

(報告書様式)

2018年 5月 27日

金沢大学先端科学・イノベーション推進機構協力会 御中

## 第2回 若手研究者奨励賞 研究実施報告書

所 属 金沢大学ナノ生命科学研究所  
職 名 准教授

ふりがな たかはし やすふみ  
氏 名 高橋 康史

# 研究実施報告書

## (1) 研究テーマ名

ナノエレクトロプローブによる統合的な単一細胞解析技術の創成

## (2) 研究の目的および要旨

細胞の構造と機能をシームレスで結びつける上で、動的に変化を続ける化学情報の定量評価が不可欠である。しかし、現在の単一細胞評価は、静的な情報の張り合わせから化学変化を推定している(図1)。この実現には、**局所的にストレスを与える摂動技術**と、**低侵襲かつ局所的な分析技術**が必要であり、次に挙げる問題意識を持った。

問題意識① その場観察の重要性

溶液中を拡散する化学物質を計測するため、センサーを細胞近傍に配置する

問題意識② 高感度センシング技術

センサーの小型化と高感度化を両立し、局所かつ定量的に化学物質を検出する

問題意識③ 適切なストレスを与える“摂動技術”

個々の微小器官に対して適切な強度の刺激を局所的かつ経時的に印加する

申請者は、“化学物質の濃度マッピング”を目的として、ナノピペットや微小電極をプローブに用いる走査型プローブ顕微鏡の開発を行ってきた。装置の組み上げ、制御プログラム、電極作製にいたるまでの心血を注いで開発を行い、その解像度は世界トップであり、この5年間で細胞計測に新たな分野を切り開いた。本研究では、単一細胞解析技術の統合を図り、化学物質の動的な分布を明らかとする。

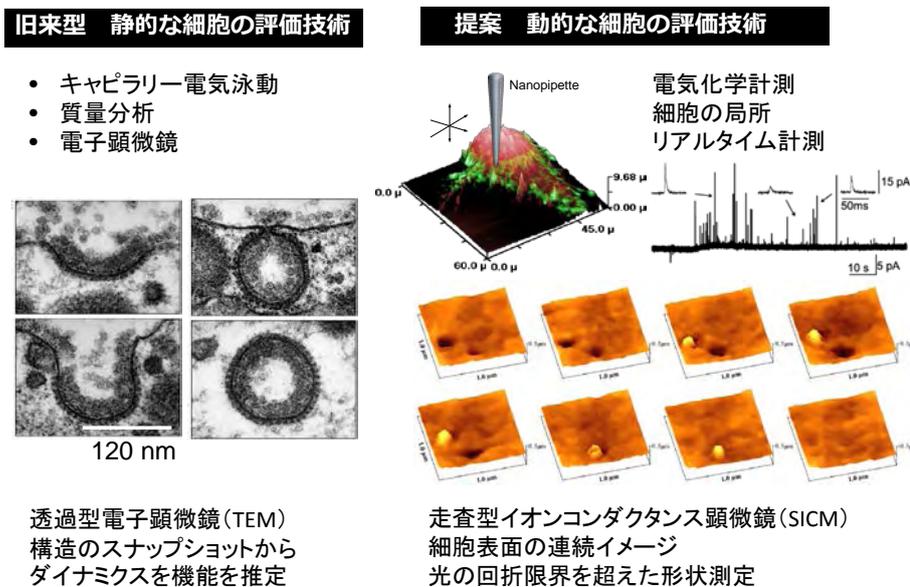


図1 クラスリン依存型エンドサイトーシス (左) スナップショット画像 (TEM) , (右) 8秒ごとの連続イメージ (走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM))

### (3)採択されてからの研究の進捗状況

まず、高速なイメージングを実現するため、ピエゾステージの独自開発を行いピエゾステージの動作速度の指標となる共進周波数を 10 kHz から 30 kHz まで向上させることに成功した。また、微小電流計測器についても独自開発を行い、高速な電流計測器（10 kHz 以上）の開発に成功した。さらに、イメージングのアルゴリズムについても、プレスキャンの情報を利用して位置選択的なイメージングを可能とした。このことで下記に示すような、シナプスの形状変化を実現した。さらに、顕微鏡の応用を広げるため、京都大学 二木史朗先生と共同研究を開始し、ドラックデリバリーシステムなどへの応用が期待されるアルギニンペプチドの細胞内への取り込みを可視化した。

