

走査型イオン伝導顕微鏡の高安定な ナノバイオイメージング法の開発

[1] 組織

代表者：牛木 辰男

(新潟大学大学院 医歯学総合研究科)

対応者：岩田 太

(静岡大学電子工学研究所)

分担者：

中島 真人(新潟大学大学院 医歯学総合研究科)

平田 惇(静岡大学工学部)

江口由祐(静岡大学大学院 工学研究科)

[2] 研究経過 (以下10.5ポイント)

近年、医学や薬学などのバイオ分野の研究において生きた生体試料の構造や機能を観察することが不可欠な要素となっている。これらの研究において走査型プローブ顕微鏡の一つである走査型イオン伝導顕微鏡 (Scanning Ion Conductance Microscope : SICM) は生きたまま生体試料を観察できるイメージングツールとして注目を集めている。SICMではプローブとして数十nm程度の開口を有するナノピペットが用いられる。ナノピペット先端と細胞表面との距離で変化するイオン電流を検出し距離制御を行うことでナノピペットを細胞に接触させることなく表面観察が可能である。しかしながら実際の生体試料は液中においてゼータ電位により、表面に帯電を持つことが知られている。SICM測定の際にはプローブが試料表面の非常に近いところまで接近するため、走査中のイオン電流検出や形状像取得への影響が考えられる。例えば強い負の帯電を持つ染色体の場合、ナノピペット電極の符号によっては測定が困難なことが知られている。

本研究では液中において帯電の大きい試料(染色体など)の観察におけるメカニズムや帯電試料の観察中のイオン電流変化について調べ、SICM測定にどのような影響を及ぼしているのかについて調べる。またこれらの知見より表面帯電の影響を受けない測定法を開発することを目的として研究を行った。

本プロジェクトは、本年度が初年度であった。これまで走査型プローブ顕微鏡を開発してきており、

ナノバイオ応用へ展開するために試料と探針の相互作用の小さいSICMの開発を行うに至った。そこで、本プロジェクトでは、これまでの成果を踏まえながら、SICMを用いたバイオイメージングに関する研究を展開した。

以下、研究活動状況の概要を記す。

[3] 成果 (以下10.5ポイント)

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

SICMの構築と帯電表面におけるイオン電流特性の評価

・SICMの原理と構築

SICMでは開口径数十nmのナノピペットをプローブとして用いる。電極をピペット内部と外部に挿入し、電圧を印加するとナノピペット開口をイオン電流が流れる。このイオン電流はナノピペット-試料間距離に依存している。ナノピペットが試料表面へとアプローチしていくとナノピペット開口が試料表面によって閉塞されることによりイオン電流が減衰していく。このイオン電流を検出することで距離制御を行い、試料表面の形状像を取得することが可能である。SICMの測定方法として、ナノピペットを試料から十分に離れた場所から振り下ろし、イオン電流が閾値よりも減衰した時点での高さ情報を1画素ずつ取得して画像化を行う方法をバックステップモードという。これにより起伏の激しい試料に対してナノピペットが試料と接触することなく走査可能となる。本研究ではこの手法を用いている。本年度はSICMの装置を構築した。以下詳細を述べる。ナノピペットは圧電素子に取り付けて、Z軸の上下運動を行い、試料はフラットスキャナ(XYストローク:70μm)上に搭載して走査する機構とした。測定するシーケンスとしては、あらかじめナノピペットが試料から十分離れた位置でイオン電流をPCによって読み込み、閾値を設定し、その後、マイコンを搭載した信号出力器(自作予定)によりナノピペットに取り付けられた圧電素子へと三角波を印加することで、ナノピペットの振り下しと引き上げを行った。イオン電流と閾値はコンパレータによって比較

され、ナノピペットが試料まで接近しイオン電流が減衰するとコンパレータから TTL が出力され、アプローチを停止した。この時のナノピペットの高さ情報を試料表面形状として、PC で検出し、画像化した。

・帯電試料の画像測定

本研究にて用いる帯電試料として、強い負のゼータ電位を有する染色体を使用した。染色体は SICM 測定では表面の帯電の影響を強く受けて、形状像の観察が困難であることがこれまでの研究にて知られている。本研究ではこのメカニズムについて詳しく調べるためにバイアス符号を変えてイメージング実験を行い、その関係を明らかにした。

