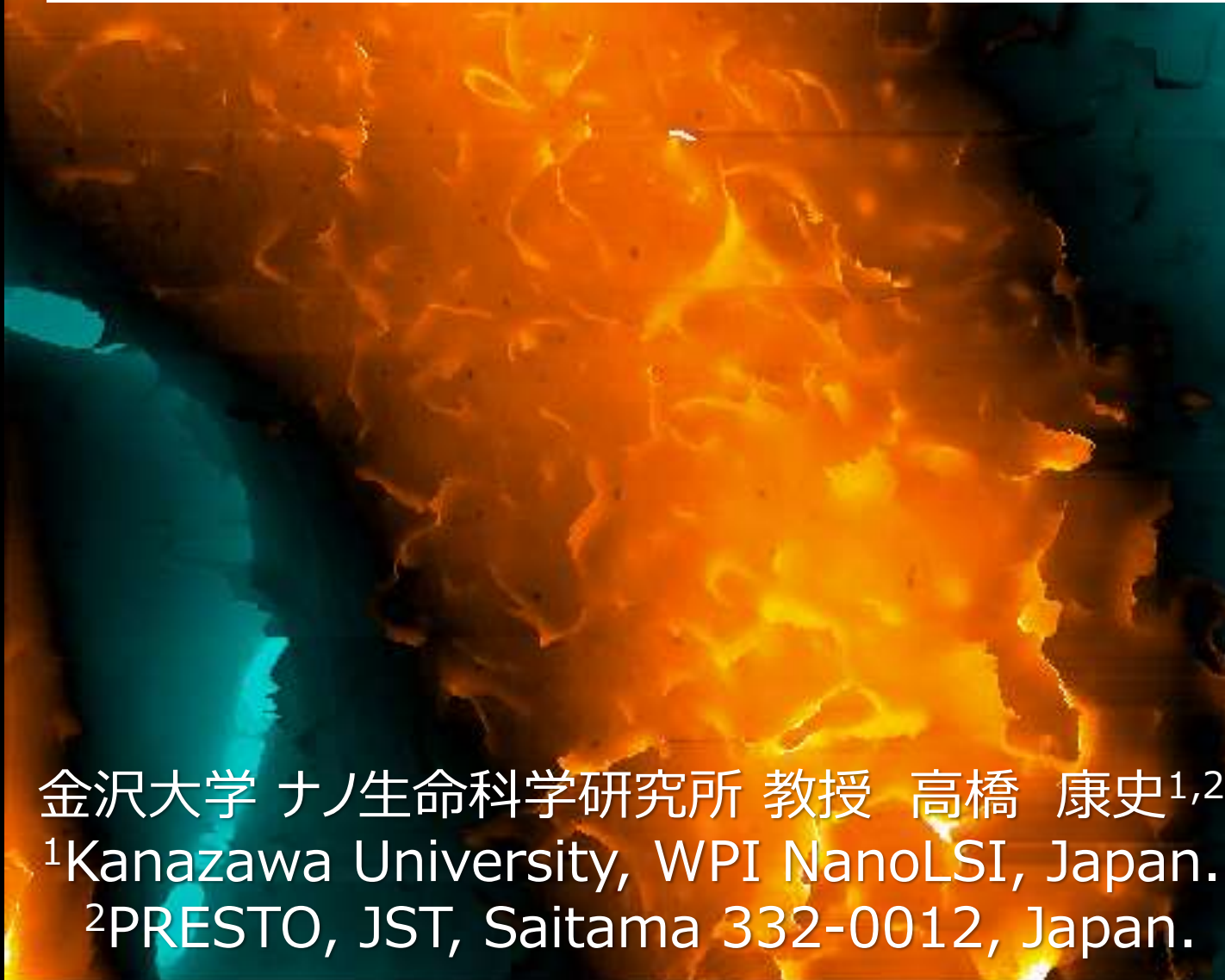
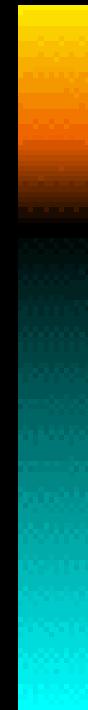


機能性イメージングを実現する 次世代プローブ顕微鏡技術



6 μm



0 μm

金沢大学 ナノ生命科学研究所 教授 高橋 康史^{1,2}

¹Kanazawa University, WPI NanoLSI, Japan.

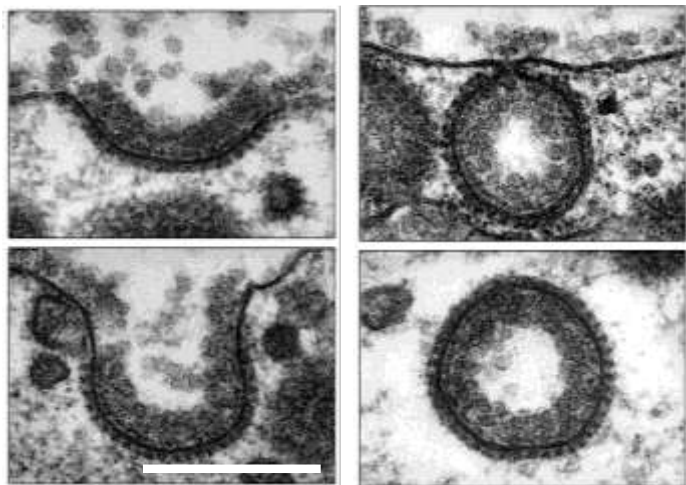
²PRESTO, JST, Saitama 332-0012, Japan.

512 × 512 points
20 × 20 μm

ナノスケールの形状と化学物質の濃度プロファイルをリンク

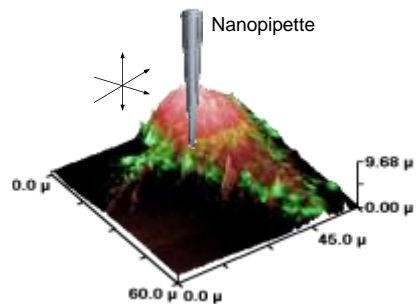
静的な細胞の評価

動的な細胞の評価

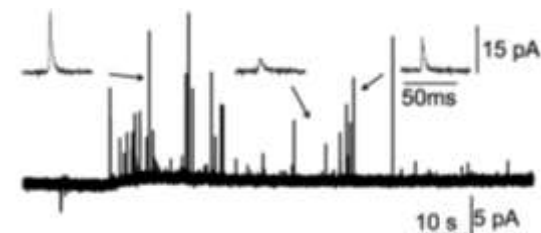


120 nm

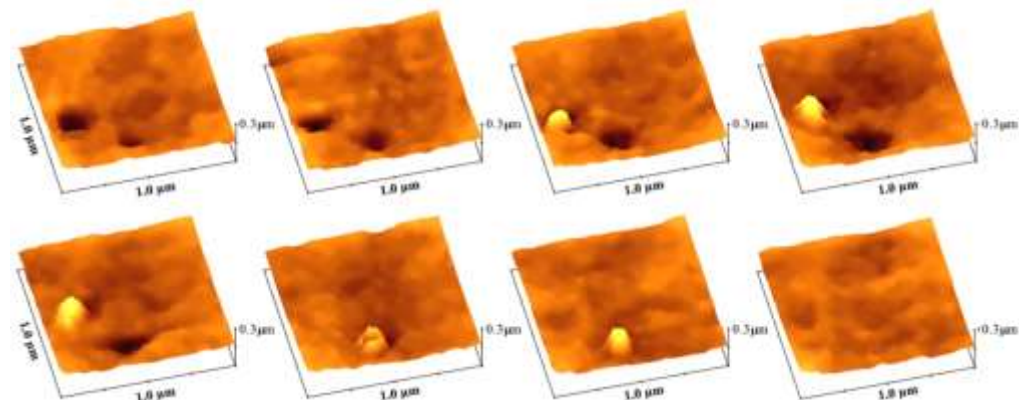
個々の情報の
張り合わせ



その場でのセンシング技術



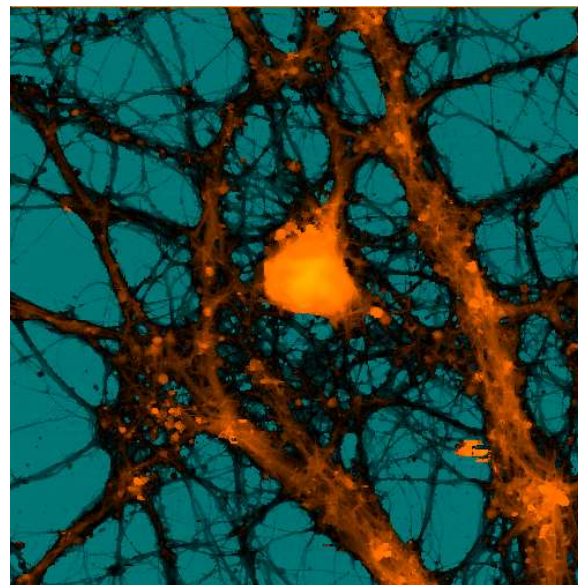
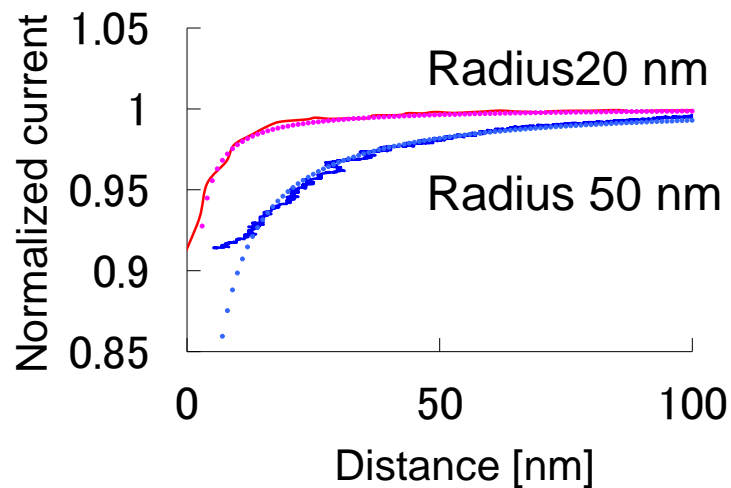
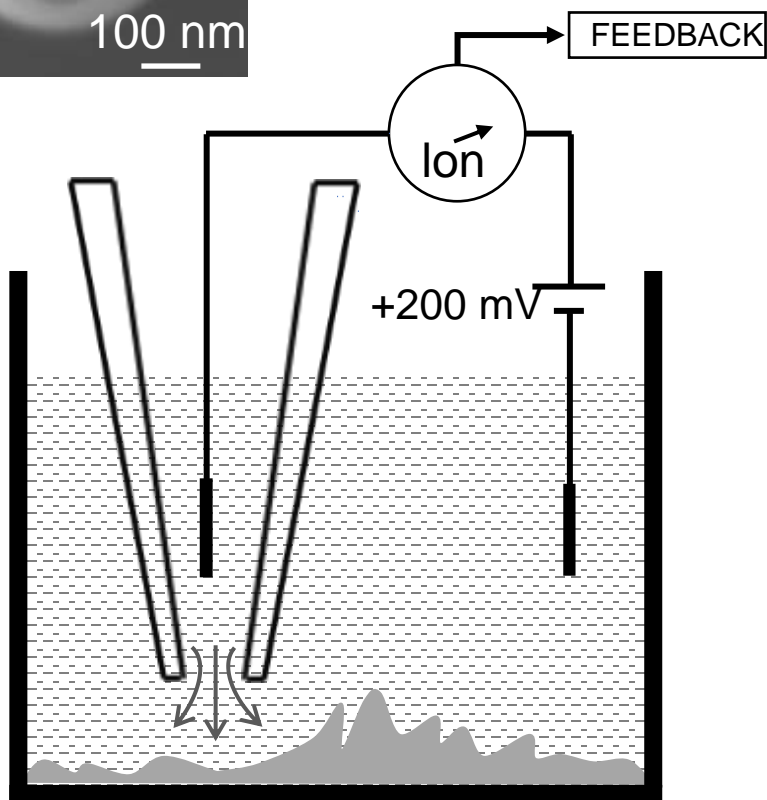
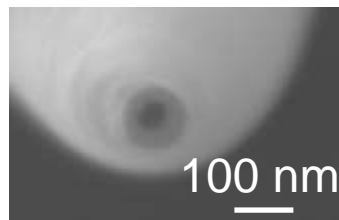
局所刺激を行う“摂動技術”



