

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25600127

研究課題名(和文)イオンコンダクタンス顕微鏡を用いた細胞膜揺らぎの定量イメージング技術の開発

研究課題名(英文)Development of scanning ion-conductance microscopy for quantifying cell membrane fluctuation

研究代表者

岡嶋 孝治 (OKAJIMA, TAKAHARU)

北海道大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：70280998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)は、細胞膜の形状を精密に計測できる強力な装置である。本研究では、SICMを用いて細胞膜表面揺らぎの定量計測法を開発した。マイクロパターン基板技術により細胞骨格構造を制御した接着細胞を用いて細胞膜揺らぎ量と細胞骨格構造との関係を調べた。これは、金薄膜基板のガラス表面上に細胞をパターンニングすることで実現した。実験の結果、細胞パターンニングと細胞膜揺らぎの空間特性との間には顕著な相関が見られないことが分かった。また、イオン電流曲線のリアルタイムサンプリングを実現し、走査速度とイオン電流曲線との関係を実験的に明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Scanning ion-conductance microscopy (SICM) is a powerful tool for imaging topography of cell surfaces without their deformation at a high spatial resolution. The aim of this study is to develop SICM that enables us to quantify membrane fluctuations of adherent cells. Using micro-patterned substrates that enable to control cytoskeletal structures of cells, we investigated how the fluctuation of apical cell membrane is associated with the cytoskeletal structures. The micro-patterned substrate was fabricated on transparent glass substrate, so that the substrate allows us to obtain fluorescent image of intracellular structures. The results show no clear relationship between the cell membrane fluctuation and the actin filamentous structures of micro-patterned cells. Moreover, we investigated the scan speed dependence of ion-distance curves.

研究分野：細胞生物物理

キーワード：イオンコンダクタンス顕微鏡 細胞膜 揺らぎ

1. 研究開始当初の背景

細胞は、大別して、細胞内部とそれを覆う細胞膜からなる。そして、これらの力学特性は、細胞運動や細胞分裂等の様々な細胞機能と密接に関係していると考えられている。申請者等は、微細加工基板を用いた新規な原子間力顕微鏡 (AFM) 技術を開発し、細胞内部の力伝播、細胞内部の粘弾性の統計解析の直接計測に初めて成功した。一方で、真核細胞の細胞膜のナノ力学物性の研究は、計測方法の欠如により極めて少ない。最近、申請者等は、イオンコンダクタンス顕微鏡 (Scanning Ion Conductance Microscopy: SICM) を用いた細胞膜揺らぎの直接計測法を開発し、真核細胞の膜揺らぎの空間分布の計測に成功した (論文投稿中)。そして、本技術と微細加工基板技術を融合させることにより、より細胞膜揺らぎの高精度・高分解能イメージングが可能になるという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、(1)イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) を用いた細胞膜揺らぎイメージング法を開発し、(2)マイクロパターン基板技術により細胞骨格構造を制御した接着細胞を用いて、細胞膜揺らぎ量と細胞骨格構造との関係を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

SICM による細胞膜揺らぎイメージング法を開発する。要素技術として、1) FPGA を用いた高速イオン電流マッピング法の開発、2) マイクロコンタクトプリント法による細胞形状・構造制御法の制御法の開発、3) 単一細胞・複数細胞のパターン化とその特性評価を行い 4) SICM 法を確立した。

4. 研究成果

過去の研究において、市販の SICM を用いた。市販 SICM はイメージングに特化しているため、細胞膜揺らぎ量等の物性計測には適さない。そこで、細胞物性計測に適したイオン電流曲線を精密計測可能な SICM を自作した (図 1)。本体は、ファラデーケージに入っており、粗動と微動走査機構をもつ。精密 XY ステージ上にサンプルを装着し、プローブを上下させることにより、イオン電流を測定することができる。本装置を既存の倒立型光学顕微鏡に装着し、測定対象となる細胞を光学顕微鏡観察できる。

粗動・微動走査および信号検出は、全て、FPGA システムを用いて行った。また、広帯域の精密電流電圧変換装置を用いて、数 kHz 程度で pA から fA の微弱なイオン電流測定を行うことができる。これにより、イオン電流曲線のリアルタイムサンプリングが実現し、走査速度とイオン電流曲線との関係を調べることが可能になった。

