

Establishment of LSPR-mediated fluorescence imaging for cell-attached nanointerface

増田, 志穂美

<https://doi.org/10.15017/4059993>

出版情報 : 九州大学, 2019, 博士 (理学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



氏 名	増田 志穂美			
論 文 名	Establishment of LSPR-mediated fluorescence imaging for cell-attached nanointerface (細胞接着ナノ界面の観察のための局在プラズモン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	教 授	瀧上 隆智
	副 査	九州大学	准教授	有馬 祐介

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

蛍光顕微鏡は、観察対象中の蛍光分子からの発光を検出することで画像を得る手法である。蛍光顕微鏡の空間分解能は回折限界（アッペ回折限界）によって制限され、水平方向で約 200 nm、垂直方向で約 500 nm である。蛍光顕微鏡における空間分解能の問題を解決するために開発された高解像度顕微鏡のうち、回折限界を超える解像度を有する顕微鏡は超解像顕微鏡（SRM）と呼ばれる。その一例が、2014 年にノーベル化学賞を受賞した誘導放出抑制（STED）顕微鏡と光活性化局在顕微鏡（PALM）である。これらの SRM では、複数の画像から再構成画像を作成することにより、水平方向に極めて高い解像度が得られるが、1 つの画像を再構築するのに数十秒から数分かかり、高速のリアルタイム観測には適していない。一方、垂直方向に高い空間分解能を有する代表的な顕微鏡は全反射照明蛍光（TIRF）顕微鏡である。TIRF 顕微鏡は、エバネッセント光を励起に使用することにより、垂直方向に約 100 nm という高い分解能を有し、リアルタイムの観察にも適した方法であるが、水平方向の空間分解能はさほど高くはない。

本博士論文の研究では、金属微粒子自己組織化シートからの局在表面プラズモン共鳴（LSPR）を利用した、TIRF 顕微鏡よりもさらに高い垂直分解能を有する、新しい蛍光観察方法が提案された。LSPR とは、金属ナノ構造体に光を照射した際、金属表面の自由電子の集団振動が特定の波長の光と結合する現象のことである。LSPR は金属 / 誘電体界面から粒子径程度の空間において強い光電場を励起するが、本研究では、金属微粒子を気液界面で自己組織化させることで、均一で大面積の二次元単層シートを作製し、これを蛍光顕微鏡観察基板として用いている。このシートの中では、微粒子間のナノギャップで LSPR が強く結合し、さらに強い増強電場がシート面全体に均一に励起される。観察の対象は接着性細胞の接着斑（Focal Adhesion）領域のナノ界面である。

本博士論文の各章における議論は以下のとおりであった。第 2 章では、各種 SRM の分解能をまとめ、本研究で提案する LSPR を使った手法との違いについて議論がなされた。第 3 章では、オレイアミン被覆金微粒子（AuOA）とミリスチン酸被覆銀微粒子（AgMy）の細胞毒性について、これら 2 種類の微粒子からなる混合シート上での細胞接着試験により明らかにした。第 4 章では、AuOA シートで励起される LSPR 電場強度を、有限差分時間領域（FDTD）法を用いて計算するとともに、蛍光色素から金属微粒子への共鳴エネルギー移動（surface energy transfer (SET)）による蛍光消光を考慮して、AuOA シート上で得られる蛍光増強度を微粒子シート表面からの距離の関数として算出した。計算の結果、微粒子シート表面から 13 nm 程度の界面領域でのみ AuOA シートの実効電場強度がエバネッセント光の強度を上回ること、それよりも離れた領域からの背景光はむしろ小さく抑えられることがわかった。以上から、局在プラズモン蛍光イメージング法において、ナノ界面の高感度イメージングが可能となる理論的背景が説明された。第 5 章では、AuOA シートを使用して実際にアクチンを蛍光染色した固定化細胞の観察を行い、AuOA シート上画像と TIRF 顕微鏡画像を比較した結果が示された。観察の結果、AuOA シート上では、理論からの予測の通り、細

胞接着ナノ界面領域の蛍光のみが増強検出されていることが確認できた。また AuAO シート上の観察範囲が TIRF 顕微鏡の約 10 分の 1 であるにもかかわらず、観察された蛍光強度が同程度であったことから、AuOA シート上での蛍光増強度は 10 倍程度であると推定された。第 6 章では、細胞接着に関わるタンパク質の一つであるパキシリンに蛍光色素を発現させて、接着細胞のダイナミクスについて、ライブセルイメージングにより評価した結果が示された。共焦点レーザー顕微鏡による長時間のタイムラプス観察では、LSPR 共鳴波長と発光波長が重なる発光増強の条件下では、AuOA シート上の細胞はガラス上に比べて光褪色しにくいという傾向が明らかになった。さらに、細胞内のパキシリンの位置を超解像度 CMOS カメラ（ピクセルサイズ 65 nm）で画像取得し、パキシリンの移動速度を算出した。垂直方向の光閉じ込めの水平分解能向上へ及ぼす効果についても併せて議論がなされた。第 7 章では、これら研究の概要をまとめ、局在プラズモン蛍光イメージング法で残された問題点と将来の展望が述べられた。

以上のように、本研究は、金属微粒子自己組織化の局在表面プラズモン共鳴を、細胞接着ナノ界面の観察法として確立した独創的な研究として高く評価される。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。