ナノスケールでの連続的な形状測定技術

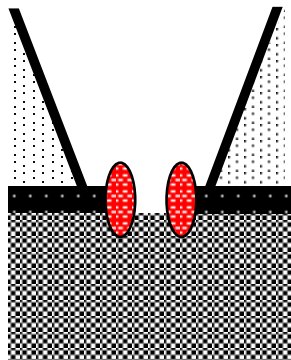
独自に開発している走査型プローブ顕微鏡による 細胞の局所分析

走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) とは

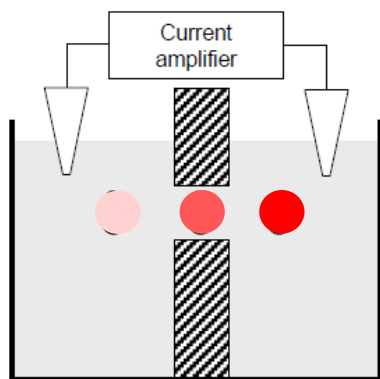


100 × 100 um

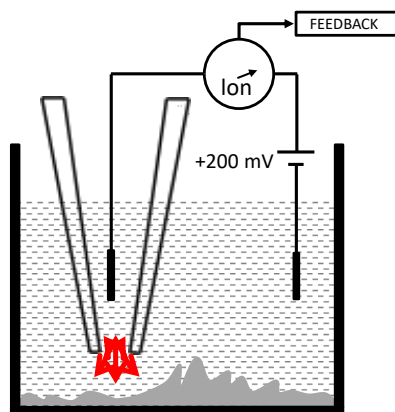
微小空間におけるイオン電流計測方法と計測対象



パッチクランプ
チャンネルの開閉

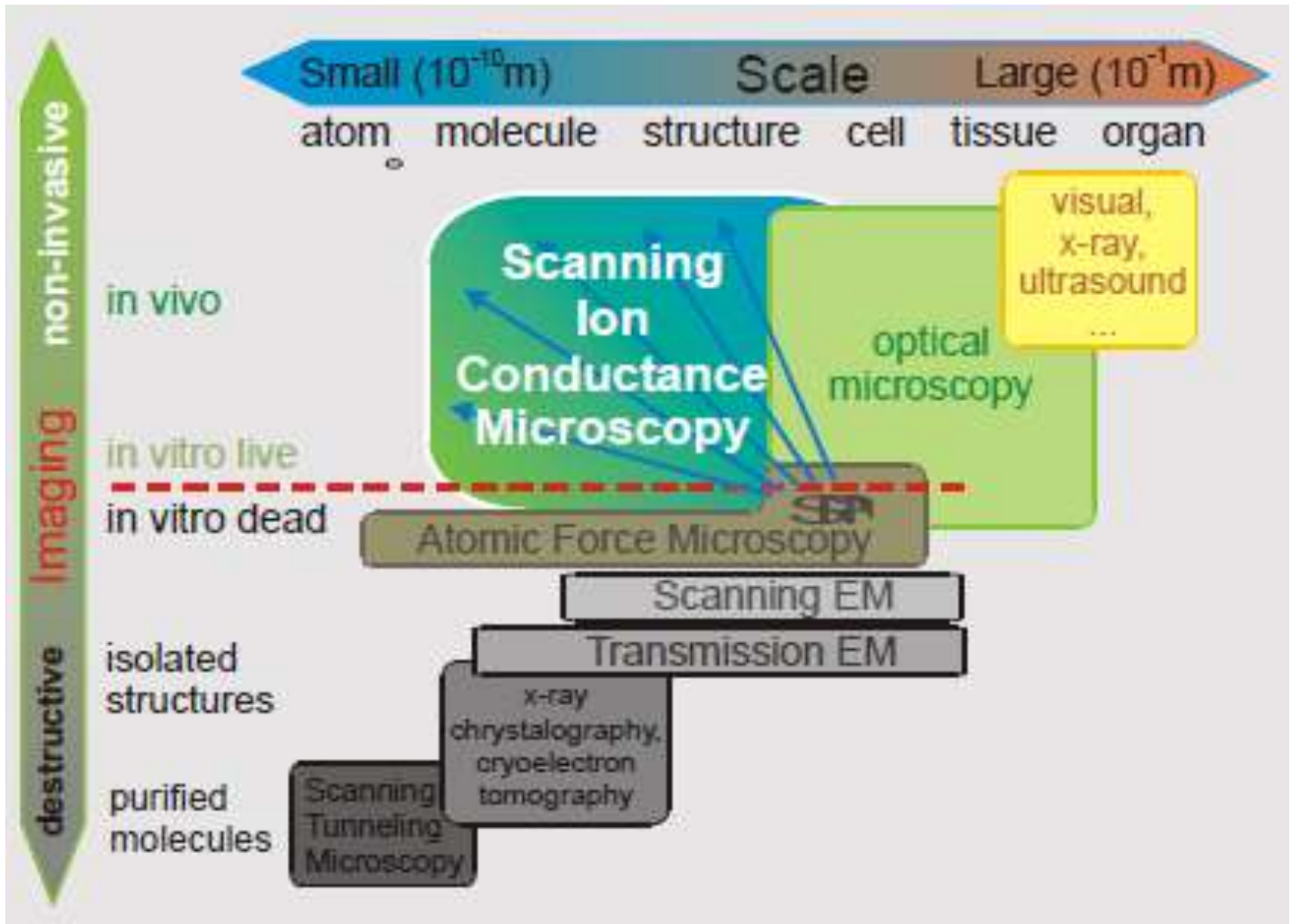


ナノポアセンサー
検出物の通過



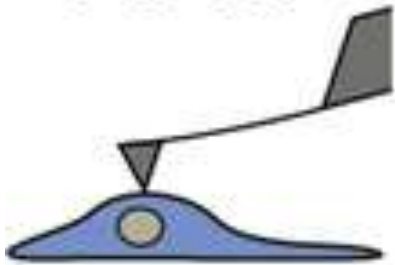
SICM
イオンの移動しやすさ
位置の制御

イメージングの分解能と測定環境



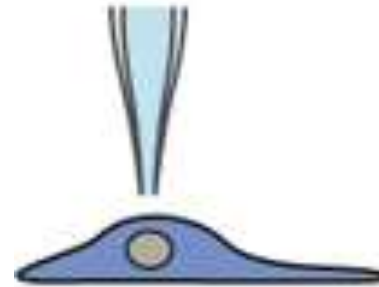
SICMとAFMの比較

AFM



カンチレバーの
共振周波数
数MHz

SICM

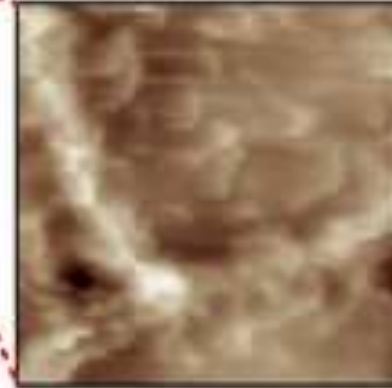
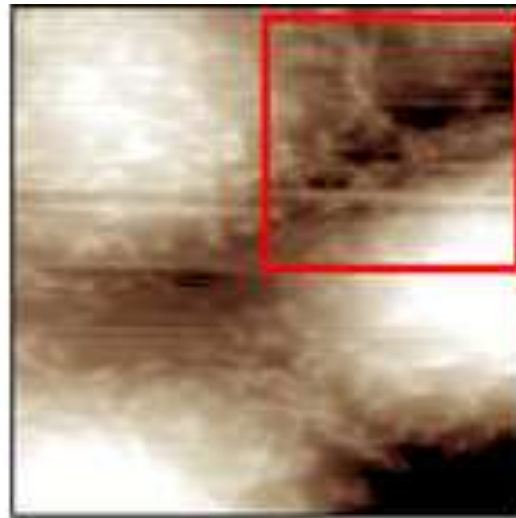


電流計測
数kHz～数十kHz

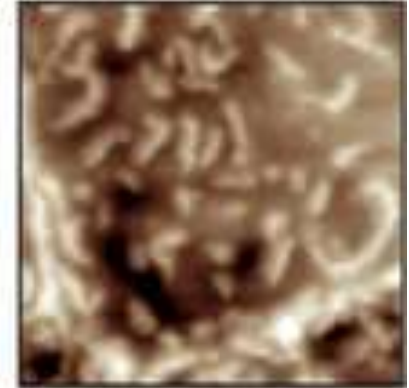
高解像度化と高速化はトレードオフ

SICMとAFMの比較

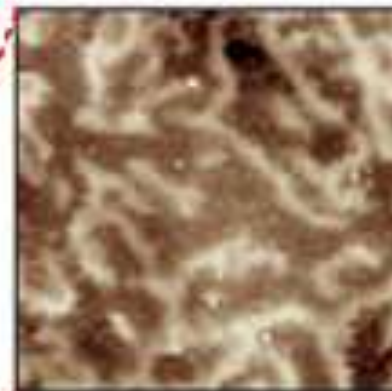
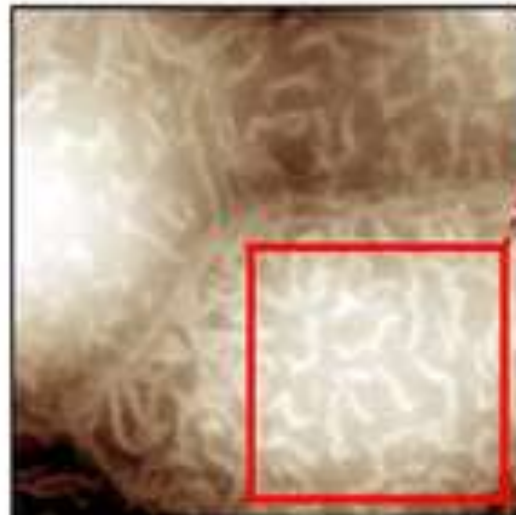
(測定例)