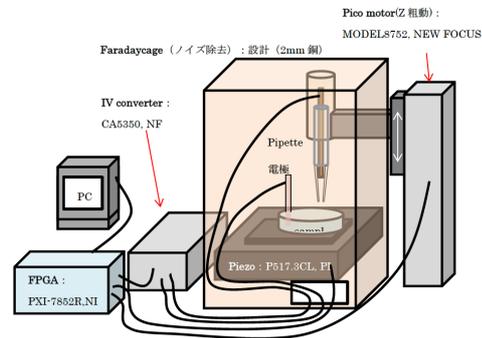


図 1 自作したイオンコンダクタンス顕微鏡の概念図。

イオン電流曲線は、半定量的に次の式によりフィットすることができる： $I(z) = I_{sat} (1 + |z|)^{-1}$ 。ここで、 z は探針表面間距離。 I_{sat} は、遠方における電流値である。 I はイオン電流曲線の特徴を表す変数である。

図 2 は、 I の走査速度依存性を示す。溶液はリン酸緩衝液であり、基板は PDMS 基板である。図 2 に示すように、走査速度の増加に対して、 I が単調に増加することが分かった。このことは、イオン曲線が走査速度に依存することを示唆している。

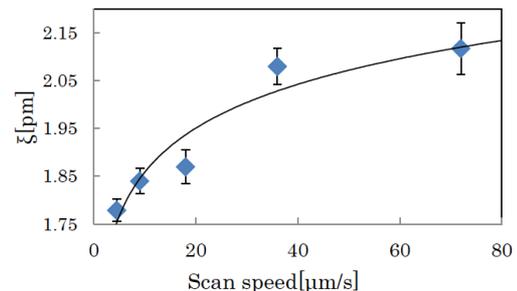


図 2 走査速度に対する I の値

図 3 はサンプルとピペットを十分に離れた場合の速度依存性の結果を示している。青色はピペットから十分に離れた位置、赤色はサンプル表面近傍での、走査速度を変化させた場合のアプローチと退避によるイオン電流曲線の差 ΔI_D を示している。 ΔI_D はアプローチと退避のそれぞれの位置での差の平均値である。図 3 から、ピペットがサンプルから十分に離れた場所におけるイオンカーブにおいても速度の増加に伴い、アプローチ時にイオン電流値が初期値より小さくなり、退避時に大きくなる傾向があることが分かる。

本実験から、ナノピペット先端へのイオン電流の流入および流出がピペットと溶媒との相対運動に強く依存することが分かった。

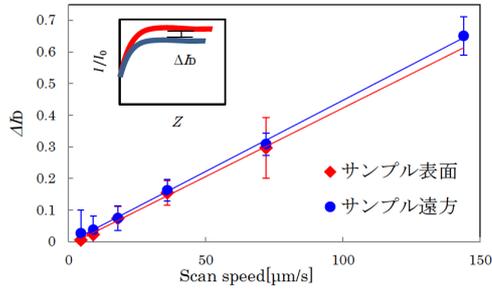


図3 アプローチと退避によるイオン電流曲線の差 ΔI_D の走査速度依存性。(青)ピペットから十分に離れた位置。(赤)サンプル表面近傍。走査速度を変化させた場合の ΔI_D を示している。 ΔI_D はアプローチと退避のそれぞれの位置での差の平均値である。

次に、マイクロパターン基板技術により細胞骨格構造を制御した接着細胞を用いて細胞膜揺らぎ量と細胞骨格構造との関係を調べた。1辺 $30\ \mu\text{m}$ の正方形のパターンを作成した。図4に示すように、これは、金薄膜基板のガラス表面上に細胞をパターンングすることで実現した。

