

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成30年 5月 1日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所 属 機 関・部 局 名 室蘭工業大学大学院・しくみ情報系領域
職 名 准教授
研 究 代 表 者 名 加野 裕

下記のとおり平成29年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:281015)

1. 共同利用研究 課題名	疑似細胞間隙の無染色高精度高空間分解能計測による細胞接着状態評価			
2. 共同利用研究 目的	細胞接着は、細胞間のシグナル伝達に重要な役割を果たしている。本研究は、基板表面に成膜された生体模倣膜と細胞の間に疑似細胞接着を形成し、その間隙距離の空間分布を無染色で高分解能に調べる手法を開発する。このことにより、細胞接着構造がシグナル伝達に与える影響を定量的に評価する新規手法論を確立したい。			
3. 共同利用研究 期間	平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 年 3 月 31 日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 加野 裕	室蘭工業大学大学院しくみ 情報系領域	准教授	測定計の構築	
(分担研究者) 森垣 憲一	神戸大学バイオシグナル総 合研究センター	准教授	反応系の構築	
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル分子応答研究 分野	氏 名	森垣 憲一

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同利用研究計画

疑似細胞膜表面に、ナノメートルオーダーの間隙を形成し、その距離を精密、正確に測定する技術の確立を目指し、次の計画に沿って実験を進めた。

- 表面プラズモンを励起する基板表面における間隙形成：
長寿命な表面プラズモンを、高いエネルギー利用効率で励起することができる基板表面に、生体模倣膜を成膜し、その表面にナノメートルオーダーの間隙を形成する目標に対し、シリカコーティングした銀表面に、流動性をもつ脂質二分子膜と非流動性の脂質二分子膜から成る脂質二分子膜を成膜し、非流動性脂質二分子膜表面にだけ、スペーサーとなるナノ粒子を固定する手法の有効性を検討した。この手法において、ガラス基板表面に、銀(膜厚 48nm)、シリカ(膜厚 15nm)をスパッタリング成膜し、DiynePC と DiynePE の混合二分子膜を成膜し、末端をビオチン化してから紫外光リソグラフィーによるポリマー化パターンニングを行い、非ポリマー領域の脂質二分子膜を除去した後、DOPC の流動性二分子膜を成膜する。さらに、ポリマー脂質二分子膜領域にストレプトアビジンを結合させて、ビオチン末端を有するスペーサーを結合させる。また、スペーサーには、主にシリカ微小球(直径 100nm)表面を脂質膜で被覆したものをを用いることを計画した。
- 光学系の構築：
間隙形成手法の過程を、走査型集束表面プラズモン顕微鏡で観察することを計画した。上述の手法では、スペーサーの固定等において、倒立型の光学系が適していると考えられたため、その設計と構築を計画した。また、走査型集束表面プラズモン顕微鏡の測定領域が、利用する走査ステージの性能により、最大 20 μm 平方に限られるため、より広い領域を観察するために、結像型表面プラズモン顕微鏡の併用を可能にする光学系構築を計画した。

7. 共同利用研究の成果

倒立型集束表面プラズモン顕微鏡の光学系を構築し、直径 200nm のラテックス微小球を試料に用いて、集束表面プラズモンの局在状態を観察したところ、局在が楕円状に歪んでいたため、その原因を調べたところ、対物レンズに入射する光の偏光状態に問題があることが分かった。本来、最適なラジアル偏光を入射させると、結像型光学系との併用を考えて組み込んだハーフミラーを持つ偏光依存特性のために特定の方位に伝搬する表面プラズモン励起が十分でないことが分かった。そこで、フリップミラーを用いて、走査型光学系、結像型光学系の光路切り替えを行うようにしたところ、この問題を解消することができ、倒立型集束表面プラズモン顕微鏡が回折限界に相当する空間分解能で動作することを確認した。

続いて、疑似細胞膜表面にナノメートルオーダーの間隙を形成するための手法の過程に関し、パターン化脂質二分子膜のピット部分に流動性脂質二分子膜をベシクルフュージョンによって成膜する行程以降を、構築した倒立型表面プラズモン顕微鏡下で観察した。なお、超高屈折率カバーガラス(屈折率 1.78)上に銀とシリカをスパッタリング成膜し、ポリマー領域をビオチン化させるまでの行程を、神戸大学にて、それ以降を室蘭工大で実施した。表面プラズモンの伝搬定数分布の変化を解析した結果、ピット部分での、ベシクルフュージョンによる平面膜形成、ポリマー領域におけるストレプトアビジンの結合、ストレプトアビジンへのスペーサーの結合を確認することができ、無染色で間隙形成過程を計測可能であることを確認することができた。また、伝搬定数の標準偏差は、ナノメートルオーダーの精度で間隙距離を測定する目標に対して、十分に小さいことを確認することができた。一方で、ベシクルフュージョンの工程での再現性が乏しく、ポリマー領域にも脂質分子の吸着が生じていた。間隙距離の制御において問題となる事象であることから、次年度において改善に取り組む。現時点では、基板の長距離輸送に伴うポリマー領域の構造変化を主要な原因と考えている。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

準備中

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

該当無し