

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657101

研究課題名(和文)細胞分子挙動観察のための蛍光性シリコンナノ結晶の開発と応用

研究課題名(英文)Development of biocompatible fluorescent silicon nanocrystals for fluorescence cell imaging

研究代表者

楠見 明弘(Kusumi, Akihiro)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授

研究者番号：50169992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光顕微鏡観察、特に1分子蛍光観察の限界は、蛍光プローブにあった。とりわけ、以下の3つの問題、(1)大きい(量子ドットとGFP)、(2)退色する(量子ドットでさえ数分)、(3)点滅する(特に、GFPと量子ドット)の早急な解決が必要であった。本研究では、生物医学の分野ではほとんど注目されてこなかったシリコンナノ結晶に注目し、300分以上退色もブリンクもせず、大きさも1~4nm程度に収まる生医学応用のためのシリコンナノ粒子を開発した。表面親水化、1個のナノ結晶に1個のタンパク質を結合させる方法の開発にも成功し、細胞膜上の受容体1分子を今までより10倍以上長く追跡することが可能になった。

研究成果の概要(英文)：Fluorescence microscopy is used extensively in biomedical research, but it is often plagued by three major problems with the presently available fluorescent probes: photobleaching, blinking, and large size. We have developed biocompatible, fluorescent silicon nanocrystals (SiNCs), with special attention to single-molecule imaging. Methods for producing SiNCs by simple chemical etching, for hydrophilically coating them, and for conjugating precisely 1 SiNC to 1 protein molecule were developed. Single SiNCs neither blinked nor photobleached during a 300-min overall period observed at video rate. Single receptor molecules in the plasma membrane of living cells were imaged for 10 times longer than with other probes, making it possible for the first time to observe the internalization process of receptor molecules at the single-molecule level. Micron-scale spatial variations of molecular diffusivity, i.e., a higher level of domain mosaicism in the plasma membrane, were revealed.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：応用光学・量子光工学 複合材料・物性 マイクロ・ナノデバイス 量子ドット シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

蛍光顕微鏡観察、特に1分子蛍光観察の最大の限界は、蛍光プローブにあった。とりわけ、以下の3つの問題、

- (1) 大きい(量子ドットと GFP)
  - (2) すぐに退色する(量子ドットでさえ数分)
  - (3) ブリンキングする(点滅する; 特に、GFPと量子ドット)
- の早急な解決が必要であった。

シリコンナノ結晶 (silicon nanocrystal = SiNC) が光を発することは、1990年代後半から知られており、新しくない。粒子径を変えることによって、発光波長を変えられることもわかっていった。しかし、SiNC が発光する機構、大きさと波長の関係、表面処理と蛍光パラメータとの関係などは、文献によって大きく異なっており、また応用も進展していなかった。いわば、消え去りつつある材料だった。

一方、SiNC は退色しにくいことを示唆するいくつかのデータがあった。我々は、褪せしないことは、生物への応用、特に1分子追跡には極めて重要な性質であり、これが実用化できれば素晴らしいと考えて研究を始めた。

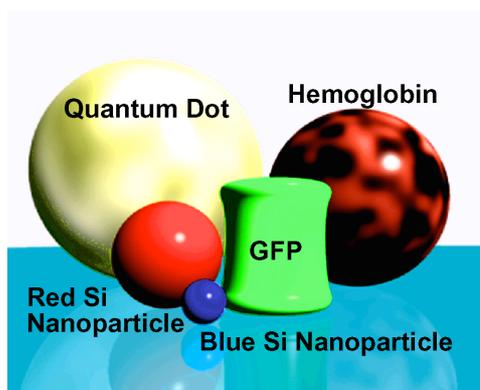


図1：蛍光プローブのサイズ比較(流体力学的直径)。SiNCはGFPやヘモグロビンよりも小さく、また、量子ドットよりもはるかに小さい。

青色 B-SiNC:	≈	0.8 nm (予備実験済み)
赤色 R-SiNC:	≈	4.1 nm
GFP:	≈	5.5 nm
ヘモグロビン:	≈	6.4 nm
量子ドット:	≈	15 nm