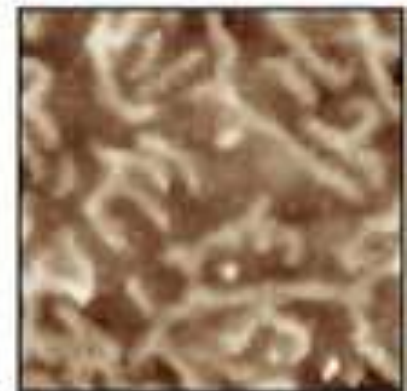
living



fixed



living



fixed

Jan Seifert, et al., *Langmuir*, 2015,
31 (24), pp 6807–6813

阻害剤の評価

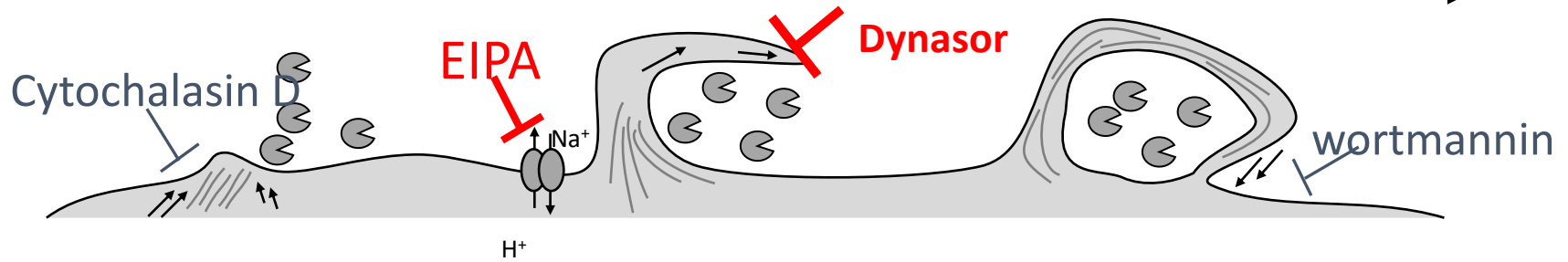
(SICMによる測定例)

Actin filaments

polymerization

Ruffling

Ruffle fusion



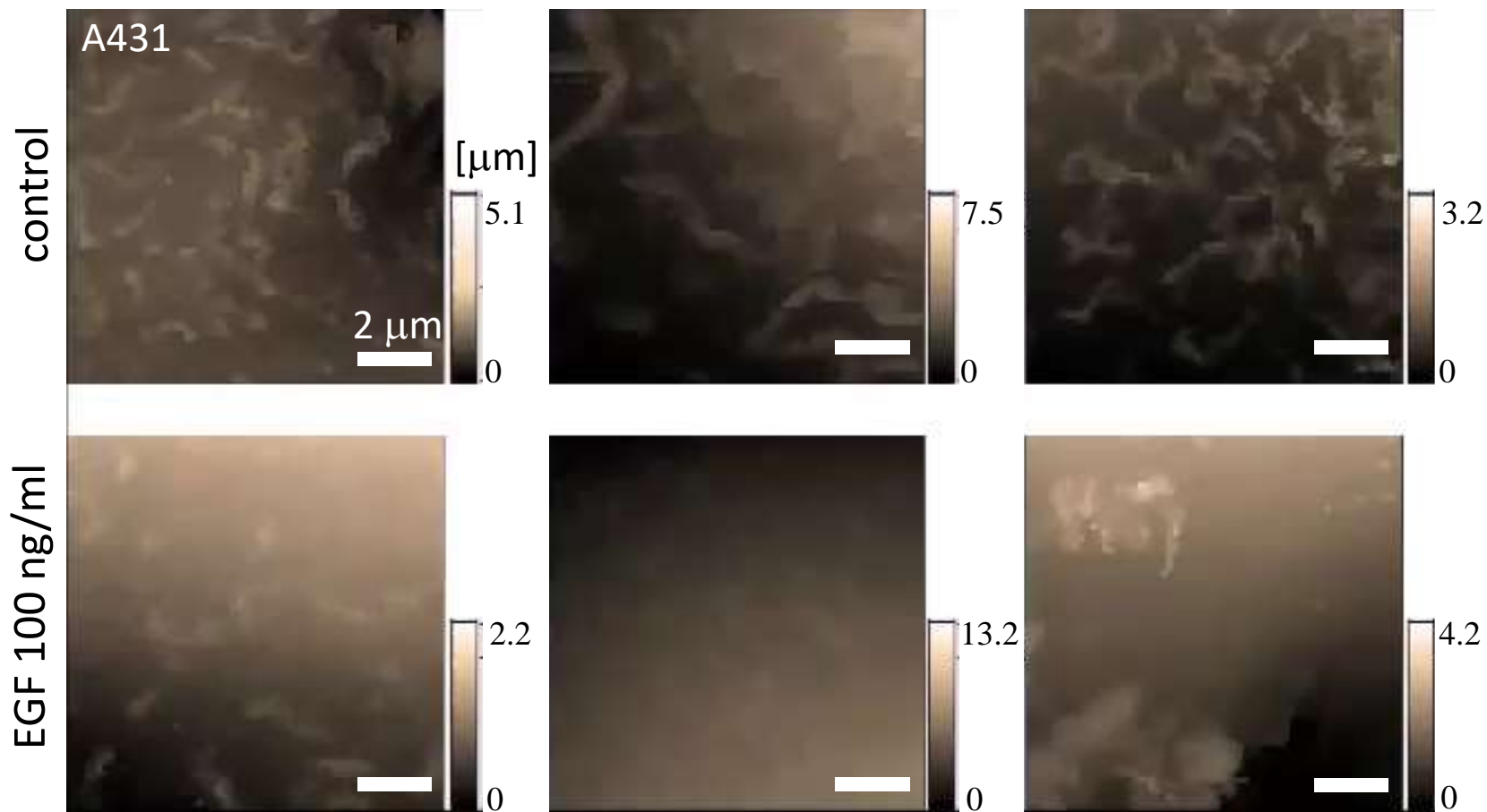
10 X 10 um, Time 137.30 min



10.00 X 10.00 um, Time 0.00 min



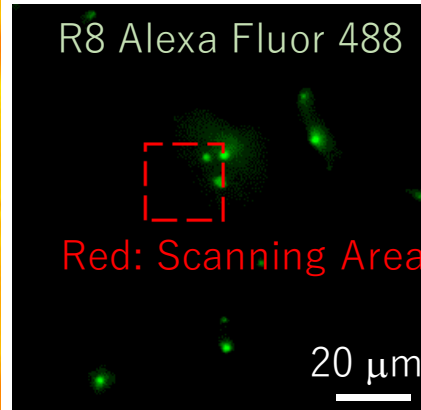
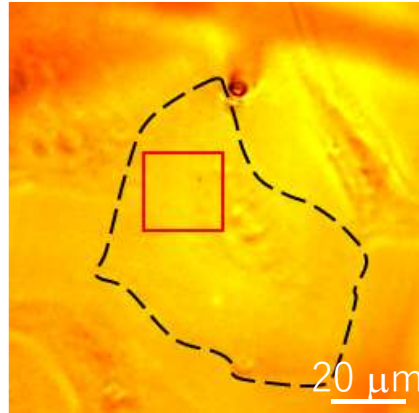
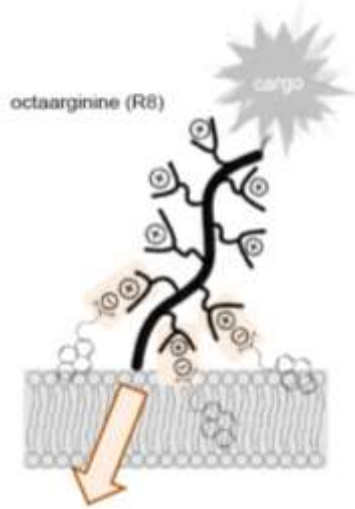
(SICMによる測定例) 成長因子と形状の関係