### (4) 研究の成果

#### シナプスの形状変化を捉える走査型イオンコンダクタンス顕微鏡の開発

神経細胞は、神経伝達物質を介してコミュニケーションを行っているが、その際に神経伝達物質の受け手である約 1  $\mu\text{m}$  ほどの大きさのスパインが形状変化を起こす。このような神経細胞の形状変化をこれまでナノスケールで捉えることは困難であった。ナノピペットをプローブとして用いる走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) は、イオン電流を利用して、非接触で試料の形状をナノスケールで可視化できる。しかし、時間分解能が課題とされてきた。そこで、SICM の時間分解能を向上させるための新規測定アルゴリズムを開発し、神経細胞の連続計測を実現した。通常の計測では、イメージングに約 5 分かかっていたが、得られた形状イメージから計測領域を選択すると、計測時間を 2/3 に短縮することができた。このシステムを用いて、スパインや成長円錐の形状変化を観察し、スパインそのものの形状を鮮明に捉えることができた。また、RNA や神経伝達物質受容体を含む顆粒が輸送される様子を観察することができた (図 1)。

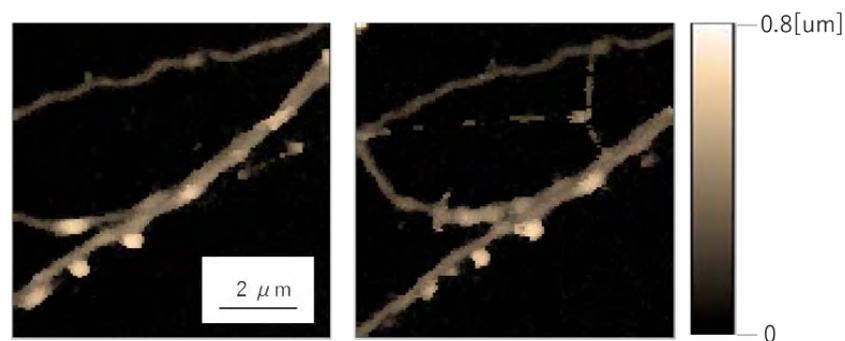


図 1 樹状突起中で輸送される顆粒の SICM イメージ

#### アルギニンペプチドの細胞透過性評価と膜曲率変化の計測

SICM では、生細胞のナノスケールの形状測定が可能であり、試薬の添加前後での変化を捉えるのに大変有効である。そのため、京都大学の二木史朗先生が進めている膜透過性アルギニンペプチドの細胞内移行の際に生じる細胞膜上面変化に関して SICM イメージングを行った。蛍光顕微鏡により、アルギニンペプチドの透過性が高い領域が細胞に局在していることがわかっていたが、その領域で 1  $\mu\text{m}$  ほどのこぶ状の構造が形成されていることを確認することができた (図 2)。

また、結果からアルギニンペプチドの取り込みは、細胞膜の曲率変化が密接に関わっていることが予想されている。そこで SICM により、膜曲率を変化させることが知られているピレンブチレートとアルギニンペプチドを加えると、微絨毛より微細なナノスケールの構造体が細胞表面に多数現れてい

