きたまま観察する最適な方法として、今なお、広く利用されている。最近ではとくに振動分光学と先進顕微鏡を組み合わせることで、網羅的に細胞を分析する研究が行わ

れ、種々の生理学的情報を分光学的に観察することで、多角的に生命活動を理解することが行われ始めている。しかしながら、この場合には複数の分光スペクトルデータを互いに関連付けながら整理する作業が要求される。これに対し、転写制御因子、リガンド、受容体、モータータンパクなど観察対象が特定されている場合、網羅的に分子イメージン

グを行うよりは、ターゲットを蛍光分子などにより標識し、そのダイナミクスをナノメートルスケールかつリアルタイムで観察する方が現実的である。たとえば、マイクロメートルオーダーのポリスチレン球を用いてミオシンなどのモータータンパク分子の運動を測定する技術については生物物理の分野で、すでに確立した手法として利用されているものの、分子会合などのダイナミクスを観察するには、標識プローブは立体障害が生じない程度のサイズが必要である。

近年、生体分子のダイナミクスを観察するための標識物質として金属ナノ粒子、半導体量子ドット、金属ナノクラスターなど 1~50nm 程度のサイズでありながら、明るく、光耐性が強く退色しないナノ材料開発の進展が著しい。私たちも、表面増強ラマン散乱を高感度にプローブする銀ナノ粒子を合成する方法について検討を行い、合成条件を最適化することにより同一形状、同一サイズの銀ナノ粒子を作製し、均一な光学特性を実現できることを示すと同時に、生細胞内にエンドサイトーシスにより取り込まれた金属ナノ粒子が、暗視野照明下で細胞内を移送される様子をビデオレートで観察し、そのポテンシャルの高さに着目してきた。

2. 研究の目的

本研究では、サイズ径に依存して異なる色を発色するあるいは標識プローブ間距離に依存した波長シフトを生起する金属ナノ粒子、半導体量子ドットあるいは金属ナノクラス

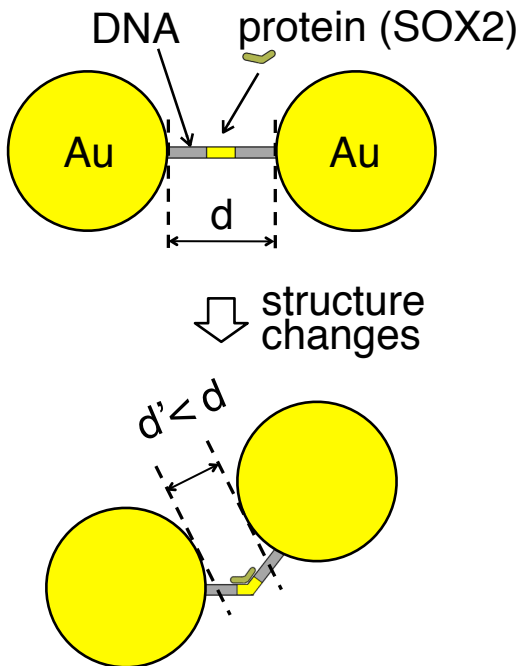


図1 金ナノダイマーを用いたダイナミクス計測の原理

ターなどナノ光学マテリアルを利用した生体分子のカイネティクスや分子認識メカニズムを解明する光ナノ計測法の開発を目的とする。さらに、生体分子のダイナミクス観察に適した金属ナノ構造体の作製方法を開発するとともに、構造の最適化や生体分子への修飾法についての技術開発も行い、生体分子が協調しながら、相互に認識し、会合等することで生み出される多様な生命活動の解明に資するナノ・バイオフィotonics計測分野を開拓する。