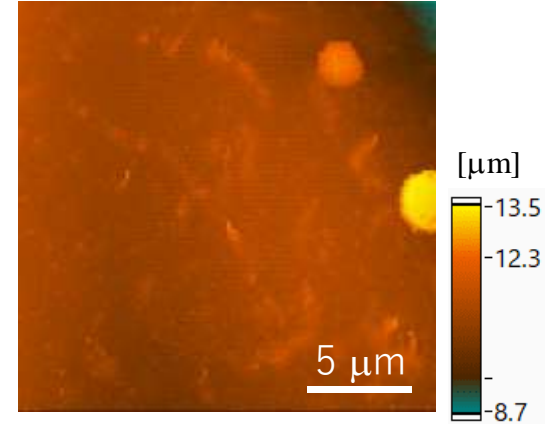
20 s/ image; $10 \times 10 \mu\text{m}$

(SICMによる測定例) 細胞とペプチドの相互作用

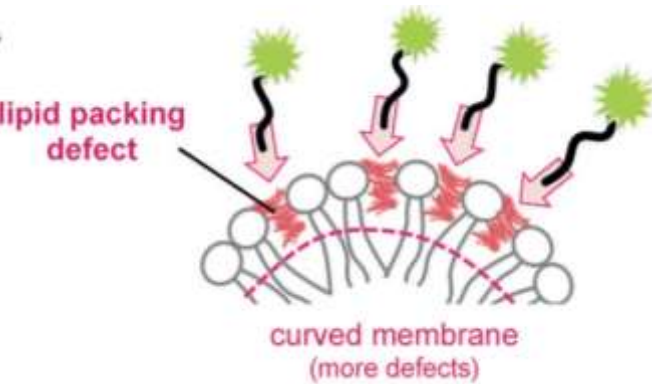
Electrostatic interaction



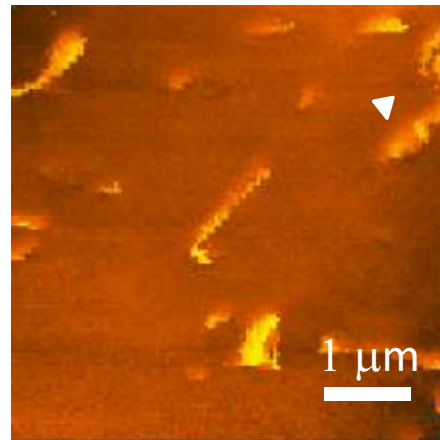
SICM Imaging



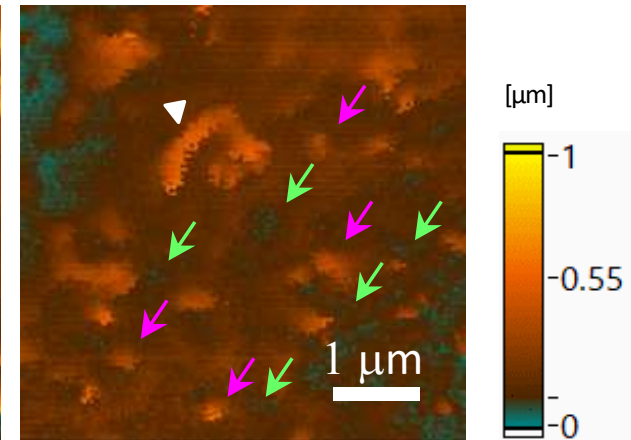
Change the cell curvature



Before treatment



After treatment



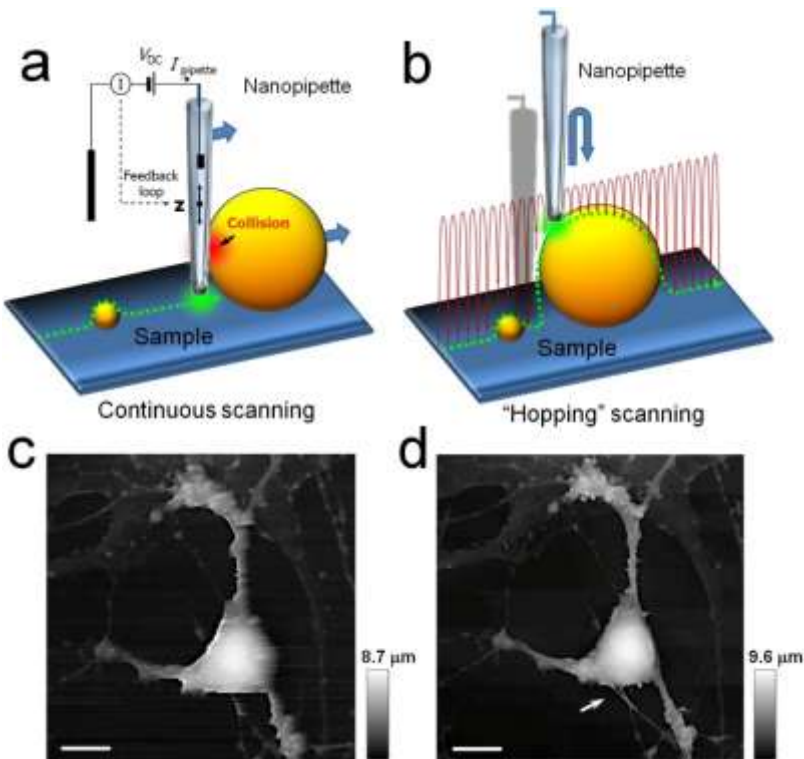
R8の流入点（こぶ状の領域）を可視化
膜曲率の変化だけでなく微絨毛様の構造体が増加

Angew. Chem. Int. Ed.
2017, 56, 7644.

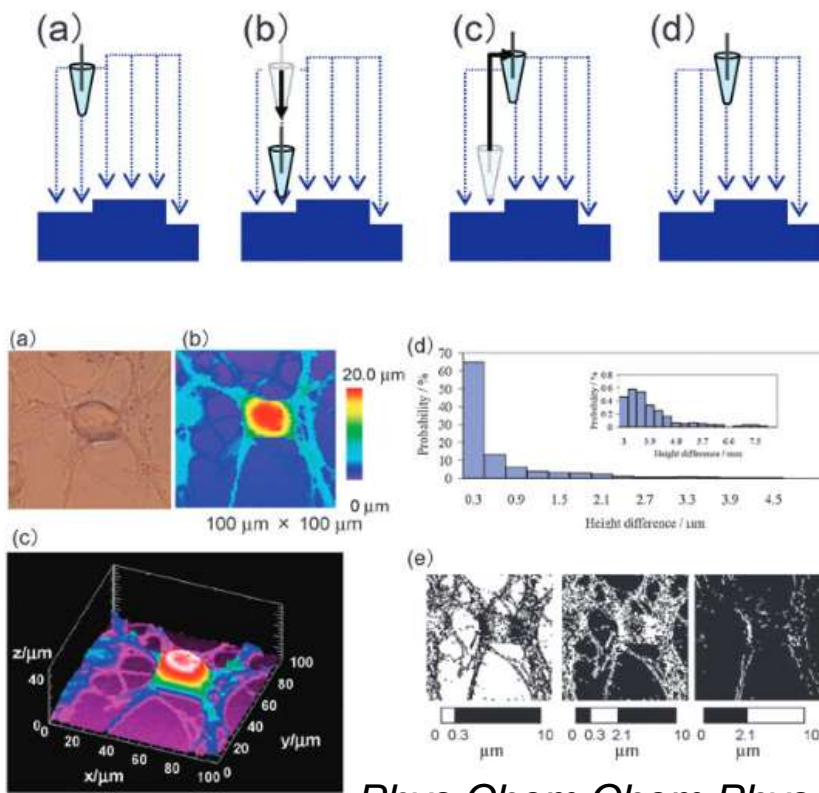
ホッピングモード SICM

Korchev group

My work



Nature Meth (2009) 6: 279-281



Phys.Chem.Chem.Phys., (2010)
,12: 10012-10017.

ホッピングモードでは、ピペットと試料が接近しすぎないように、イオン電流の減少量に閾値を設定し、探針を引き上げる距離を調節することで、凹凸の激しい試料表面、更には生きた細胞の動的観察も可能。

時間分解能の向上

Approach speed
50 nm/ms

Imaging time
20 min

Nat. Methods **2009**, 6 (4), 279-281.

500 nm/ms

15 s/32 × 32 points=14.6 ms/point

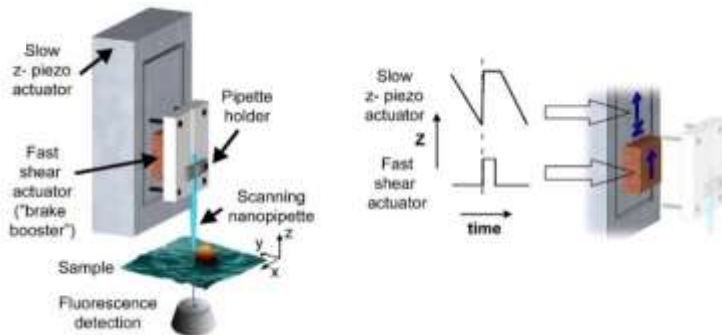
J. Cell Biol. **2012**, 197 (4), 499-508.

15 s/32 × 32 points=14.6 ms/point

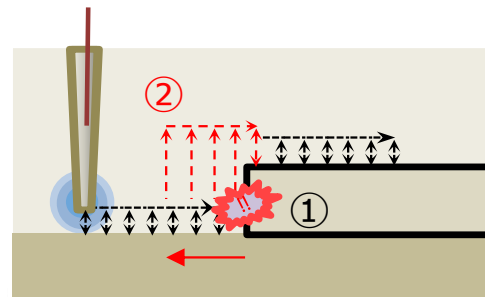
Nano Lett. **2014**, 14 (3), 1202-1207.

18 s/64 × 64 points=4.4 ms/point

Anal. Chem. **2017**, 89 (11), 6015-6020.



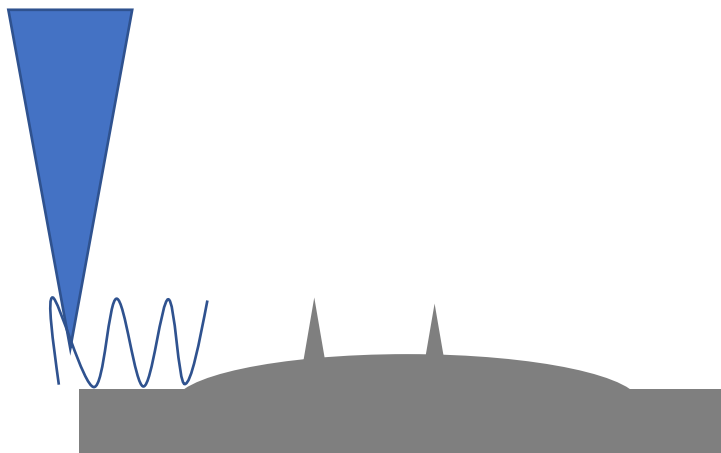
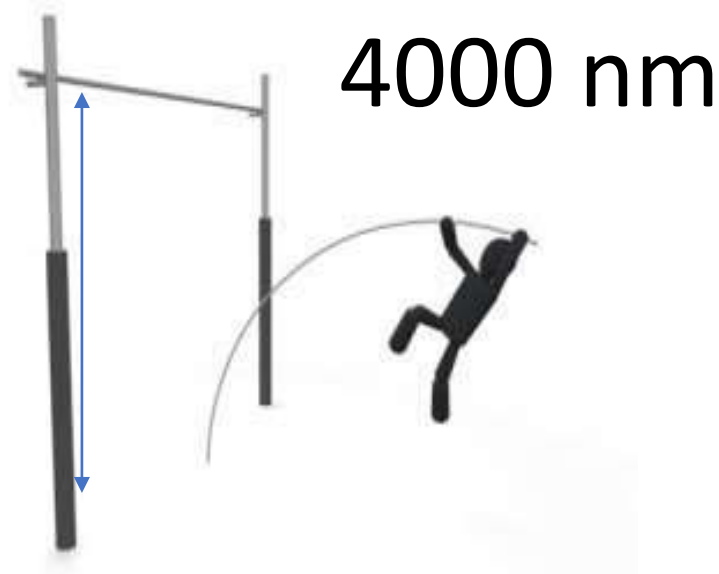
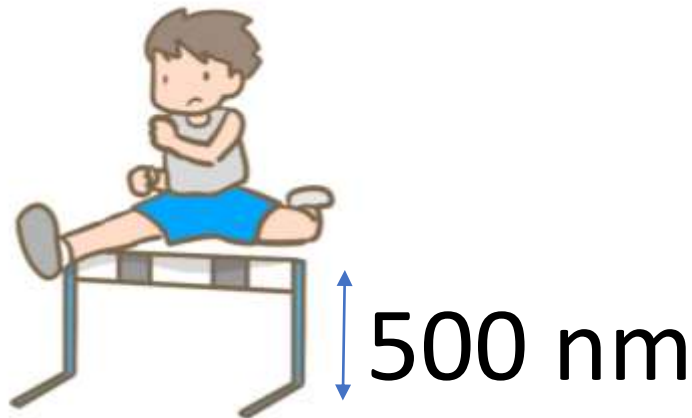
New scanning method