我々のパイロット研究で、シリコン単結晶ウェーハーから簡単な化学エッチングによって赤色蛍光を発する SiNC (R-SiNC) 作製

することに成功した。さらに、一通りの表面親水化を実施し、水溶液中で分散させることにも成功した。さらに、世界で初めて SiNC の蛍光顕微鏡下での1粒子観察に成功した。これによって初めて、各 SiNC 粒子が、退色もブリンキングもほとんどしないことがわかったのである。これらの結果は、萌芽的なものであったが、SiNC の実用化に挑戦して成功したら、これは、生細胞の長期蛍光標識観察、特に、生細胞中での1分子追跡に革新的変化を起こしうる。すなわち、「挑戦的」萌芽、という本種目の趣旨に極めてふさわしかった。また、これらの鍵となる初期実験は、すべて、我々が、パイロット研究で行ったことであり、我々が開発しつつある SiNC は極めて新規であり、独創性が高いと言えた。

## 2. 研究の目的

最近、私たちは、「1. 研究開始当初の背景」の最初の段落に記述した3つの問題を一気に解決し得るプローブの予備的開発に成功した。これは、新たに開発した直径 4 nm の赤色蛍光を発する SiNC で、CdSe 型の量子ドットとは全く異なる。

本研究は、SiNC の実用化、特に1分子イメージングへの応用の実用化を目的とする。具体的には以下を行う。

- (1) SiNC を、通電をおこなわずに作製する方法の開発
- (2) SiNC の表面親水化法の開発
- (2) SiNC への生体分子の結合法の開発
- (3) SiNC のシェルライフの長期化法の開発
- (4) SiNC を用いた細胞膜分子の1分子長期観察がどこまで可能かの検証

## 3. 研究の方法

我々の開発してきた1分子イメージング顕微鏡ステーションを用いて、SiNC の観察をおこない、作製した SiNC の蛍光発光を、1粒子毎に追跡した。SiNC の基礎的な物性は、SiNC をカバーガラスに結合させて1粒子観察することで求めた。

## 4. 研究成果

- (1) SiNC を、通電をおこなわずに作製する方法の開発

化学エッチングのよって作成する方法を開発した。

- (2) (3) SiNC の表面親水化法と、そこへの生体分子の結合法の開発

次頁の最初の図2に示すような方法を用いて成功した。

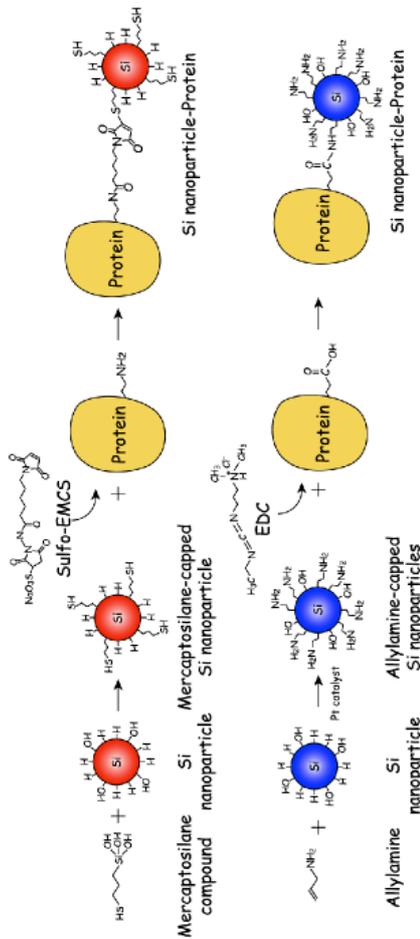


図 2: SiNC の親水化とタンパク質標識法

図 2 に示した方法を用いて、表面の親水化に成功した。さらに、タンパク質としてトランスフェリンを用い、HPLC で精製することで、1 個の SiNC 粒子に、正しく 1 分子のトランスフェリンを結合させることに成功した。このとき、平均値として、SiNC 粒子をトランスフェリンに 1 : 1 となるように結合させたのではないことに注意(この条件だと、実際には、1 個のトランスフェリン分子に、0, 1, 2, 3... 個の SiNC 粒子が結合したものが混ざる)。

### (3) SiNC のシェルフライプの長期化法の開発

トルエン中で保管し、使用直前に、メタノールで洗い、つぎに、溶媒を徐々に水に置き換えることで、3 ヶ月以上の保管が可能になった。

### (4) SiNC を用いた細胞膜分子の 1 分子長期観察がどこまで可能かの検証

上の (2) で述べた、トランスフェリンに SiNC を結合させた複合体を、生細胞とインキュベートした。これは、トランスフェリン受容体に結合し、Cy3 で標識したトランスフェリンが結合した受容体と、全く同じような拡散運動をした。その結果、1 分子のトランスフェリン受容体を、90 秒程度にわたって観察し続けることができた。