ることが SICM による形状測定から明らかとなった (図 2)。

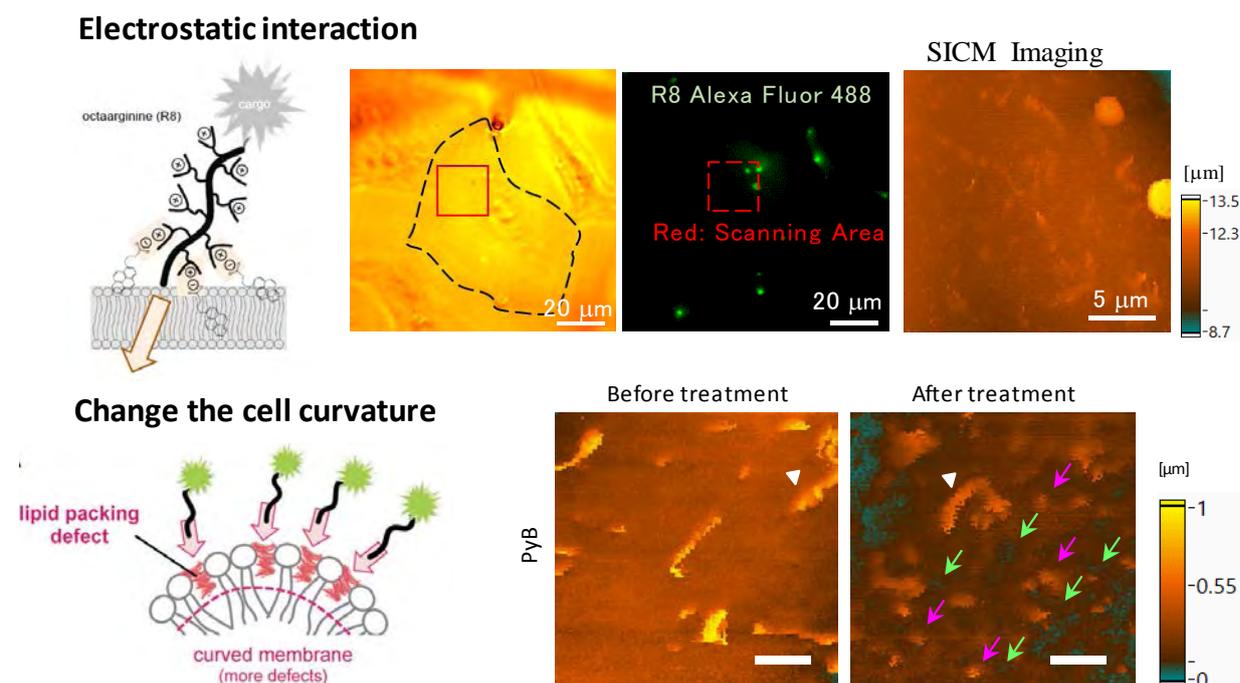


図 2 アルギニンペプチドの透過性が高い領域とピレンブチレート添加前後での細胞表面の SICM による形状イメージ

#### (5) 今後の研究の推進方策

高速 SICM の論文投稿とともに、WPI プロジェクトで進めている Korchev 教授らとの共同研究でもあるナノポアケミカルセンサーによる単一細胞の代謝物の計測に関して、できるだけ早い段階で論文発表を行いたいと考えている。また、このケミカルナノポアセンサーに超分子技術を導入することで、これまで検出が困難であった nM レベルのサイトカインや成長因子の計測に関しても実現したいと考えている。さらに、一次繊毛の計測に関しては、浜松医科大学の瀬藤教授らとともに生きた細胞の繊毛に関して、SICM のイメージングとイオンチャネルの不均一性を評価していく予定である。また、脂質のイメージングに関しても、すでにアポトーシスを誘導した細胞上でイオン電流の変化を指標として電荷の変化を可視化することに成功しており、近日中に論文にまとめる予定である。

#### (6) 研究発表 (平成 28 年度、29 年度)

論文発表

- 1) Zhou, Y.; Saito, M.; Miyamoto, T.; Novak, P.; Shevchuk, A. I.; Korchev, Y. E.; Fukuma, T.; **Takahashi, Y.**, *Anal. Chem.* 2018, 90, 2891–2895.
- 2) **Takahashi, Y.**; Zhou, Y.; Fukuma, T., Development of carbon-based nanoelectrodes for biosensing and electrochemical imaging, *Current Opinion in Electrochemistry* 2017, 5, 121-125.
- 3) **Takahashi, Y.**; Ida, H.; Matsumae, Y.; Komaki, H.; Zhou, Y.; Kumatani, A.; Kanzaki, M.; Shiku, H.; Matsue, T., 3D electrochemical and ion current imaging using scanning electrochemical-scanning ion conductance microscopy. *PCCP* 2017, 19 (39), 26728-26733. 査読有

