

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料  
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成 26 年度採択分

平成 29 年 5 月 31 日現在

研究課題名（和文） **金属ナノ粒子による細胞内分子イメージングに関する研究**

研究課題名（英文） **Molecular imaging of living cells with metallic nanoparticles**

課題番号：26000011

研究代表者

**河田 聡 (KAWATA SATOSHI)**

有限会社セレンディップ研究所・主任研究員、大阪大学大学院名誉教授



研究の概要：ナノレベルで生体細胞のような3次元試料内部を観察する光学顕微鏡の開発をすることを目的とする。光の回折限界によって制限される分解能を、プラズモニクスを利用して克服する。金属ナノ粒子をプローブとして、細胞内部を走査し、その近傍の数 nm に存在する生体分子の相互作用や、環境の変化をセンシングする。

研究分野：ナノフォトニクス

キーワード：ナノフォトニクス、プラズモニクス、ナノイメージング、バイオイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

マテリアルサイエンス、バイオサイエンス、有機化学、電子デバイスなどの分野において、物質をナノレベルで画像観察し物質識別・分析する技術の重要度は増している。

顕微観察する手法として、光学顕微鏡とくにレーザー走査顕微鏡は、3次元試料の内部構が観察できること、光のエネルギーが少ないために試料へのダメージが少ないこと、大気中、水中で観察できることなどの利点があり、現在でも広く使われている。

しかしながら、光学顕微鏡は光の波長が長いためナノレベルの構を観察できないことが欠点であった。この光の回折限界を克服する光学顕微鏡の開発は、研究代表者の学生以来の科学者としての人生目標であり、これまで、(1)数理的な逆問題の数理解法、(2)非線形分光学を用いた超解像、(3)局在化モードの表面プラズモンを用いた近接場顕微鏡によって、これらの問題の解決に当たってきた。

近年、非線形分光学(2光子吸収、誘導放出、過飽和吸収、蛍光分子の局在化を駆使して、光の回折限界を超える「超解像顕微鏡」の研究開発が進んでいるが、これらはすべて生体試料を蛍光色素(あるいは蛍光蛋白分子)で染色して観察する手法であり、生きたままの生体細胞のナノ観察ではなく、その応用は

限定される。

### 2. 研究の目的

研究代表者が1992年に発明した表面プラズモンポラリトンを活用した近接場顕微鏡は、ナノメートルレベルの光学イメージングを可能とするため、特に最近多数の研究者が参入しているが、これは表面観察顕微鏡であり、試料内部を観察することができない。

本研究計画では、最先端光学顕微鏡における上記2点の相補的な長所欠点を解決する「3次元・ナノ・分析・光学」顕微鏡を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、細胞の表面ではなく内部をナノスケールの空間分解能で観察できる顕微鏡を開発する。原理的には金属ナノ粒子をプローブとして用い、それを細胞内に導入し、走査する。細胞内部に導入した金属ナノ粒子を、細胞内の分子分析や環境モニタリングを行う、ナノ内視鏡として活用する。

研究代表者らがこれまで培ってきた、プラズモニクス、非線形分光学、一分子計測の発想を加え、細胞内を高い空間分解能かつ、分光分析する手法の確立を目指す。

#### 4. これまでの成果

(1) 機能性金属ナノプローブの開発  
細胞内に導入し、生体分子の検出や環境センシングのためのプローブとして用いる金属ナノ粒子の開発に取り組んだ。金属ナノ粒子に光を局在させることで、分子の振動エネルギーに起因するラマン散乱光を著しく増強して検出することが可能になる。我々は金属の材質・サイズ・形状を制御し、可視光領域の励起を用いた場合に、任意の励起波長において、効率よくラマン散乱光を増強する金属ナノ粒子の合成に成功している。(図1) また、ATP や pH などの細胞内部の特定の指標を検出するために、金属ナノ粒子表面に化学的修飾を行い、機能化することにも成功している。