さらに、1 分子を観察し続けることで、細胞膜が場所によって、トランスフェリン受容体の運動を変化させること、また、1 分子の受容体が細胞質内に取り込まれる瞬間、が観察できた。これは、1 個の分子を長時間観察できるようになって、初めて可能となった。

### 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 8 件)

- ① N. Yoshikawa, H. Hirori, H. Watanabe, T. Aoki, T. Ihara, R. Kusuda, C. Wolpert, T. K. Fujiwara, A. Kusumi, Y. Kanemitsu, and K. Tanaka, Biexciton state causes photoluminescence fluctuations in CdSe/ZnS core/shell quantum dots at high photoexcitation densities, *Physical Review B*, 査読有、Vol. 88, 2013, pp. 155440, 1-5, DOI:10.1103/PhysRevB.88.155440
- ② H. Nishimura, K. Ritchie, R. S. Kasai, M. Goto, N. Morone, H. Sugimura, K. Tanaka, I. Sase, A. Yoshimura, Y. Nakano, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi, Biocompatible fluorescent silicon nanocrystals for single-molecule tracking and fluorescence imaging, *Journal of Cell Biology*, 査読有、Vol. 202, 2013, pp. 967-983, DOI:10.1083/jcb.201301053
- ③ A. Kusumi, T. K. Fujiwara, R. Chadda, M. Xie, T. A. Tsunoyama, Z. Kalay, R. S. Kasai, and K. G. N. Suzuki, Dynamic organizing principles of the plasma membrane for signal transduction: Commemorating the fortieth anniversary of Singer and Nicolson's fluid-mosaic Model, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 査読有、Vol. 28, 2012, pp. 215-250, DOI:10.1146/annurev-cellbio-100809-151736
- ④ A. Kusumi, T. K. Fujiwara, N. Morone, K. J. Yoshida, R. Chadda, M. Xie, R. S.

Kasai, and K. G. N. Suzuki, Membrane mechanisms for signal transduction: The coupling of the meso-scale raft domains to membrane-skeleton-induced compartments and dynamic protein complexes, Seminars in Cell and Developmental Biology, 査読有、Vol. 23(2)、2012、pp.126-144、DOI:10.1016/j.semcd.2012.01.018

- ⑤ A. Kusumi, K. G. N. Suzuki, R. S. Kasai, K. Ritchie, and T. K. Fujiwara, Hierarchical meso-scale domain organization of the plasma membrane, Trends in Biochemical Sciences, 査読有、Vol. 36, 2011, pp. 604-615, DOI:10.1016/j.tibs.2011.08.001
- ⑥ Z. Kalay, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi, Cytoskeleton-induced meso-scale domains, Cellular Domains, 査読有、2011, Chapter 1, pp. 3-22, DOI:10.1002/9781118015759.ch1

[学会発表] (計 11 件)

- ① 楠見 明弘, Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: single-molecule tracking studies, Departmental Seminar, Dept. of Physiology, University of Otago, 2012 年 11 月 26 日、University of Otago (ニュージーランド)
- ② 楠見 明弘, Organizing principles of the plasma membrane: Three-tiered hierarchical meso-scale domain architecture revealed by single-molecule tracking, Joint Summer Research School in Nanomedicine, 2012 年 8 月 2 日、慶應義塾大学 (東京)
- ③ 楠見 明弘, Signal transduction of GPI-anchored receptors based on dimerization and raft-lipid interaction, The 105<sup>th</sup> International Titisee Conferences, 2012 年 3 月 29 日、Treschers Schwarzwaldhotel am See (ドイツ)
- ④ 楠見 明弘, Lipid-Stabilized Dynamic Homo-Dimers of GPI-Anchored Receptors Convert into Oligomeric Signaling Clusters, The 51st Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2011 年 12 月 3 日、Colorado Convention Center (アメリカ)
- ⑤ 楠見 明弘, Organizing principle of the plasma membrane: three-tiered meso-scale domain architecture revealed by single-molecule tracking, The 8th European Biophysics Congress, 2011 年 8 月 27 日、Eotvos Lorand University (ハンガリー)
- ⑥ 楠見 明弘, Raft-facilitated protein

interactions for signal transduction as revealed by single-molecule imaging, The 30th Naito Conference “Membrane Dynamics and Lipid Biology [II]: Domains, Droplets and Diseases”、2011 年 6 月 29 日、シャトレーゼ ガトーキングダム サッポロ (北海道)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.nanobio.frontier.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠見 明弘 (KUSUMI, Akihiro)  
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授  
研究者番号：50169992

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：