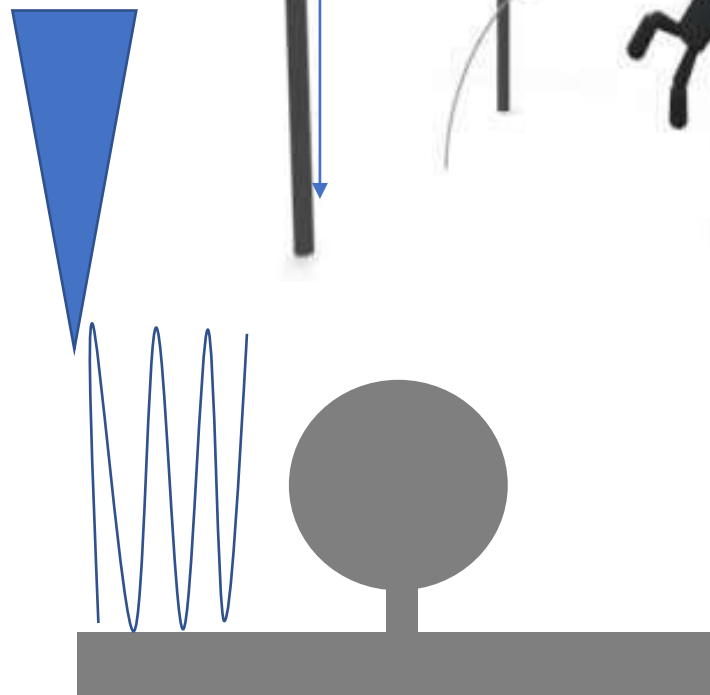
1200 nm/ms

9 s/64 × 64 points=2.2 ms/point

課題：凹凸の著しい計測



Microvilli imaging



Neuron imaging

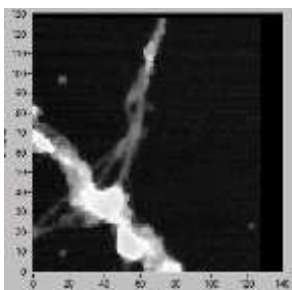
新技術

課題の解決法 1

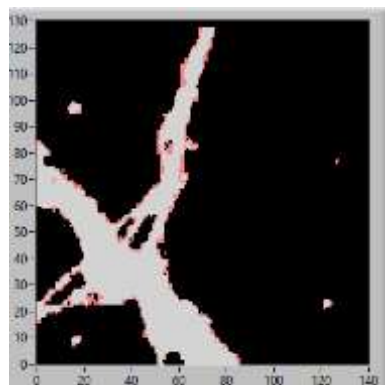
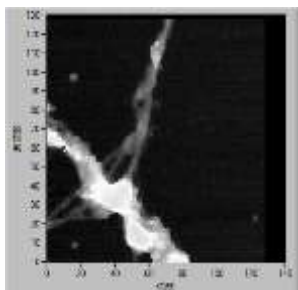
計測領域を絞ることで高速イメージングを実現

特許第6842750号

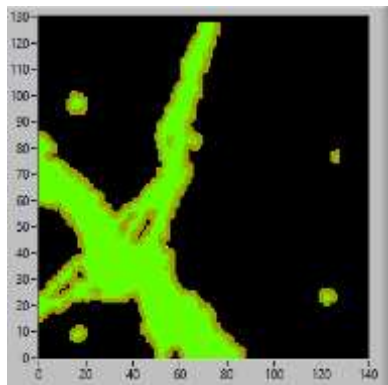
1回目



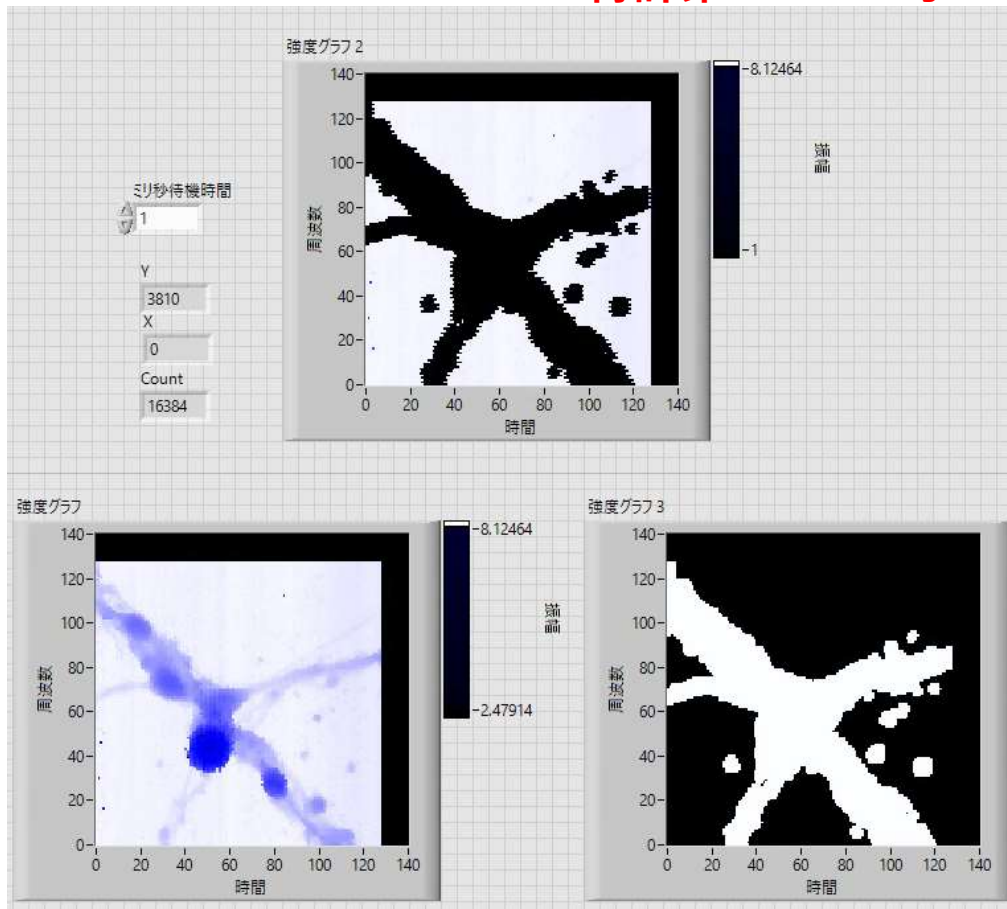
2回目



1,2回目のオーバー
プロット



1回目の画像に肉付け
(変化領域をカバー)



2-4倍の高速化に成功

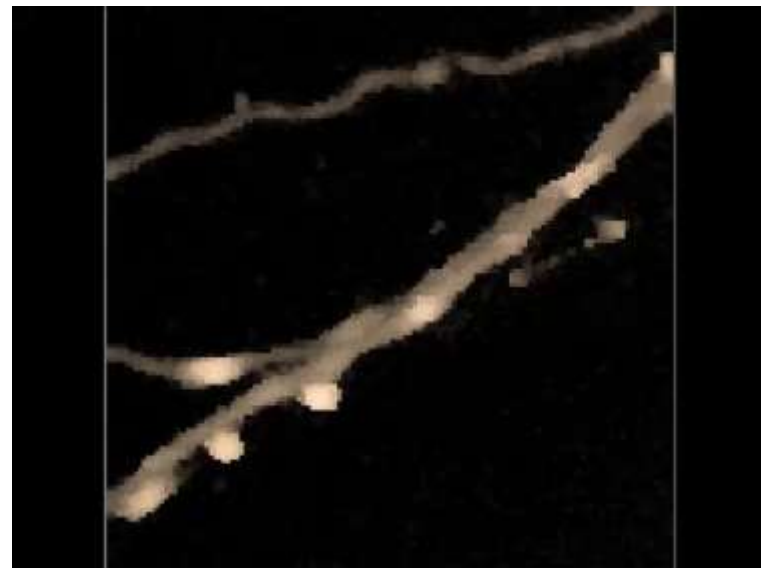
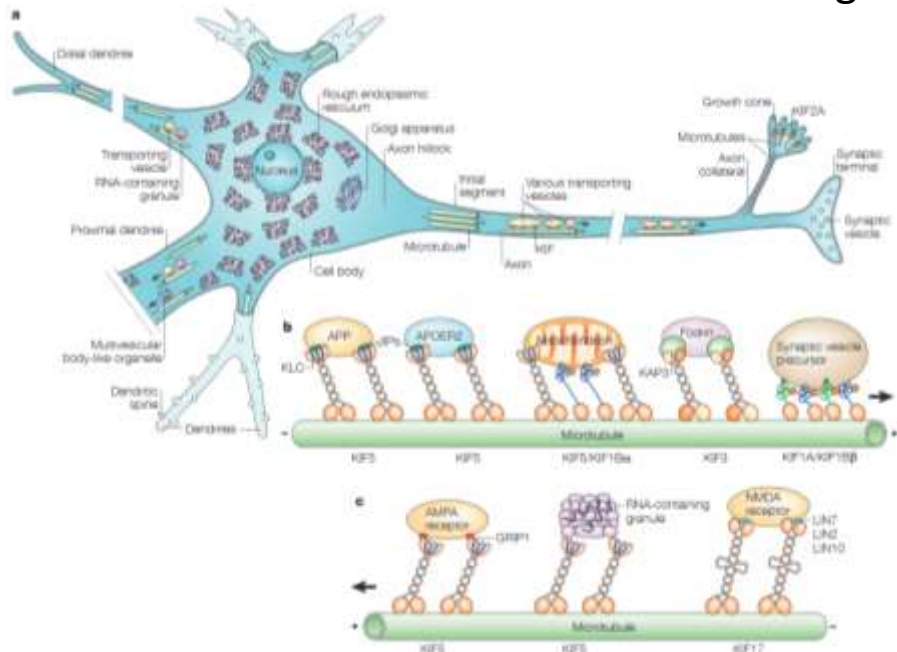
今後は、変化の起きる場所に重みを付けて連続的に高さを計測する