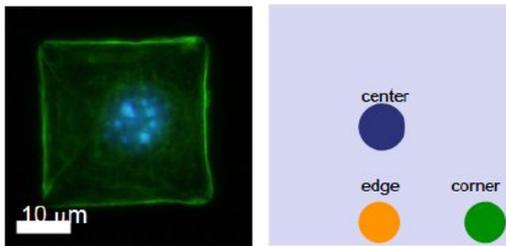
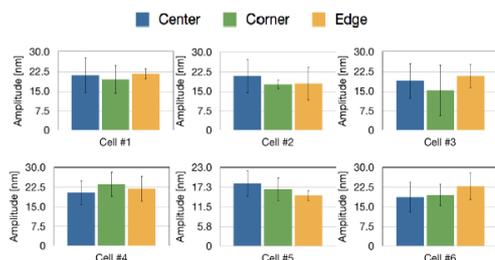


図4 正方向のマイクロパターン上に播種したマウス線維芽細胞:(左)免疫染色像、(右)SICMの測定場所。

測定場所として、パターンの中心(center)、辺(edge)および角(corner)を選択した。そして、SICMを用いて、それらの位置における、細胞膜揺らぎ量を測定した。実験結果を図5に示す。ここでは、6つの異なる細胞の測定結果を示している。ほとんどの細胞に対して、細胞パターンングと細胞膜揺らぎの空間特性との間には顕著な相関が見られないことが分かった。

図5 マイクロパターン上に播種したマウス線維芽細胞の細胞膜揺らぎ量の位置依存



性。

上述の結果は、細胞接着による生じる細胞骨格構造変化が細胞上部の細胞膜のダイナミクスに直接影響を及ぼさないことを示唆する。

以上のように、SICMを用いて、細胞膜揺らぎ量を単一細胞レベルで測定した。細胞間接着がない単一細胞では、細胞膜の揺らぎは空間的に均質であることが分かった。

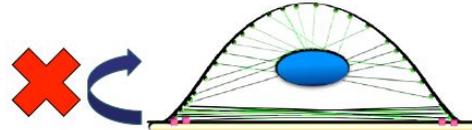


図6 細胞下部の接着形態は細胞上部の細胞膜揺らぎに影響しない。

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 1件)

岡嶋孝治, 走査プローブ顕微鏡による細胞物性測定: 原子間力顕微鏡とイオンコンダクタンス顕微鏡(総説)、化学工業 64(8), 612-617(2013)

〔学会発表〕(計 5件)

石倉禪*, 水谷祐輔, Myung-Hoon Choi, Sang-Joon Cho, 岡嶋孝治, イオンコンダクタンス顕微鏡によるコンフルエント上皮細胞の膜揺らぎの定量化(第52回日本生物物理学会年会(札幌コンベンションセンター), 2014.9.25-27,札幌)

西藤祐貴*, 石倉禪, 岡嶋孝治, イオンコンダクタンス顕微鏡のイオン電流曲線の解析(2014年 第61回応用物理学会春季学術講演会(青山学院大学), 3/17-20, 神奈川)

岡嶋孝治, 細胞の物理学: 走査プローブ顕微鏡によるアプローチ、表面科学会東北北海道支部学術研究会(北海道大学)(2015.3.9-10, 札幌)

Z. Ishikura*, K. Kuribayashi-Shigetomi, Y. Mizutani, Y. Fujii, M.-H. Choi, S.-J. Cho, T. Okajima, Spatial dependence of membrane fluctuations of cells on micro-patterned substrates measured by scanning ion conductance microscopy, 12th International Conference on Atomically Controlled Surfaces, Interfaces and Nanostructures (ACSIN-12)/21st International Colloquium on Scanning Probe Microscopy(ICSPM21) (Tsukuba convention center) (2013. 11.4-8, Tsukuba)

石倉禪*，水谷祐輔，繁富(栗林)香織，藤井裕紀， Myung-Hoon Choi, Sang-Joon Cho, 岡嶋孝治，単一細胞膜揺らぎ計測のためのイオンコンダクタンス顕微鏡技術の開発，（第 51 回日本生物物理学会年会（京都国際会館），2013.10.28-30,京都）

〔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 件)

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

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ist.hokudai.ac.jp/labo/cell/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡嶋 孝治 (OKAJIMA TAKAHARU)

北海道大学情報科学研究科

研究者番号：39522661

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

末岡和久 (SUEOKA KAZUHISA)

北海道大学情報科学研究科

研究者番号： 60250479