3. 研究の方法

(1) 金ナノダイマーによる転写制御因子のダイナミクス計測システムの構築

遺伝情報の転写は、転写をつかさどるタンパク質がDNAの特定の塩基配列を認識し、その部位と結合し、DNAの構造が変化することで行われている。このDNAの構造変化については、構造変化後に電気泳動法を用いることで確認されてはいるが、*in situ*での観察は行われていない。そこで、図1に示すように、特定の塩基配列を有するDNAの両端に金ナノ粒子を固定することで、ナノダイマー(粒子対)を作製し、タンパク分子が特異的にDNA塩基配列に結合することにより生じる立体構造変化でナノ粒子間距離が変化することを、ナノダイマーのプラズモン共鳴波長のシフトにより計測するシステムを構築する。

(2) 蛍光性金属ナノクラスター作製と生体イメージングへの応用

金属ナノ構造体の構造が微小化し、サイズが1nm程度以下のナノクラスターになると、量子性が顕在化し、電子準位にバンドギャップ構造が現れることで、蛍光性を示すようになる。そこで、プラチナ原子によるナノクラスター合成を行い、生体分子の構造変化などでの立体障害を回避できる新規蛍光プローブの開発ならびに光学特性評価、さら金属ナノクラスターを用いた生体イメージングを行う。

(3) ナノポジショニング計測の確立

ナノプローブの位置をナノメートルオーダーで計測する技術、とくに、複数のナノプローブの位置を、回折限界を超え、かつ、生体分子の素過程を解明できるミリ秒以下の時間分解能で、個別に測定する方法の確立を図る。さらに、プローブの極小化による検出光強度の低下を補償するため、検出感度を向上する新たな計測法を開発する。

4. 研究成果

(1) 金ナノダイマーによる転写制御因子のダイナミクス計測システムの構築

タンパク分子が特異的に結合することにより生じるDNAの立体構造変化を、リアルタイムで計測する顕微光学系を作製した(図2)。倒

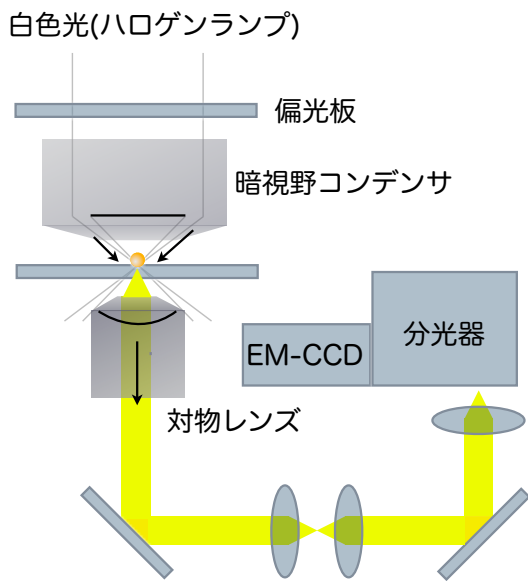


図2 構築したダイナミクス顕微計測システム

立型光学顕微鏡をベースとし、暗視野コンデンサー (NA=1.2~1.43) を通して集光した白色光により、ナノダイマーを照明し、ナノダイマーからの散乱光を対物レンズ (NA=0.8) により集光し、EM-CCDカメラを検出器としたポリクロメータにより散乱スペクトルを測定する。

次に、有限差分時間領域 (FDTD) 法により、金ナノ粒子の直径 (40, 50, 60, 80, 100nm) および DNA の塩基数 (DNA 長 : 50, 70, 100 塩基) でのプラズモン共鳴波長の解析を行った。その結果、直径 50nm の金ナノ粒子および 50 塩基の DNA (17nm) によって構成される金ナノダイマーを用いることで、プラズモン共鳴波長シフトを最も精度よく検出できることを見いだした。