Takahashi, et al., *Anal. Chem.* 2020, 92, 2, 2159-2167

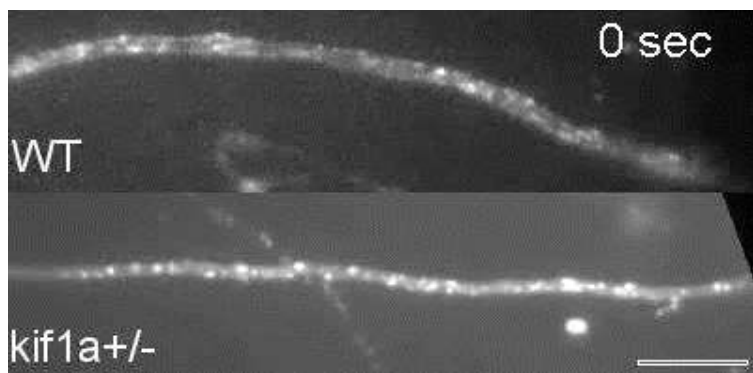
神経細胞内でのカーゴ輸送

領域を絞った測定例

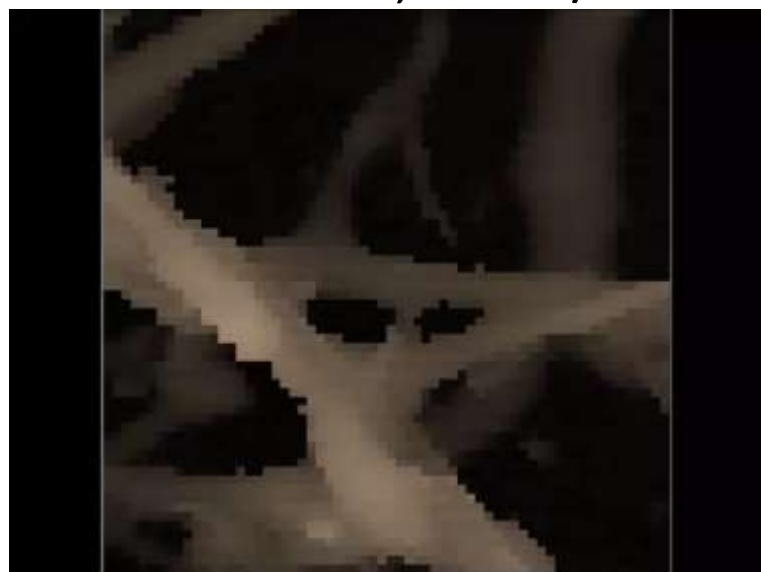
Professor Hirokawa group



15 × 15 μm, 3 min/Frame



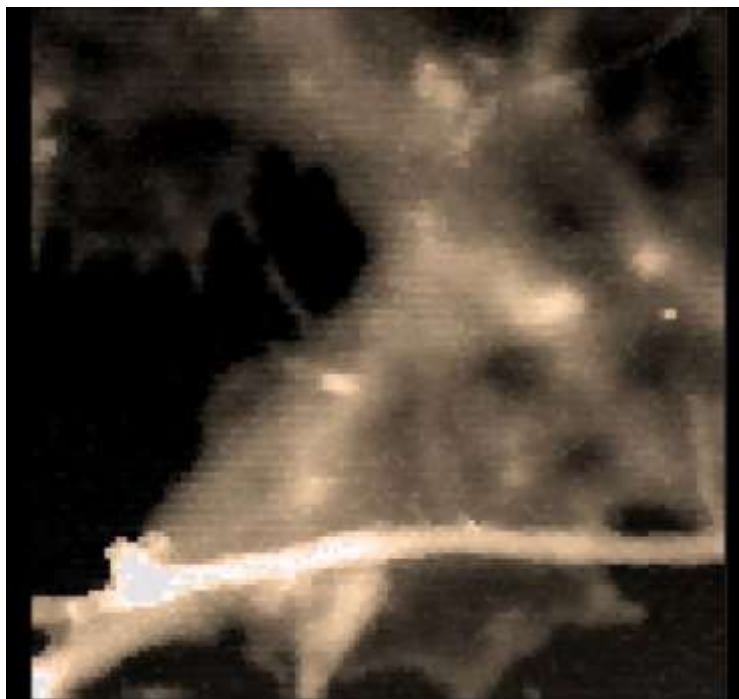
5 μm



5 × 5 μm, 1 min/Frame

領域を絞った測定例

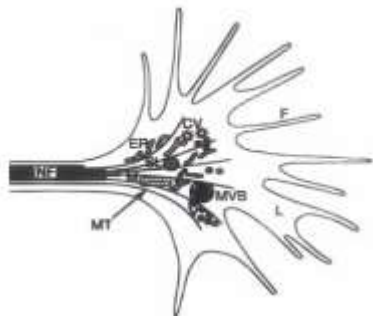
測定例神経細胞の連続イメージング



15 × 15 um, 4 min/Frame
plasmalemmal precursor vesicles (ppvs)



