

A03 ミトコンドリア分裂過程におけるナノスケール力学機械特性の時空間ダイナミクスの検出

金沢大学新学術創成研究機構ナノ生命科学研究所 渡邊信嗣

1. 研究目的

本研究は、液中にある生物試料の生体膜のナノレベルの動きを可視化する計測技術の確立に挑むものである。単離したミトコンドリアが示すナノレベルの膜変形、ゆらぎのダイナミクスを個体レベルで可視化することを本研究の目的としている。

2. 2016-2017 年度の成果

液中において脆弱な生体膜を破壊せず、膜変位をナノレベルの空間解像度で高速に捉えるために、走査型イオン伝導顕微鏡 (SICM) という走査プローブ顕微鏡技術の時空間分解能を向上する技術開発を推進した。開発結果を、時間分解能、空間解像度の向上という 2 項目に分けて、以下に説明する。

(I) 時間分解能の向上

基板上に固定したミトコンドリアの局所領域を計測するには、数十マイクロメートルの水平方向走査範囲 (視野) を確保しつつ、計測すべき現象に対して十分高速な探針の垂直位置制御手法を確立する必要があると考えた。このため、新規に探針走査型の高速位置制御装置 (ナノポジショナー) を開発した [参考文献(1)、(2)]。さらに、探針の高速走査を可能とする位置制御手法も新規に開発した [参考文献(3)、(4)]。開発したナノポジショナーの垂直、水平方向の変位に関する伝達関数は、それぞれ 100kHz、2.4kHz 程度に共振ピークを有し、垂直、水平方向のストロークは、6 μm 、34 μm ×34 μm 程度を達成した。単離した基板上的ミトコンドリア (直径 \sim 1 μm) を観察視野に捉え、その局所領域の膜変位を計測するには十分な能力である。

(II) 空間解像度の向上

ナノレベルの膜変位を計測するために、SICM の探針であるガラスピペットの開発が必要であった。SICM の空間解像度は、ガラスピペットの開口直径程度となるため、ナノレベルの変位を計測するには、サブ 10nm の開口径を有するガラスピペットを開発せねばならない。一般には、このようなガラスピペットを作製することは以下の (i)、(ii) の理由により、容易ではないと認識されていた。(i) サブ 10nm のガラスピペット先端開口を可視化することが難しい。よって、ある作製プロセスによりピペットを作製した際に、本当にサブ 10nm の開口があるのか判断できず、作製プロセスを改善してサブ 10nm という目標値まで到達するといった、一般的なアプローチが困難であった。(ii) サブ 10nm のガラスピペットが作製できても、ピペット先端付近の壁の効果によりピペット内部に一樣に溶液を満たすことが困難である。ゆえに、サブ 10nm のピペットにより SICM 計測を行うことができない。このような状況であったが、我々は、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、従来よりも格段に容易にピペット先端形状をサブナノメートル解像度で可視化する手法を發明した [参考文献(6)]。これにより、ピペット作製条件を改善し、サブ 10nm のピペットを容易に作製可能になった (図 1)。更に、温度勾配を利用した気液成長プロセスにより、ピペット先端のナノチャンネルに溶液を充填する手法を發明し [参考文献(5)]、サブ 10nm のピペットで SICM 計測が可能であることを実証した (図 2)。また、ミトコンドリアと同様

