九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Establishment of nanointerface fluorescence imaging techniques for characterization of biomolecules

石島, 歩

https://hdl.handle.net/2324/2236027

出版情報：九州大学, 2018, 博士（理学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

（様式６－２）

氏　　名	石島　歩
論　文　名	Establishment of nanointerface fluorescence imaging techniques for characterization of biomolecules （生体分子評価のためのナノ界面蛍光イメージング法の確立）
論文調査委員	主　査　　九州大学　　教授　　玉田　薫 副　査　　九州大学　　教授　　松森　信明 副　査　　九州大学　　准教授　有馬　祐介 副　査　　九州大学　　助教　　木下　祥尚

論　文　審　査　の　結　果　の　要　旨

近年Abbeの回折限界を超える空間分解能を持つSTED（Simulated emission depletion）やPALM（Photoactivated localization microscopy）をはじめとする超解像顕微鏡法の開発が進んでいるが、測定及び画像解析に多くの時間と労力、熟練のスキルが必要であり、未だ汎用化には至っていない。また性能としても分子ダイナミクスの高速イメージングへの応用は難しいとされている。一方、基板から約200 nmの範囲の表面高解像度界面観察法である全反射蛍光（Total internal reflection fluorescence; TIRF）顕微鏡法は高速リアルタイム観察に適した手法であり、広く普及する観察法である。

本研究は、直径数ナノメートルの銀ナノ粒子が二次元に均一に配列した銀ナノ粒子シートを蛍光顕微鏡観察用の基板として用いることで、TIRF顕微鏡よりも更に界面観察に適し、かつ高速イメージングにも対応する蛍光顕微鏡観察法の開発を目的に研究を行ったものである。特に本研究では、市販のTIRF顕微鏡を改良し、PおよびS偏光を銀ナノ粒子シートに入射させ、励起された局在プラズモン共鳴（LSPR）の偏光依存特性と得られた蛍光イメージとの関係について詳細に議論した。

実験に先駆けて銀ナノ粒子シートに S 偏光及び P 偏光を入射した場合の LSPR 特性について、FDTD (Finite-difference time-domain) 計算によって検討した。その結果、シート内部の微粒子近接位置（ナノギャップ）における励起電場強度は S 偏光入射時の方が強いものの、シート最表層においてはむしろ P 偏光入射時の方が強くなることがわかった。これは LSPR 電場の界面への閉じ込め効果が、P 偏光（単独粒子からの LSPR 励起）に比べて S 偏光（ナノギャップにおける LSPR の協同励起）が強いことに起因する。この結果を反映し、均一なシアニン色素溶液を用いた蛍光増強度の定量実験の結果では、界面からのしみ出し長の大きな P 偏光の方が S 偏光よりも大きな蛍光増強度を生む結果が得られた。また異なる励起および発光波長を持つ３種類のシアニン色素溶液間の比較から、色素の励起/発光スペクトルと LSPR 消光スペクトルとの重なりが蛍光増強に大きく影響することも実験的に確認できた。続く直径 200 nm の蛍光ビーズを用いた実験では、反対に S 偏光の方が P 偏光よりも大きなコントラスト（微粒子のある部分とない部分との輝度の比）を示した。これは S 偏光の界面への強い光閉じ込め効果によるものと考えられる。一方、面内での解像度につ

いてはS偏光よりもP偏光の方が優れているという結果になった。以上の研究から、SおよびP偏光を使い分けることで、銀ナノ粒子シートの特性をさらに生かした多様なイメージングが可能であることを確認した。

続いて、銀ナノ粒子シート蛍光観察法をNIH-3T3細胞接着界面に局在するパキシリンというタンパク質の観察に応用した。実験の結果、銀ナノ粒子シート上ではガラス基板上よりも極めて高解像度の界面イメージングが可能であることがわかった。さらに、S偏光とP偏光の比較では、P偏光の方が、より解像度の高い観察が行えることが明らかになった。さらに、これらの界面観察法を用いたSphingomyelin（SM)/Dioleoyl phosphatidylcholine(DOPC)/Cholesterol(Chol）3成分系の巨大ベシクル（Giant unilamellar vesicle; GUV）の観察では、GUVの界面への接着および展開により、液体秩序相　（Liquid-ordered, Lo）と液体無秩序相（Liquid-disordered, Ld）の識別が可能であるという新たな知見を得ることができた。この手法を用いて、脂質組成とLo/Ld相分離構造との関係について詳細に議論した。

以上のように、本研究で得られた知見は、銀ナノ微粒子シート上で励起されるLSPRの本質を理解する上で非常に重要であることに加えて、生体分子の高解像度界面イメージングへの応用を通じて、広く化学の発展に寄与するものである。よって、本研究者は博士（理学）の学位を受ける資格があるものと認める。