5 × 5 um, 1 min/Frame



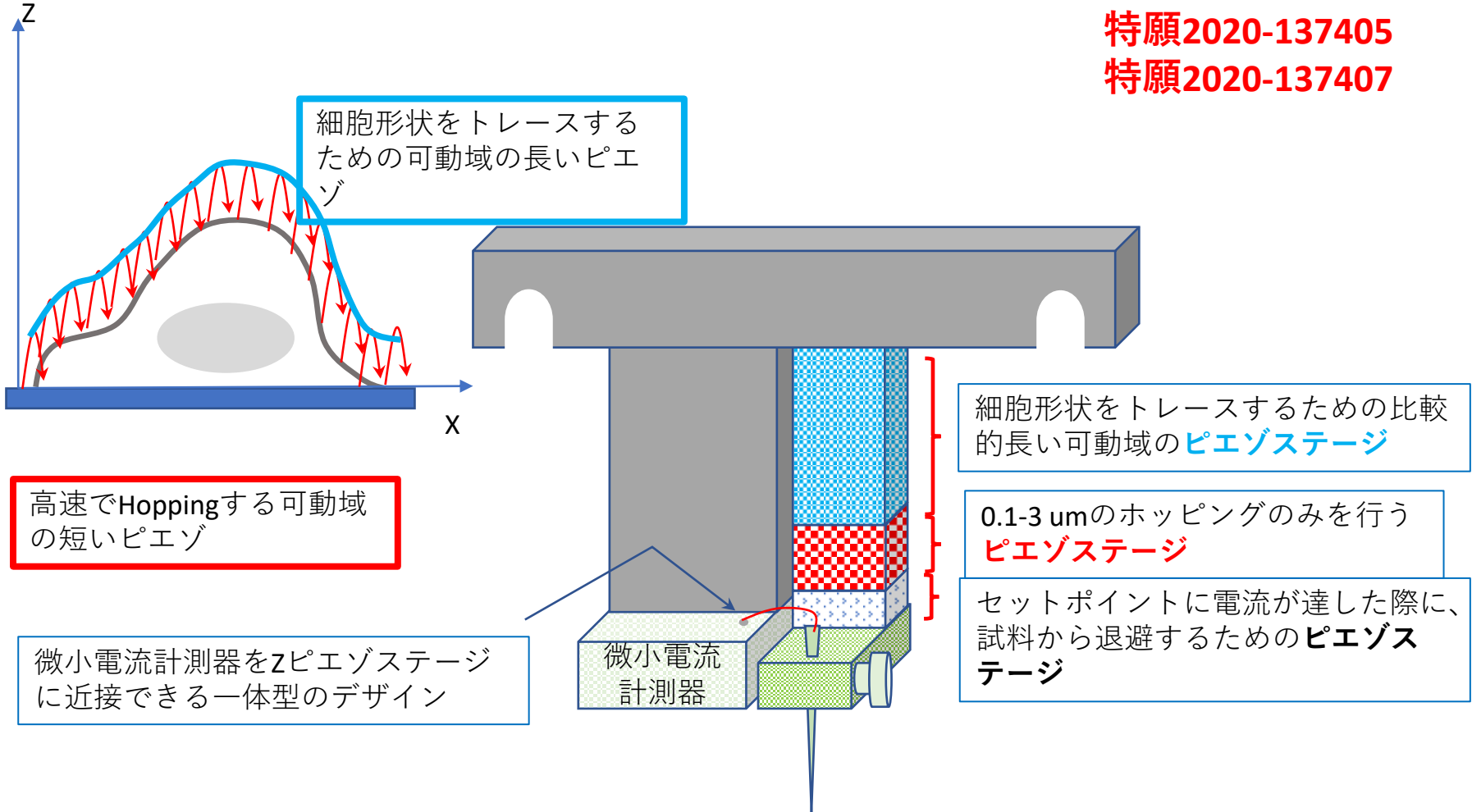
新技術

課題の解決法 2

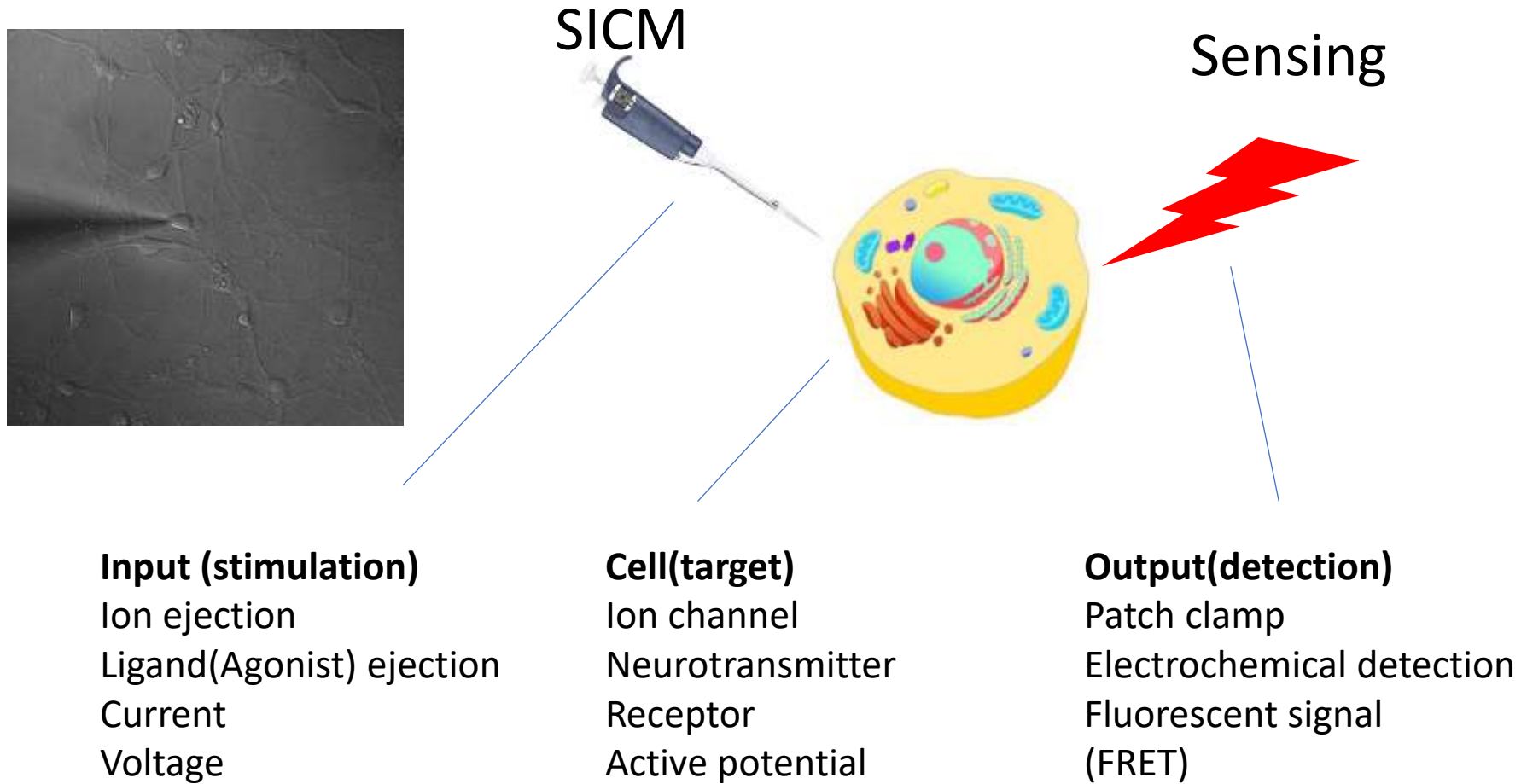
高速駆動可能なZ軸ステージ

特願2020-137405

特願2020-137407



細胞の機能性イメージングの戦略



SICMは形状イメージングツールにとどまらない生体センシングの可能性を有する

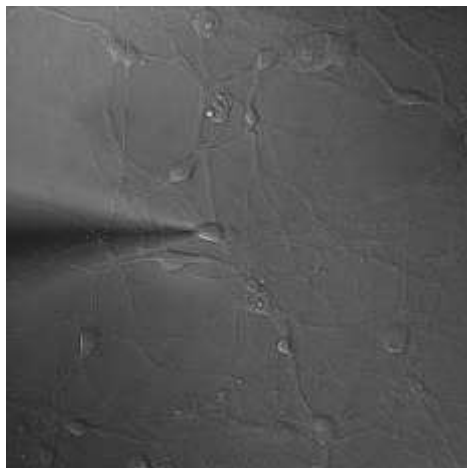
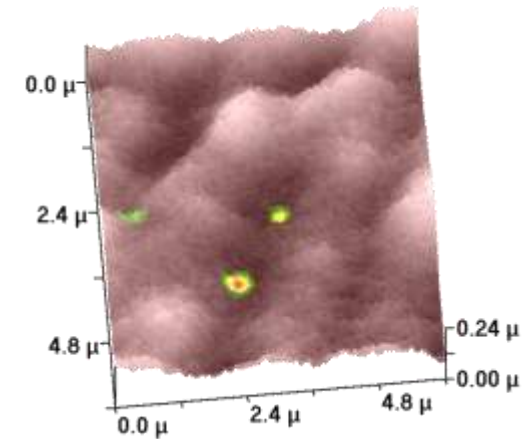
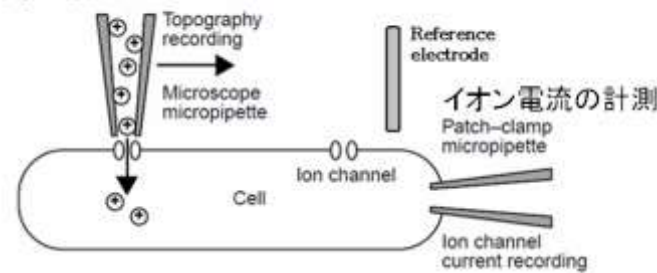
化学物質の局所投与



イオンチャネルのマッピング (SICM+パッチクランプ)

Nature Cell Biol 2, 616-619 (2000).

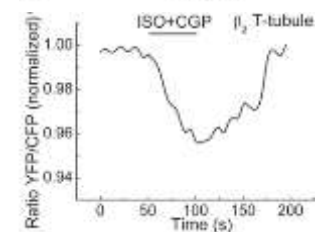
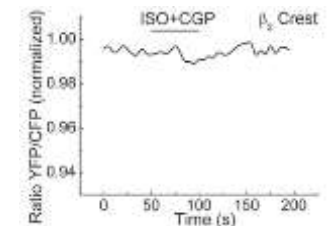
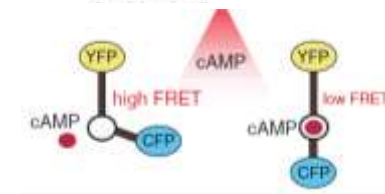
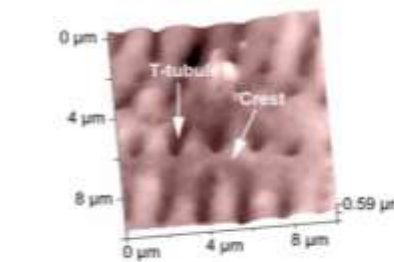
形状測定/カリウム
イオン放出



受容体のマッピング (SICM+FRET)

Science 327, 1653-1657 (2010).

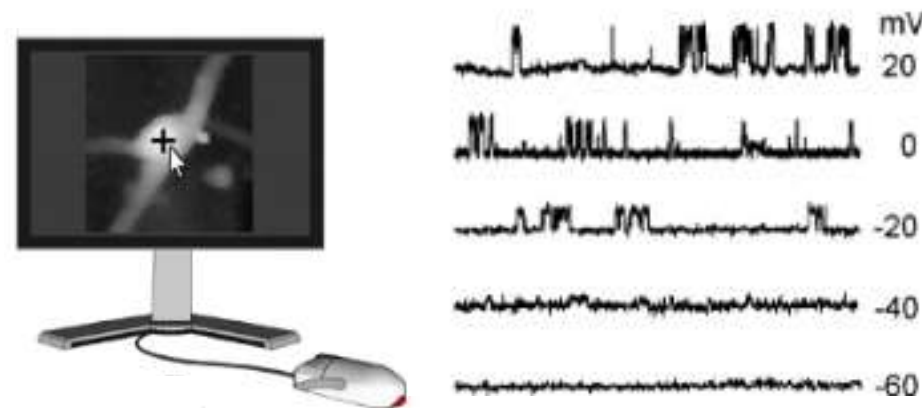
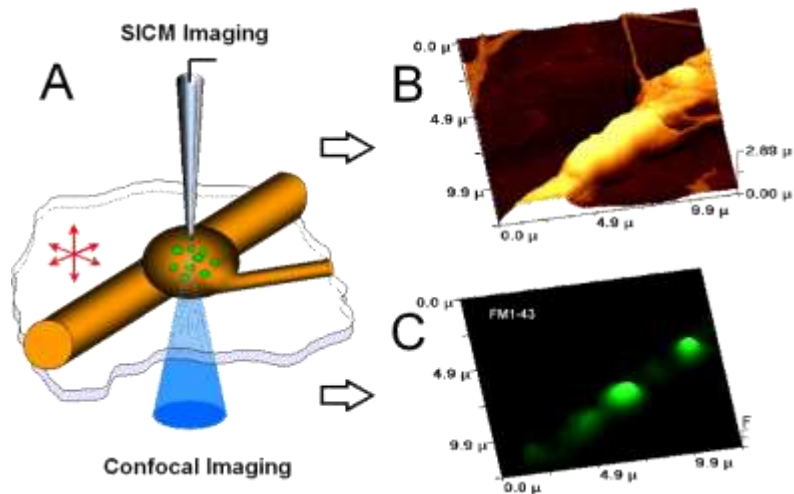
- ①リガンドを局所投与
- ②cAMPの濃度が変化
- ③FRETシグナルの減少



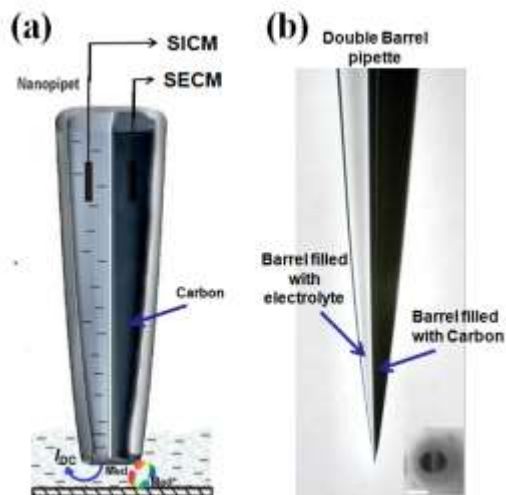
他の分析との融合

表面共焦点イメージ

局所パッチクランプ



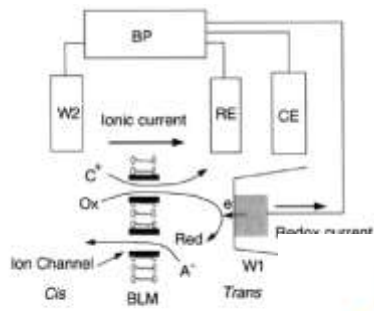
Neuron 79, 1067 (2013).



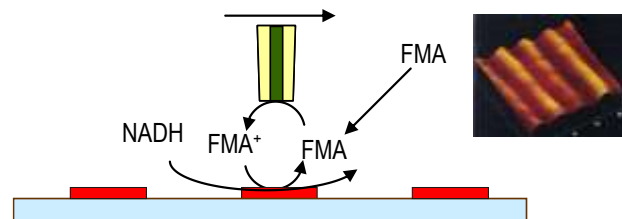
SICMに電極を搭載 ナノ電気化学顕微鏡

走査型電気化学顕微鏡 (SECM)

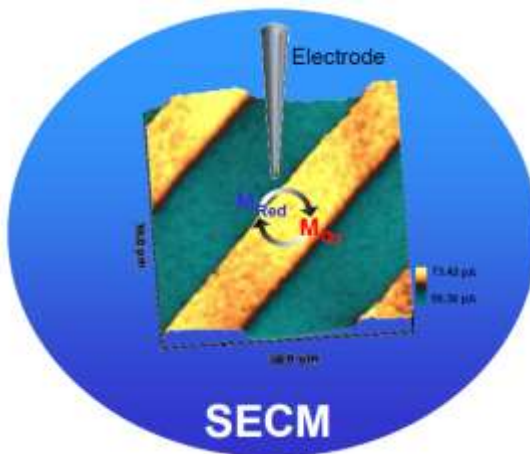
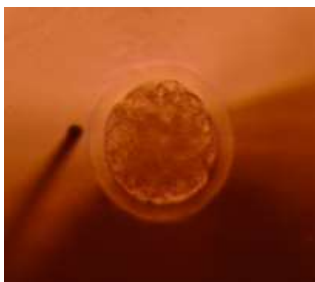
Membrane permeability 1994



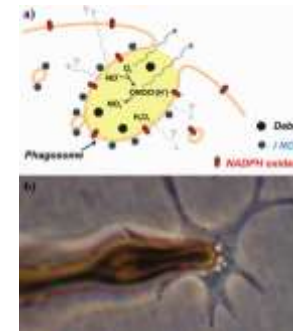
Enzyme Reaction 1996



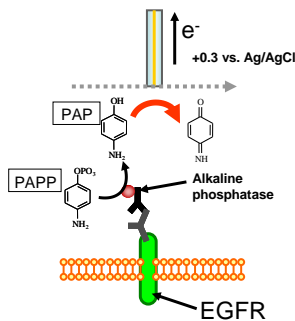
Embryos Respiration 2001



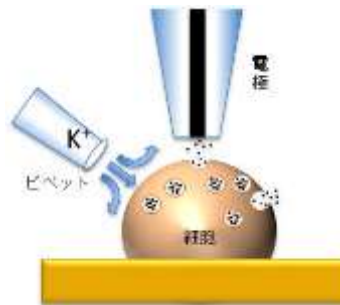
Nitric Oxide 1990



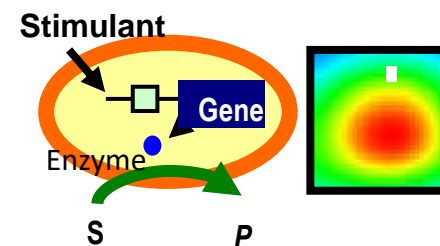
Membrane Protein 2009



Neurotransmitter 1983



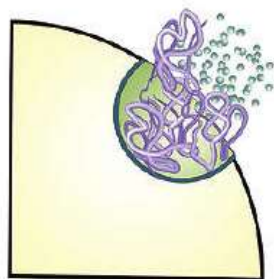
Gene Expression 2004



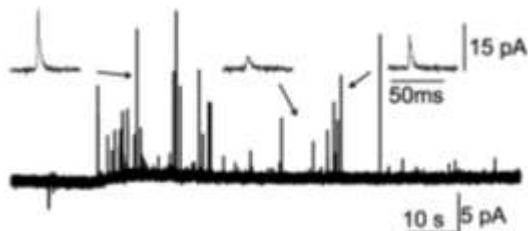
SECMの利点

時間分解能が広範囲に及ぶ (ミリ秒から数日の事象を計測可)