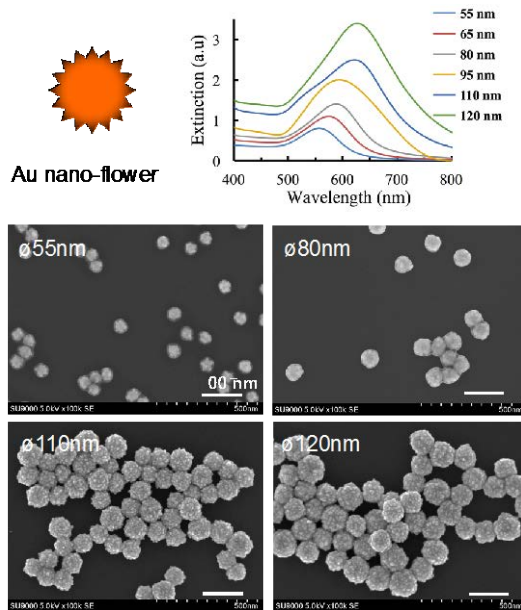


図 1 合成した金属ナノ粒子の一例。Au nano-flower の吸光特性を示すスペクトルと SEM 像。サイズ毎に異なる光学特性を示す。

ATP センシングのための金属ナノ粒子の場合、ATP 合成タンパク質である ATP 合成酵素の  $\epsilon$  サブユニットを採用した。この  $\epsilon$  サブユニットは予めアルキルタグで標識されたものを使用した。金属ナノ粒子に結合したこのタンパク質は、周囲の ATP の濃度に依存して構造を大きく変化させる。この構造変化によってアルキル由来のラマン散乱強度が変わることから ATP のセンシングが可能となる。

(2) 細胞内 3D ナノ分光イメージングのための顕微鏡開発と細胞内観察  
細胞内部に導入した、金属ナノ粒子を 3 次元的に追跡しつつ、近傍の分子から増強されたラマン散乱光を同時に計測する装置の開発を行った。また、その装置を用いて細胞内部の生体分子 3 次元ナノイメージングに成功している。金属ナノ粒子は細胞内の輸送機構によって輸送される。その過程で相互作用する生体分子をナノスケールの空間分解能で検出した。(図2)

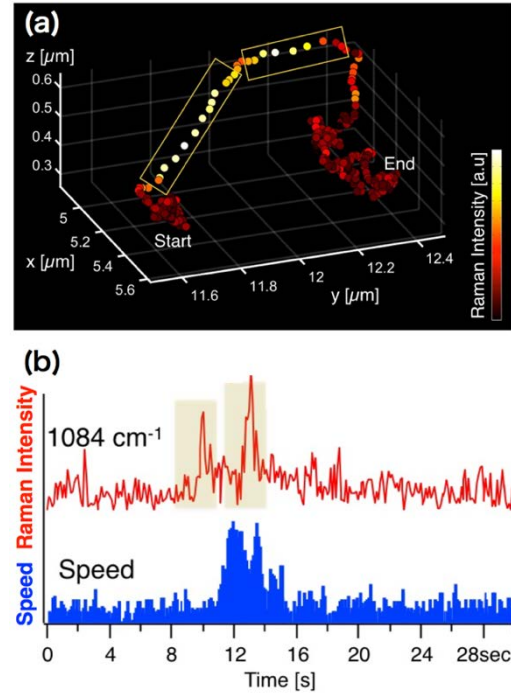


図 2 (a)細胞内部に導入した金属ナノ粒子の軌跡。色の違いは  $1084\text{cm}^{-1}$  に相当する分子振動モードのラマン散乱光の強度の違いを表す。(b)  $1084\text{cm}^{-1}$  に相当するヒスチジン・リン酸の分子振動モードの時間ごとの強度変化とナノ粒子の速度変化。金属ナノ粒子が加速する直前でラマン散乱光の強度が増強する様子が観察された。図は発表論文 (1) より転用。

#### 5. 今後の計画

- (1) 合成した機能性金属ナノ粒子を細胞の内部に導入し、特定の分子や、環境のセンシング・イメージングを行う。
- (2) 金属ナノ粒子の構造・形状制御・表面修飾によるラマン散乱光の増強により、時間分解能を向上させ、最終的には数ミリ秒の時間分解能で細胞内部のナノスケールでのダイナミクスの観察に応用する。

#### 6. これまでの発表論文等

- (1) K. Bando, N. I. Smith, J. Ando, K. Fujita, and S. Kawata, "Analysis of dynamic SERS spectra measured with a nanoparticle during intracellular transportation in 3D," *J. Opt.*, 17, (11), 114023 (2015).
- (2) R. Watanabe, N. Soga, M. Hara and H. Noji, "Arrayed water-in-oil droplet bilayers for membrane transport analysis", *Lab on a Chip*, 16, 3043-8, (2016).
- (3) S. Kawata, T. Ichimura, A. Taguchi and Y. Kumamoto, "Nano-Raman scattering microscopy: Resolution and enhancement", *Chem. Rev.*, 117 (7), 4983–5001 (2017).

ホームページ等

- <http://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp/>
- <https://serendip.themedia.jp/>
- <http://www.nojilab.t.u-tokyo.ac.jp/>