

## 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

令和元年5月8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・工学研究科  
職 名 准教授  
研究代表者名 加野 裕

下記のとおり平成30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	細胞の接着状態は、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間隙を形成し、その距離の空間分布を無染色かつ高精度、高空間分解能で調べる手法を開発する。これにより、細胞間隙がシグナル伝達に与える影響を評価する新規手法を確立したい。			
3. 共同利用研究 期間	平成30年4月1日 ～ 平成31年3月1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工学研究科	准教授	疑似細胞間隙の測定	
(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	疑似細胞間隙の構築	
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6～9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6～9の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号: 281015)

#### 6. 共同利用研究計画

本研究では、測定基板上に、数十ナノメートルに距離を制御した疑似細胞間隙を作製し、ナノ空間における生体分子の挙動を明らかにすることを目標としている。その実現に向けて、生体分子間の相互作用を無染色で捉えることが可能な計測手法である集束表面プラズモン屈折率測定法を実行できる基板上で、間隙の作製と評価を試みた。前年度と同様に、間隙は、長寿命な表面プラズモンを励起可能な基板表面に、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パターン膜を成膜し、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し、全体をポリジメチルシロキサン(PDMS)でカバーする手順で作製した。前年度は、非流動性脂質二分子膜で形成したピット領域に、ベシクルフュージョンによって流動性脂質二分子膜を成膜する過程で、ベシクルが非流動性脂質二分子膜上にも吸着してしまい、スペーサーとなるシリカ粒子の結合を妨げることが問題となった。そこで、本年度は、吸着したベシクルの脱離過程の改善に取り組んだ。

また、測定装置の改良として、走査型集束表面プラズモン顕微鏡と光路を切り替えて併用する結像型表面プラズモン顕微鏡のコントラスト向上を検討した。走査型集束表面プラズモン顕微鏡の測定領域は、利用する走査ステージの性能により、最大  $20\mu\text{m}$  平方に限られるため、測定領域の決定に時間を要する問題があった。これに対し、結像型表面プラズモン顕微鏡では、空間分解能は高くないものの、より広い領域を観察することができるため、測定に適した領域を探索するのに有用である。今年度は、光学部品配置の大幅な変更を伴う光学系変更を行い、観察像のコントラスト向上に取り組んだ。

#### 7. 共同利用研究の成果

吸着したベシクルの離脱のため、ベシクルの排出過程を見直した。前年度までは、リン酸バッファー溶液(PBS)を用いていたが、これを超純水に置き換え、流路における溶液の流速を増大させることを検討した。まず、装置に組み込んでいたシリンジポンプの最大流速で流路内の溶液置換を行うことによる影響を評価するため、正体に分子膜が成膜されていない基板を用い、流路内を PBS で満たした状態から、最大吸引量 ( $1.4\text{ml}/\text{min}$ ) で超純水に置換し、さらに、従来と同じ吸引量 ( $0.4\text{ml}/\text{min}$ ) で PBS に置換して、基板表面の局所的な屈折率を測定したところ、超純水に置換する前後の屈折率には有意な差が無かったため、流速の増大が測定に影響を与えないことを確認できた。そこで、ベシクル排出の過程での流速を増大させて、非流動性脂質二分子膜上の局所的な屈折率変化を測定したところ、従来よりも吸着したベシクルが減少していることを確認できたが、顕著なものでは無かった。そこで今後の参考として、手動により、シリンジポンプの最大流速を大幅に超える流速で流路内の溶液置換を行ったところ、顕著に吸着分子の低減が確認できた。このときの吸引量は、シリンジポンプの最大吸引量のおよそ 8.5 倍であった。このことから、シリンジポンプの置き換えや、流路の断面積を減少させるなどにより、ベシクル吸着の問題を解決可能であるとの知見を得た。なお、この実験では、流路を用いた閉鎖系で溶液交換を行う方式を用いているが、これは、共同研究者が確立した、開放系で基板表面を洗浄する方式と異なっている。今回、閉鎖系で吸着したベシクルが脱離しないケースについて、同じバッチで作製された基板を神戸大学へ戻し、開放系で検証実験を行ったところ、吸着したベシクルは脱離しないことが分かった。非流動性脂質二分子膜の状態が適切でないことに起因すると考えられるため、今後、非流動性脂質二分子膜の状態を予め把握することが、実験の再現性向上に重要であることを示唆する結果となった。

また、測定装置の光学系を変更し、走査型集束表面プラズモン顕微鏡と光路を切り替えて併用する結像型表面プラズモン顕微鏡のコントラスト向上を試みた。具体的には、入射瞳に集光するレンズの開口数を増大させて、入射瞳における空間周波数分布の帯域制限を行い、表面プラズモンへの結合効率を向上させた。実際に、集光レンズの開口数を 0.037 から 0.055 へ変更し、直径  $1\mu\text{m}$  の透明微小球の観察を行ったところ、背景雑音が 55% 低減したため、像のコントラスト向上を確認することができた。このコントラスト向上は、先に挙げた、非流動性脂質二分子膜の状態把握への寄与が期待できる。

#### 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。)

上記への該当無し

#### 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