

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82502

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20507

研究課題名（和文）蛍光ナノダイヤモンドを用いた細胞内局所pH計測のための量子センシング技術の開発

研究課題名（英文）Development of Quantum Sensing Technology for pH Measurement in Intracellular Microenvironments Using Fluorescent Nanodiamonds

研究代表者

柳 瑶美 (Yanagi, Tamami)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学研究所・博士研究員

研究者番号：90911280

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では生命現象において局所的なpHの変化が重要な役割を果たすことの実証のため、蛍光ナノダイヤモンド（FND）を用いて細胞内局所pHをin situ計測する技術の確立を目指した。このために、低侵襲なODMR計測システムと、pH応答性を有しかつターゲティングの妨げとならないFND試料の開発を行った。まず、全光学T1強調ODMRイメージング技術の開発により、FND選択的なイメージングに成功した。また、生体親和性が高く非特異吸着が生じにくい親水性コーティングのFND試料の開発も実施した。これにより、FNDを用いて細胞内微小環境のpH変化を検出するための準備が整った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、細胞内の局所的なpHの変化が生命現象に重要な役割を果たすことが示唆されているが、その実証には生細胞中の局所pHをin situで観測しなければならない。QST五十嵐グループでは、FNDの表面電荷状態によってNVの縦緩和時間T1が変化する現象を利用し、微小空間内pHのリアルタイム計測を世界で初めて実現した(Fujisaku et al., ACS Nano 2019)。本研究により生細胞中の局所pHを観測するための技術の確立に近づいたことで、細胞内物理・化学パラメータの網羅的な解析に基づく生命の本質理解に貢献できたと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this project, we aimed to establish a technique for in situ measurement of pH in intracellular environments using fluorescent nanodiamonds (FNDs) to demonstrate that microenvironmental pH changes play an important role in biological system. For this purpose, we developed a less invasive ODMR measurement system and FND samples that are pH-responsive and do not prevent cellular and molecular targeting. First, we developed an all-optical T1-weighted ODMR imaging technique and succeeded in T1-based selective imaging of FNDs. We also developed FND with hydrophilic coating on the surface, which showed high biocompatibility and low nonspecific adsorption. With these results, we are now ready to detect pH changes in the intracellular microenvironment using FNDs.

研究分野：ナノバイオサイエンス

キーワード：NVセンター 全光学的計測 バイオイメージング in cells in vivo ex vivo

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内においてはオルガネラなど微小環境ごとの pH の違いによって、エネルギー産生や不要物の分解、翻訳後修飾などの生命現象が駆動すると考えられている。これら以外にも、アクチンの重合は pH 依存的に生じることが *in vitro* の実験で明らかとなっているなど、細胞の運動も局所的な pH 勾配によって駆動される可能性が唱えられ始めている。特にがん細胞では Na^+/H^+ 交換輸送体近傍の局所的な pH の低下が組織浸潤などに関与しているとする報告も近年になっ
てなされている (White et al., J. Cell Sci. 2017)。ただし、局所的な pH とこれら生命現象との関係を証明するためには、生細胞内の局所 pH を直接計測する必要がある。

2. 研究の目的

細胞内の pH を計測する方法としては pHrodo などの蛍光色素が従来は用いられてきた。ただし、このような蛍光色素では一定体積以上のプローブの集団から蛍光を取得する必要があるため、空間分解能が著しく制限される。また、光励起後は速やかに褪色が起こる。そのため、従来の方法で細胞内 pH について局所計測や経時変化の追跡を行うことは困難だった。

しかし近年、ナノダイヤモンド結晶中の蛍光格子欠陥である窒素-空孔中心(NVC)を用いた pH 計測が開発され注目されている (Fujisaku et al., ACS Nano, 2019)。NVC は 532 nm などの緑色励起光で 700 nm 程度の赤色蛍光を発するが、光学的に極めて安定なため褪色は起こらないことが知られている。このため、NVC を有する数十 nm のナノダイヤモンド 1 粒子から、蛍光計測に十分なフォトンを経済的に渡って安定して得ることができる。更に、周囲電荷と NVC の相互作用によって pH の計測が可能だが、その相互作用が生じる限界が数十 nm 程度であるため、FND 周辺の pH 変化を原理的には nm オーダーの空間分解能で検出することができる。ただし、生細胞への適用は開発途上にあるため、本研究ではその実現のため、生細胞中の局所 pH を観測する上で必要となる要素技術の確立を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、下記の 3 つの要素技術の確立を目指して研究を行った。