この解析結果を用いて、転写因子タンパク

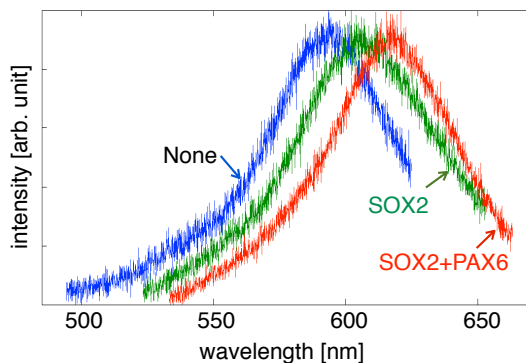


図3 転写因子タンパク分子が特異的に結合することで生起される金ナノダイマーの散乱スペクトルの変化

分子 (SOX2) が特異的に結合する塩基配列 (DC5) を含む 50 塩基の DNA の両端に金ナノ粒子 (50nm) を結合した金ナノダイマーを作製した。まず始めに、金ナノダイマーだけを暗視野照明により顕微観察したところ、プラズモン共鳴波長は $586.9 \pm 5.7 \text{ nm}$ であった (図3内 None で示された青色のスペクトル)。次に、転写因子タンパク分子 (SOX2) と金ナノダイマーの DNA を特異的に結合させると、プラズモン共鳴波長は $607.3 \pm 5.7 \text{ nm}$ にシフトした (図3内 SOX2 で示された緑色のスペクトル)。さらに、SOX2 と協調的に結合する転写因子 (PAX6) を加えると、プラズモン共鳴波長は $615.2 \pm 8.5 \text{ nm}$ にシフトした (図3内 SOX2+PAX6 で示された赤色のスペクトル)。金ナノダイマーの DNA 塩基数を変えてプラズモン共鳴波長を測定することで作成した検量線から、それぞれの粒子間距離は平均で、 6.6 nm (SOX2) および 5.3 nm (SOX2+PAX6) と見積もられ、平均屈曲角度はそれぞれ 64.6° (SOX2)、 68.7° (SOX2+PAX6) に相当することが示された。SOX2 の結合による屈曲角は電気泳動法により得られた数値 (66°) に対し標準偏差内にあることを確認するとともに、SOX2 と PAX6 との結合による屈折角の測定に初めて成功した。

(2) 蛍光性金属ナノクラスター作製と生体イメージングへの応用

プラチナ原子 5 個から構成される蛍光性金属ナノクラスターの合成法を確立した。具体的には、六塩化白金酸 (H_2PtCl_6) と dendrimer (polyamidoamine : PAMAM (G4-OH)) を純水中で混合し、水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) により還元することで、合成した。つぎに、PAMAM 自体が酸化されることで蛍光を発するので、dendrimer をメルカプト酢酸と置換したのち、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分収し、精製を行った。精製物を ESI (Electro Spray Ionization)