・アプローチカーブの取得とアプローチ電流像測定法の開発

プローブを試料表面に垂直方向にアプローチする際、その電流の変化は原理的には単調に減衰すると考えられているが、ゼータ電位による帯電が強い試料表面においては明らかにされていなかった。本研究ではゼータ電位が大きく帯電の強い染色体表面と一般的な細胞表面(HeLa 細胞など)の上でのアプローチカーブを取得および比較し、その特性の違いと画像化の可否の関係を明らかにした。またこのアプローチの際の電流変化(X-Z面)を取得し、画像化できる測定技術を開発することにより、SICM 測定中の垂直面の電流分布図を評価することで帯電表面上におけるイオン濃度を評価し、依存性のある画像を取得した。

・C-Vカーブの取得

帯電表面近傍にピペット先端を位置決めした際、表面上にて電圧を掃引し、その際の電流を測定する電流電圧特性(C-Vカーブ)を取得することで、帯電表面におけるイオン電流のピペット電位依存性を評価した。その結果、正と負の電位では異なる電流の振舞を測定し、帯電試料との相関に関する知見を得た。

表面帯電状態における試料表面の影響を受けない安定測定法の開発

上記において構築した SICM を用いて取得した帯電表面における測定結果より得られた知見より、帯電状態に依存しない顕微測定法を開発した。まずは、帯電の符号により、ピペットバイアスを適切に設定するための方法について検討した。また交流バイアスを用いた新規な測定法を開発し、帯電の符号に依存しない測定法を実現した。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究では液中のゼータ電位に伴う SICM 測定の影響に関する基礎的な問題に取り組む内容を含むものであり、帯電が及ぼす試料表面近傍のイオン電流密度の画像化など、その学術的意義は大きい。加えて、本手法は生きた状態のバイオ試料を高分解能に観察可能なプローブ顕微鏡として、その帯電状態に左右されずに高精度に再現性高く測定可能な技術を開発するものとして、工学的意義も大きく、本研究所の生体計測研究部門で取り組む内容として有意義な成果を得られたと思われる。

本プロジェクトは、日本顕微鏡学会のバイオSPM研究会において発表した際、学外研究者に大変興味と関心をもっていただき、その後、研究室見学など交流が活性化した。また次年度に向けて学外研究者との新たな共同研究を開始する打合せも行うことができ、今後の発展が期待できる。

[4] 成果資料 (以下 10.5 ポイント)

- (1) F. Iwata, K. Yamazaki, K. Ishizaki, and T. Ushiki, "Local electroporation of a single cell using a scanning ion conductance microscope", Jpn. J. Appl. Phys. 53 (2014) 036701
- (2) S. Sakurai, K. Yamazaki, T. Ushiki and F. Iwata, "Development of a single cell electroporation method using a scanning ion conductance microscope with a theta type nanopipette", 22nd International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (Atagawa) 2014. 12.11
- (3) S. Sakurai, K. Yamazaki, T. Ushiki, and F. Iwata, "Development of a single cell electroporation method using a positioned theta type nano pipette", 6th International Conference on Positioning Technology 2014, pp475-476 2014.11.20 (Kitakyushu)
- (4) S. Sakurai, K. Yamazaki, T. Ushiki, and F. Iwata, "Development of a single cell electroporation method using a scanning ion conductance microscope with a theta type probe pipet", 25th 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, pp191-195 2014.11.11 (Nagoya)

出張報告（特別教育研究経費を使用した場合について、全員分記載して下さい。）

氏名：牛木 辰男

所属：新潟大学大学院医歯学総合研究科・顕微解剖学分野

期間：平成27年1月29日～平成27年1月31日

用務先：静岡大学

用務内容：走査型イオン伝導顕微鏡とマニピュレーターに関する実験を行う。

主たる対応者：岩田 太

氏名：中島 真人

所属：新潟大学大学院医歯学総合研究科・顕微解剖学分野

期間：平成27年1月29日～平成27年1月31日

用務先：静岡大学

用務内容：走査型イオン伝導顕微鏡とマニピュレーターに関する実験を行う。

主たる対応者：岩田 太