

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）

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)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 約

長い間、光学顕微鏡の空間分解能は回折限界によって制限され、これを超える空間分解能を得ることは不可能と考えられてきた。しかし近年、STED (Stimulated emission depletion)や PALM (Photoactivated localization microscopy)をはじめとする様々な超解像顕微鏡法が開発され、光学顕微鏡分野は大きな技術革新の時代を迎えている。しかし、これらの装置は高価で使用法も複雑であり、現状広く一般に波及できる状況にはない。更に、これらの超解像顕微鏡はスキャン型で、解析に統計的処理を必要とするなど、一般に高速でのリアルタイム観察には適さない。一方、本研究で使用した全反射蛍光 (Total internal reflection fluorescence: TIRF) 顕微鏡法は、基板から約 200 nm の深さ領域の界面の観察法で、リアルタイム観察にも適するが、1 分子計測などの特殊な使用法を除いて面内の空間分解能はさほど高くはない。

本研究では、直径 5 nm の銀ナノ粒子を自己組織化により二次元に配列し (銀ナノ粒子シート)、そこで発生する局在表面プラズモン共鳴 (localized surface plasmon resonance: LSPR) を蛍光顕微鏡観察用の基板として用いることで、深さ方向だけではなく面内方向の空間分解能においても TIRF 顕微鏡を超える蛍光観察法を確立することを目的とした。多様な LSPR 励起状態を得るために、S 偏光と P 偏光の両方を入射光源として使用できるように市販の TIRF 顕微鏡に改良を加えた。銀ナノ粒子シートならびに S 偏光および P 偏光の TIRF 顕微鏡観察への応用が本研究の独自な点である。これらの手法を用いて、均一なシアニン色素溶液による LSPR 増強蛍光の定量測定、蛍光ビーズを用いた空間分解能の計測、また実際の生体試料として、接着細胞ならびに巨大ベシクル (Giant unilamellar vesicle: GU) の観察を行った。

初めに、銀ナノ粒子シートに S 偏光及び P 偏光を入射した時の LSPR 励起状態について、FDTD (Finite-difference time-domain) 計算により求めた。S 偏光入射時には、粒子間でのプラズモンカップリングにより、界面に強く閉じ込められた均一な LSPR 場が励起される。一方、P 偏光入射時には、それぞれの粒子上に比較的長く深さ方向にしみ出した LSPR 場が励起される。均一なシアニン色素溶液を用いた実験では、蛍光増強度は色素の励起/発光波長と LSPR 波長との重なりに強く依存し、銀微粒子シート上で最大 7 倍の蛍光増強が得られた。S 偏光と P 偏光との比較では、P 偏光における蛍光増強度が S 偏光に比べて大きいという結果が得られた。続く直径 200 nm の蛍光ビーズの観

察実験でも銀ナノ粒子シート上ではより高い S/N 比の画像が得られ、P 偏光による蛍光増強度が S 偏光に比べて大きかった。一方、空間分解能に関しては、P 偏光の方が S 偏光に比べて高いという新たな知見が得られた。

銀ナノ粒子シートを Paxilline-labeled NIH-3T3 細胞の接着表面の蛍光観察に応用した例では、銀ナノ粒子シート上ではガラス上よりも高い空間分解能の接着界面画像が観察された。S 偏光と P 偏光との比較では、ここでも P 偏光の方が、より空間分解能の高い界面観察が行えることが明らかになった。さらに SM (Sphingomyelin), DOPC (Dioleoyl phosphatidylcholine), Chol (Cholesterol) の 3 成分系からなる GUV の相分離構造の観察を TIRF 顕微鏡下で行った実験では、ガラス界面への接着により GUV に開裂・展開が生じ、その結果、三次元の試料ながら、界面における二次元での高分解能観察が可能であった。GUV は、SM : DOPC : Chol = 1:1:0.5 の混合比率において、液体秩序相 (Liquid-ordered: Lo) と液体無秩序相 (Liquid-disordered: Ld) の 2 相に相分離することが知られているが、開裂した GUV では、均一相と不均一相の 2 つの相が観察され、脂質の混合比や色素の種類を変えた検討の結果、均一相が Lo 相、不均一相が Ld 相であるという予想が得られた。GUV は金属ナノ粒子シート表面に接着しにくく、シート上での十分な観察は困難であったが、得られた画像からは上述の結果と同様、P 偏光においてより高い空間分解能が得られた。

本研究を通じて、銀ナノ粒子シートを用いた界面観察法における蛍光増強の効果、ならびに S 偏光および P 偏光利用の効果について計算および実験から明らかにすることができた。銀ナノ粒子シートの生体分子評価への応用については、毒性の影響など解決しなければならない課題はまだ残されているが、その簡便さ及び、高い光学的効果から将来性の高い技術であると考えている。