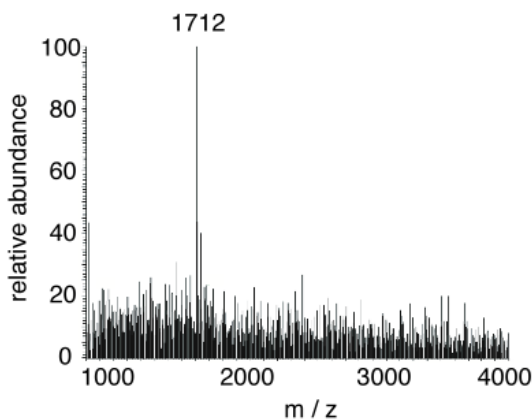


図4 合成物を精製した後の質量スペクトル

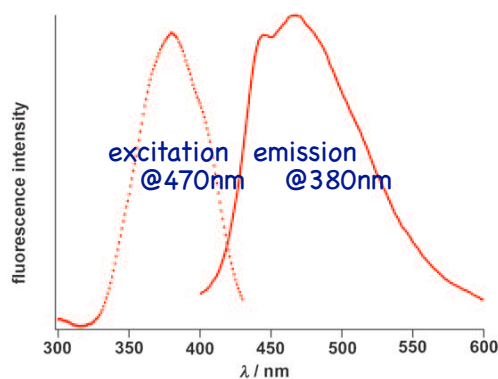


図5 プラチナナノクラスターの励起スペクトル（点線）および蛍光スペクトル（実線）

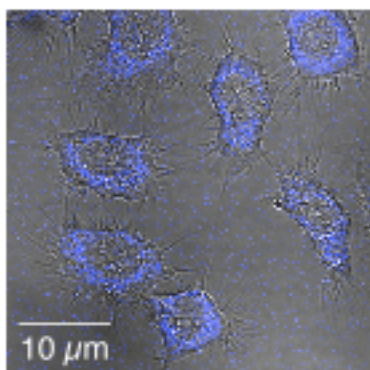


図6 Pt ナノクラスターにより標識したケモカインレセプターの共焦点顕微イメージング

質量分析器および ICP 質量分析器により分析した結果、プラチナ原子 5 個から構成されるナノクラスターが形成されることを確認した（図4）。合成したプラチナナノクラスターの吸収波長および発光波長のピークは各々380nm、450nm（図5）、蛍光寿命は 8.8 ナノ秒、また絶対量子収率は 18%であった。さらに、プラチナナノクラスターにより HeLa 細胞に免疫染色を施し、ガン細胞に発現するケモカインレセプターをバイオイメージングすることにも成功した（図6）。細胞毒性についても実験的に検証したところ、ラベリング 48 時間経過後も 90%以上の細胞が生きていることを確認した。

また、ナノマテリアルにより蛍光標識する際に生体分子の活性が阻害されない修飾法についての検討も行った。具体的には、抗体の抗原認識部位とは無関係な位置に存在するジチオール基を還元することで、チオール基を活性化させ、アミノ基で修飾した半導体量子ドットと結合させることを行った。作製

した分子プローブをガン細胞へ投与したところ、ガン細胞に特異的に発現する受容体タンパク質を選択的に蛍光標識できることを蛍光イメージングにより明らかにし、抗体の活性が維持されることを確認した。

（3）ナノポジショニング計測の確立

生体分子のカイネティクスをナノメートルスケールで計測する手法の確立を目指し、生体分子を標識する半導体量子ドットなどナノマテリアルの位置計測を高感度・高精度に行う光学系の設計および試作を行った。暗視野光学系を照明系に採用し、半導体量子ドットなどからの蛍光を顕微光学系、ズームレンズによる拡大光学系、さらにイメージインテンシファイアを通して、4分割検出器上に蛍光像を結像した。とくに、拡大光学系により回折限界程度の蛍光像を拡大することで、位置計測の精度の向上を図るとともに、イメージインテンシファイアにより感度の向上を目指した。200nm 径の蛍光ビーズを試料とし、試作装置により位置計測を行ったところ、3.5nm の位置精度を実現した。また、半導体量子ドットでは 26nm の位置精度であった。タンパク質などの生体分子は 10nm 程度の大きさであることから、今後は、1 桁程度の精度向上を図る必要がある。光学系の最適化、迷光除去、光検出回路の雑音低減により精度向上を実現できると考えている。

上記以外にも、単一生体分子を高感度に測定可能とする大面積 SERS 基板の開発も行った。

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 S. Tanaka, J. Miyazaki, D. K. Tiwari, T. Jin, and Y. Inouye, "Fluorescent platinum nanoclusters: their synthesis, purification, characterization and application to bio-imaging," *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 431-435 (2011). 査読有
- ② H. Liu, L. Zhang, X. Lang, Y. Yamaguchi, H. Iwasaki, Y. Inouye, Q. Xue, and M. Chen "Single molecule detection from a large-scale SERS-active $Au_{79}Ag_{21}$ substrate," *Sci. Rep.* 1, 112 (2011). 査読有
- ③ S. Yoshioka, B. Matsuhana, S. Tanaka, Y. Inouye, N. Oshima, and S. Kinoshita, "Mechanism of variable structural colour in the neon tetra: quantitative evaluation of the Venetian blind