- 4) Murayama, T.; Masuda, T.; Afonin, S.; Kawano, K.; Takatani- Nakase, T.; Ida, H.; **Takahashi, Y.**; Fukuma, T.; Ulrich, S.; Futaki, S., Loosening of Lipid Packing Promotes Oligoarginine Entry into Cells, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 56, 1 – 7. 査読有
- 5) Ida, H.; **Takahashi, Y.**; Kumatani, A.; Shiku, H.; Matsue, T., High Speed Scanning Ion Conductance Microscopy for Quantitative Analysis of Nanoscale Dynamics of Microvilli. *Anal. Chem.* 2017, 89 (11), 6015-6020. 査読有
- 6) **Takahashi, Y.**; Kumatani, A.; Shiku, H.; Matsue, T., Scanning Probe Microscopy for Nanoscale Electrochemical Imaging. *Anal. Chem.* 2017, 89, 342–357. 査読有
- 7) Hibino, H.; Takai, M.; Noguchi, H.; Sawamura, S.; **Takahashi, Y.**, Sakai, H.; Shiku, H., An approach to the research on ion and water properties in the interphase between the plasma membrane and bulk extracellular solution, *The Journal of Physiological Sciences* 2017, 1-7 査読有
- 8) Matsuoka, R.; Aoyagi, S.; Matsumoto, N.; Matsudaira, M.; **Takahashi, Y.**; Kumatani, A.; Ida, H.; Munakata, H.; Iida, K.; Shiku, H.; Kanamura, K.; Matsue, T., Advanced Scanning Electrochemical Microscope System for High-Resolution imaging and Electrochemical Applications. *Electrochemistry* 2017, 85 (6), 319-326. 査読有
- 9) **Takahashi, Y.**, Development of high-resolution scanning electrochemical microscopy for nanoscale topography and electrochemical simultaneous imaging, *Electrochemistry* 2016, 84 662-666. 査読有
- 10) Zhang, Y.; Clausmeyer, J.; Babakinejad, B.; Lopez Cordoba, A.; Ali, T.; Shevchuk, A.; **Takahashi, Y.**; Novak, P.; Edwards, C.; Lab, M.; Gopal, S.; Chiappini, C.; Anand, U.; Magnani, L.; Coombes, R. C.; Gorelik, J.; Matsue, T.; Schuhmann, W.; Klenerman, D.; Sviderskaya, E. V.; Korchev, Y., Spearhead Nanometric Field-Effect Transistor Sensors for Single-Cell Analysis. *ACS Nano* 2016, 10 (3), 3214-21. 査読有
- 11) Nashimoto, Y.; **Takahashi, Y.**; Zhou, Y.; Ito, H.; Ida, H.; Ino, K.; Matsue, T.; Shiku, H., Evaluation of mRNA Localization Using Double Barrel Scanning Ion Conductance Microscopy. *ACS Nano* 2016, 10 (7), 6915-22. 査読有
- 12) Ito, H.; Nashimoto, Y.; Zhou, Y.; **Takahashi, Y.**; Ino, K.; Shiku, H.; Matsue, T., Localized Gene Expression Analysis during Sprouting Angiogenesis in Mouse Embryoid Bodies Using a Double Barrel Carbon Probe. *Anal. Chem.* 2016, 88 (1), 610-3. 査読有
- 13) Takano, S.; Inoue, K. Y.; Ikegawa, M.; **Takahashi, Y.**; Ino, K.; Shiku, H.; Matsue, T., Liquid-junction-free system for substitutional stripping voltammetry using a closed bipolar electrode system. *Electrochem. Commun.* 2016, 66, 34-37. 査読有
- 14) Ida, H.; Ino, K.; Suzuki, J.; **Takahashi, Y.**; Shiku, H.; Matsue, T., Redox Cycling-based Electrochemical Reporter Gene Assay for Single Cells Using a Scanning Electrochemical Microscope-microwell System. *Electrochemistry* 2016, 84 (5), 308-311. 査読有
- 15) **高橋康史**, ” 走査型プローブ顕微鏡による生細胞の超解像イメージング ” , 生体の科学 68 (5), 382-383
- 16) 熊谷明哉、高橋康史、三浦千穂、渡邊徹弥、猪又宏貴、棟方裕一、珠玖仁、金村聖志、末永智一, ” ナノ電気化学セル顕微鏡を用いた電極表面の局所電気化学測定 ”、表面科学、2016, 37, 494.
- 17) **高橋康史**, ” 高解像度走査型電気化学顕微鏡の開発 ”、化学と工業, 2016, 69, 777-779.
- 18) **高橋康史**, ” ナノスケールの形状・化学物質濃度プロファイルを可視化するナノ電気化学顕微鏡の創生 ”、生物物理、2016, 56(3), 179-180.