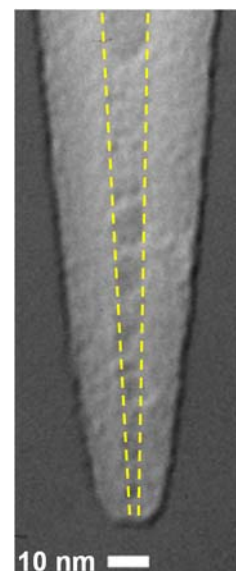


図 1. SICM 探針先端の TEM 像。破線はピペット内のナノチャンネル。開口直径は 2 nm。

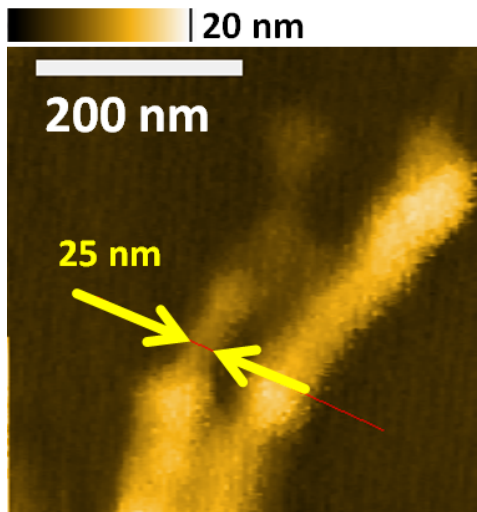


図 2. 基板上的アクチン繊維の SICM イメージ。実際の繊維の直径は 10nm 程度であるが、探針の効果で遷移の直径が実際よりも大きく見えていると考えられる。スケールバーは 200nm。

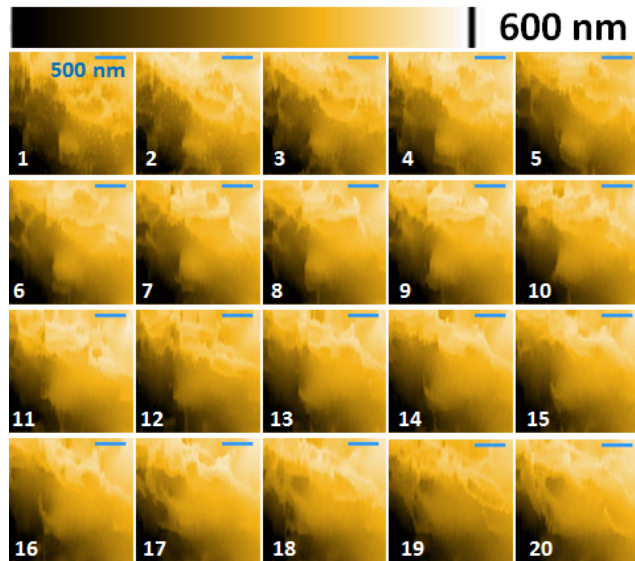


図 3. 基板上的 HeLa 細胞のエッジ部分の SICM イメージ。画像の黒部分は基板である。微絨毛の運動ダイナミクスを 20 秒/フレームで捉えている。スケールバーは 500nm。

に、非常に柔らかい膜を有する生きた真核細胞の膜表面をナノ解像度で可視化し、生細胞表面ナノ構造の膜ダイナミクスを捉えることができることを実証した(図 3)。以上の本研究における技術開発、発明により、サブ 10nm の解像度の SICM 計測を行うことが可能となった。これらの成果をとりまとめた論文は、投稿準備中である[参考文献(3)、(7)、(8)]。

3. まとめ

本研究では、生体膜のナノレベルの膜変形、ゆらぎのダイナミクスを捉える技術を開発することを目標にした。開発した技術を用いて、生きた真核細胞の膜表面変形ダイナミクスや、サブ 10nm のナノ構造を有する生物試料の観察に成功した。しかし、本来目標としたミトコンドリアの膜変形のダイナミクスを捉えるまでには至らなかった。これは単離精製した試料の純度が低いことや、基板への固定などの観察条件の検討が困難だったことによる。今後は、観察条件を改善することで、従来の目標を達成できると考えている。

参考文献：

- (1) 渡辺信嗣、安藤敏夫 「プローブ走査機構、プローブ装置および走査型プローブ顕微鏡」 出願日：2016年11月22日，出願番号：PCT/JP2016/084534
- (2) S. Watanabe, and T. Ando, Appl. Phys. Lett. 111, 113106(4 pp), (2017).
- (3) S. Watanabe, N. Kodera, and T. Ando in preparation.
- (4) 渡辺信嗣、安藤敏夫「表面計測方法、イオン伝導顕微鏡およびプローブ」出願日：2017年9月8日，出願番号：特願 2017-172666
- (5) Sun Linhao, 執行航希、渡辺信嗣、安藤敏夫「液体充填方法、SICM 用プローブの製造方法、SICM 用プローブ及び SICM」出願日：2017年12月22日，出願番号：特願 2017-245642
- (6) 滝ヶ浦尚平、渡辺信嗣「SICM 用プローブの製造方法及び SICM 用プローブ」出願日：2018年2月27日，出願番号：特願 2018-33897
- (7) S. Takigaura, S. Watanabe *et al.* in preparation.
- (8) L. Sun, K. Shigyo, T. Ando, S. Watanabe, in preparation.