(1) 顕微鏡システムの開発

低侵襲で細胞内 pH 計測を行うために、pH 依存的な T1 の違いをコントラストの違いとして検出する全光学的な pH イメージングのパルスシーケンスを設計し実証を行う。

(2) ナノダイヤモンド試料の開発

細胞内のターゲティングが可能な生体親和性の高い蛍光ナノダイヤモンドプローブを開発する。

(3) 細胞内局所計測技術の開発

要素技術 1) および 2) を組み合わせて細胞内局所 pH 計測を行うための分子標的技術を開発する。

4. 研究成果

(1) 顕微鏡システムの開発

pH 依存的な T1 の違いをコントラストの違いとして検出するためには、光偏極が達成されるパルス幅のレーザーパルス列を用い、そのパルス列のインターバルは縦緩和が進行する長い(時定数程度)の時間とし、リファレンスには縦緩和がほとんど起こらないインターバルの短いパルス列を用いるといった方針が有効であることが明らかとなった。

(2) ナノダイヤモンド試料の開発

細胞内ターゲティングを効率よく行うために、分子サイズ(直径 5 nm)のナノダイヤモンドの調製方法を確立した。具体的には、爆轟法ナノダイヤモンドに対して 425 °C で 5 時間の大気酸化を行った後、1:3 の硝酸/硫酸の混酸中で 130 °C ・ 72 時間の熱処理を行い、更に水酸化ナトリウムで 90 °C ・ 2 時間の加水分解処理を行うことで、5 nm の単分散のナノダイヤモンドが取得可能であることを明らかにした。この手法は、爆轟法ナノダイヤモンドの単分散化に従来必要とされていた機械的な破碎を必要とせず、他元素の混入が低減された。また、本手法で調製されたナノダイヤモンドは、pH の変化に対してアグリゲーションを起こしにくかった。従って、pH 計測の目的にも適していると期待される。

(3) 細胞内局所計測技術の開発

細胞内局所 pH 計測を実現するために、単分散化したナノダイヤモンドを用いた分子標的技術の開発に着手した。現在、カルボキシ化した超分岐ポリグリセロールで爆轟法ナノダイヤモンドを

コーティングし、活性エステル化した上で特定のタンパク質の N 末端と架橋する方法を試みている。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Terada Daiki, So Frederick Tze Kit, Hattendorf Bodo, Yanagi Tamami, Osawa Eiji, Mizuochi Norikazu, Shirakawa Masahiro, Igarashi Ryuji, Segawa Takuya Fabian	4. 巻 4
2. 論文標題 A simple and soft chemical deaggregation method producing single-digit detonation nanodiamonds	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nanoscale Advances	6. 最初と最後の頁 2268-2277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d1na00556a	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鱧屋 隆博, 神長 輝一, 鈴木 智達, 柳 瑶美, 阿部 浩之, 大島 武, 五十嵐 龍治, 今岡 達彦
2. 発表標題 量子センサーを用いた細胞内温度測定法の構築に向けた研究
3. 学会等名 量子生命科学先端フォーラム 2021冬の研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳 瑶美, 鈴木 智達, 神長 輝一, 五十嵐 龍治
2. 発表標題 細胞膜融合性ベシクルによるエンドソームを介さない蛍光ナノダイヤモンドセンサー導入法の開発
3. 学会等名 量子生命科学先端フォーラム 2021冬の研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 蛍光検出装置及び蛍光検出方法	発明者 五十嵐龍治, 柳瑶美, 神長輝一	権利者 QST
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/ 24792	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 蛍光検出装置及び蛍光検出方法	発明者 五十嵐龍治, 柳瑶美, 神長輝一	権利者 QST
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/ 24793	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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			
スイス	ETH Zurich			