#### 学会発表

1. **Takahashi, Y.**, Chemical sensing by using scanning probe microscopy, 第 95 回日本生理学会大会、2018 年 3 月 29 日、サンポートホール高松、高松 (招待講演)
2. **高橋 康史**, 走査型プローブ顕微鏡による 生細胞の超解像度ケミカルイメージング, 日本物理学会第 73 回年次大会、2018 年 3 月 24 日、東京理科大学野田キャンパス、柏 (招待講演)
3. **高橋 康史**, 超解像度ケミカルイメージング技術の開発、第 2 回フロンティアバイオイメージング研究会

- 2017年11月7日、東北大学、仙台（招待講演）
4. **高橋 康史**、走査型プローブ顕微鏡を用いた局所電気化学計測」, 2017年 電気化学会北陸支部秋季大会、2017年11月2日、金沢大学角間キャンパス、金沢（招待講演）
  5. **Takahashi, Y.**, Live cell super-resolution topography and chemical imaging by scanning probe microscopy, International seminar on biophysics and chemical biology of biomembrane and lipid bilayers, 2017.10.9, Osaka, Japan. (招待講演)
  6. **Takahashi, Y.**, Nanoscale electrochemical imaging by scanning probe microscopy, International Workshop: New Electroanalytical Techniques and Their Emerging Applications (IWNET-2017), 2017.9.26, Xi'an, China. (招待講演)
  7. **Takahashi, Y.**, Multifunctional Scanning Ion Conductance Microscopy for Single Cell Analysis, Meeting of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2017.9.23, Bochum, Germany. (招待講演)
  8. **高橋 康史**、宮本貴史、周縁殊、福間剛士、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡を用いた神経細胞のナノスケールイメージング, 日本生物物理学会第55回年会, 熊本大学, 熊本 2017年9月19日
  9. **高橋 康史**、走査型プローブ顕微鏡を利用した電気化学計測, 環境微生物系合同大会 2017年8月29日, 東北大学、仙台（招待講演）
  10. **Takahashi, Y.**, Visualization of Nanoscale Inhomogeneous Current Distribution on ZrO<sub>2</sub>-Coated LiCoO<sub>2</sub> Thin-Film Electrodes using SECCM, 9th Workshop on Scanning Electrochemical Microscopy (SECM), 2017.8.15, Warsaw, Poland. (招待講演)
  11. **高橋 康史**、非標識・非侵襲でのナノスケールの形状観察を実現する 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡の開発と応用, 第69回日本細胞生物学会大会 2017年6月13日、国際センター、仙台（招待講演）
  12. **Takahashi, Y.**, Live Cell Nanoscale Topography and Chemical Imaging by Using Scanning Ion Conductance Microscopy and Scanning Electrochemical Microscopy, 23rd iCeMS International Symposium "Emerging Science for Unlocking Cell's Secrets", 2017.5.30, Kyoto, Japan. (招待講演)
  13. **高橋 康史**、ナノスケールの神経細胞の形状イメージングを 実現する走査型イオンコンダクタンス顕微鏡の開発、第77回分析化学討論会 2017年5月27日、龍谷大学、京都
  14. Yasufumi Takahashi, Takafumi Miyamoto, Zhou Yuanshu, Takeshi Fukuma、シナプスの形状変化を捉える走査型イオンコンダクタンス顕微鏡の開発、第84回電気化学会大会 2017年3月27日、首都大学東京、東京
  15. Development of scanning ion conductance microscopy for time-lapse imaging of neuron
  16. Yasufumi Takahashi, Takafumi Miyamoto, Zhou Yuanshu, Takeshi Fukuma
  17. 日本化学会 第97春季年会 (2017) 2017年3月17日、慶応大学、東京
  18. **Y. Takahashi**, Development of High Resolution Scanning Electrochemical Microscopy for Single Cell Analysis, Pittcon 2017, 2017.3.8, Chicago, USA. (招待講演)
  19. **Y. Takahashi**, Development of Scanning Electrochemical - Ion Conductance Microscopy for Single Cell Analysis, NUS-JST (PRESTO) Workshop, 2016.12.9, National University of Singapore, Singapore.

(7) その他顕著な成果

知的財産

特願 2016-188803 「走査型プローブ顕微鏡及びその制御方法」、高橋康史

受賞

2017年10月11 第1回バイオインダストリー奨励賞