- model," J. R. Soc. Interface, 8, 56-66 (2011). 査読有
- ④ T. Jin, D. K. Tiwari, S. Tanaka, Y. Inouye, K. Yoshizawa, T. M. Watanabe, "Antibody-ProteinA conjugated quantum dots for multiplexed imaging of surface receptors in living cells," Molecular BioSystems, 6, 2325-2331 (2010). 査読有
- ⑤ D. K. Tiwari, S. Tanaka, Y. Inouye, K. Yoshizawa, T. M. Watanabe, and T. Jin, "Synthesis and characterization of anti-HER2 antibody conjugated CdSe/CdZnS quantum dots for fluorescence imaging of breast cancer cells," Sensors, 9, 9332-9354 (2009). 査読有
- ⑥ S. Kawata, Y. Inouye, and P. Verma, "Plasmonics for near-field nano-imaging and superlensing," Nature Photonics, 3, 388-394 (2009). 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① 森村皓之、田中慎一、石飛秀和、三上智之、蒲地雄介、近藤寿人、井上康志、"金ナノダイマーによる生体分子のダイナミクス計測"、第 59 回応用物理学関係連合講演会、2012. 3. 16、東京。
- ② Y. Inouye, "Fluorescing platinum nanocluster and its application to bio-imaging," International Symposium on Nano Photonics 2012, 2012. 2. 13, Beijing, China (招待講演)。
- ③ H. Morimura, S. Tanaka, H. Ishitobi, T. Mikami, Y. Kamachi, H. Kondoh, and Y. Inouye, "Nano-observation of biomolecular dynamics using Au nanoparticle dimers," International Symposium on Nano Photonics 2012, 2012. 2. 13, Beijing, China.
- ④ 井上康志、田中慎一、神隆 "蛍光性プラチナ・ナノクラスターの合成"、第 72 回応用物理学学会学術講演会、2011. 8. 31、山形。
- ⑤ S. Tanaka, J. Miyazaki, D. K. Tiwari, T. Jin, and Y. Inouye, "A Highly Fluorescent Platinum Nanocluster as a Bioimaging Probe," Molecular Plasmonics 2011, 2011. 5. 21, Jena, Germany.
- ⑥ S. Tanaka, H. Morimura, D. K. Tiwari, J. Miyazaki, T. Jin, and Y. Inouye, "Characterization of Fluorescence Properties of a Blue Emitting Au Nanocluster," PACIFICHEM 2010, 2010. 12. 18, Honolulu, Hawaii.
- ⑦ 井上康志、"プラズモニクス技術の分光学的基礎とセンサー・ナノバイオへの応用の

- 可能性"、オプトロニクス特別セミナー、2010. 11. 25、東京 (招待講演)。
- ⑧ 田中慎一、宮崎淳、D. K. Tiwari、神隆、井上康志、"蛍光性金ナノクラスターの開発及び生細胞観察への応用"、第 48 回日本生物物理学学会年会、2010. 9. 22、仙台
- ⑨ 井上康志、"近接場光学顕微分光法"、日本分光学会第 46 回夏期セミナー、2010. 9. 1、千葉 (招待講演)。
- ⑩ 井上康志、"ナノバイオフォトンクス"、フォトンクス技術フォーラム、光情報技術研究会合同研究会、2009. 11. 30、大阪 (招待講演)。
- ⑪ 井上康志、田中慎一、D. K. Tiwari、神隆、"蛍光性金属ナノクラスターの合成と蛍光イメージングへの展開"、第 70 回応用物理学学会学術講演会、2009. 9. 9、富山。
- ⑫ 井上康志、"近接場光学顕微鏡による分光測定"、日本分光学会第 45 回夏期セミナー 2009. 9. 2、千葉 (招待講演)。

[その他]

ホームページ:

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/Inoue/hp/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 康志 (INOUE YASUSHI)
大阪大学・生命機能研究科・教授
研究者番号: 60294047

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐甲 靖志 (SAKO YASUSHI)
理化学研究所・基幹研究所・主任研究員
研究者番号: 20215700

神 隆 (JIN TAKASHI)
理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー
研究者番号: 80206367