ミリ秒

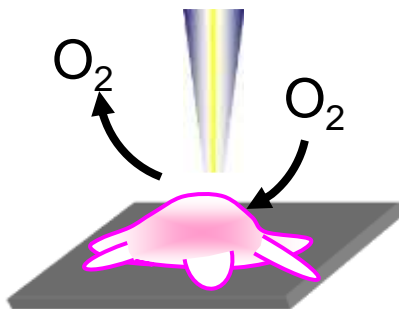


神経伝達物質

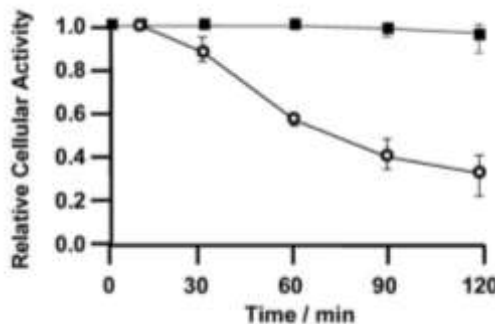


Takahashi, Y. et al.
Angew. Chem. Int. Ed.
50, 9638-9642 (2011).

秒～分



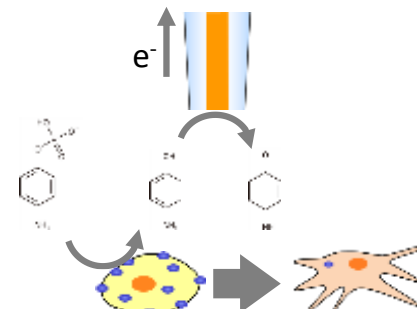
呼吸活性



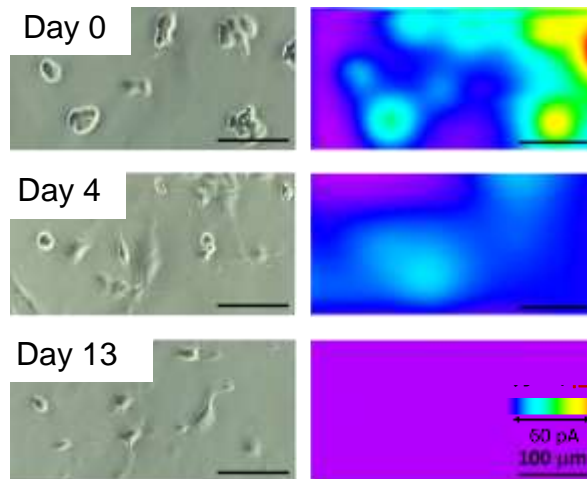
薬物感受性

Anal. Chem. **2003**,
75 (9), 2154-2158.

数日



タンパク質 (酵素) の発現

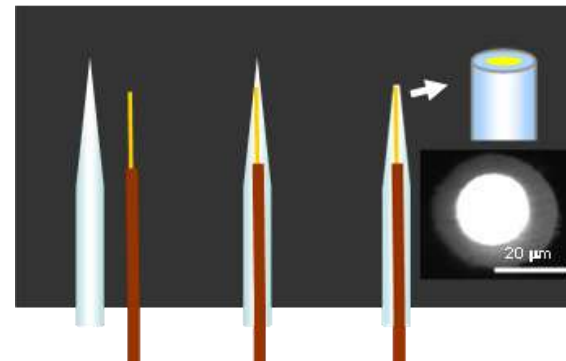
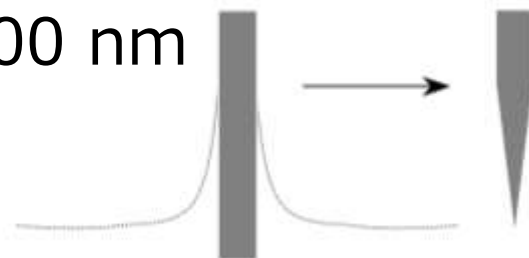


Matsumae, Y., Takahashi, Y.
et al. *Chem. Commun.* **49**,
6498-6500 (2013).

電極作製

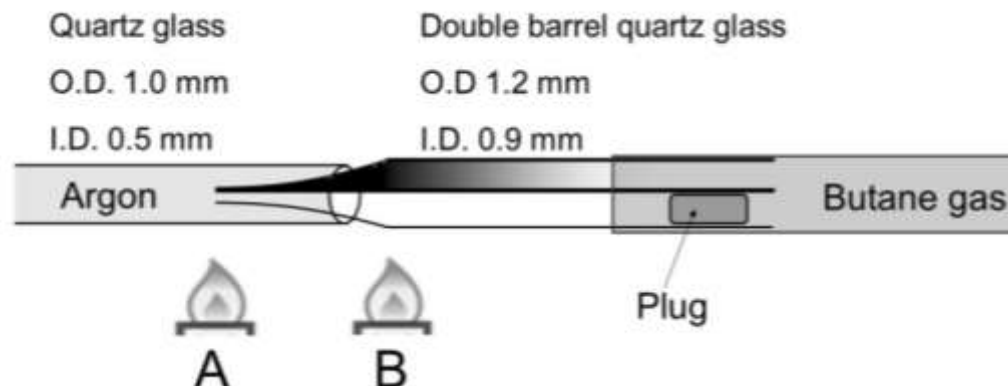
① 金属を細線化する

半径 10,000 nm



② ガスをカーボンにする

半径 100 nm
以下



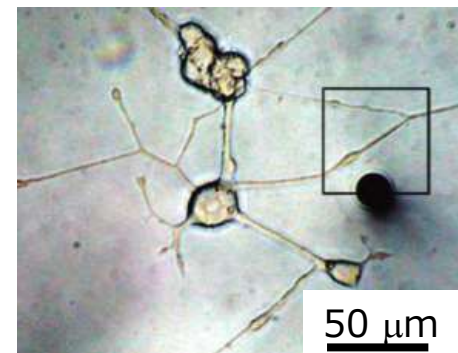
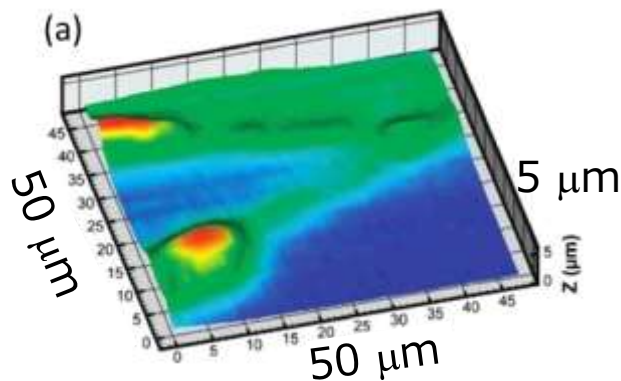
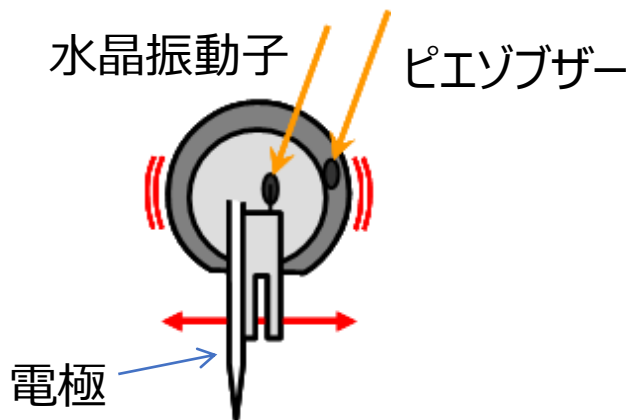
Takahashi, Y., et. al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 9638-9642 (2011)

特開2010-261923(P2010-261923A)

3分でナノ電極が簡便に作製可能

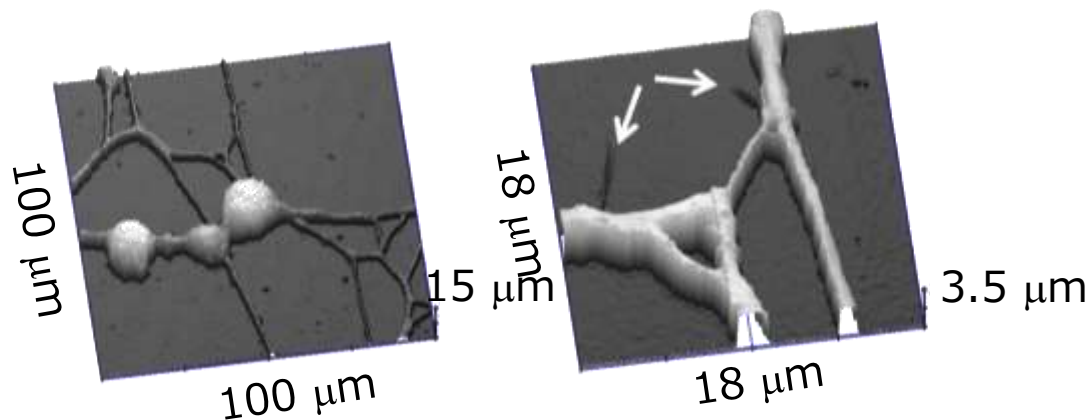
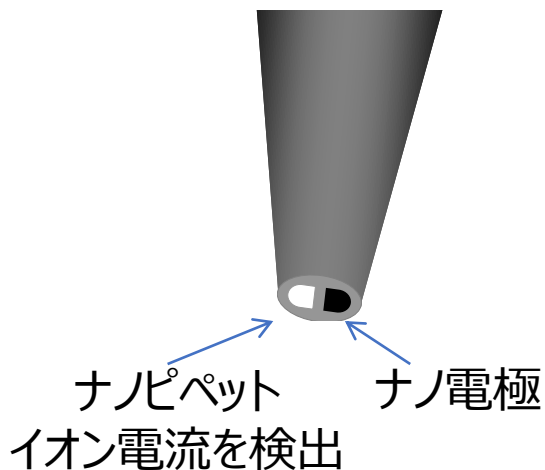
電極 - 試料間距離制御

① 従来法 “力” を利用



Anal. Chem., 77, 1111 (2005).

② “電流” を利用



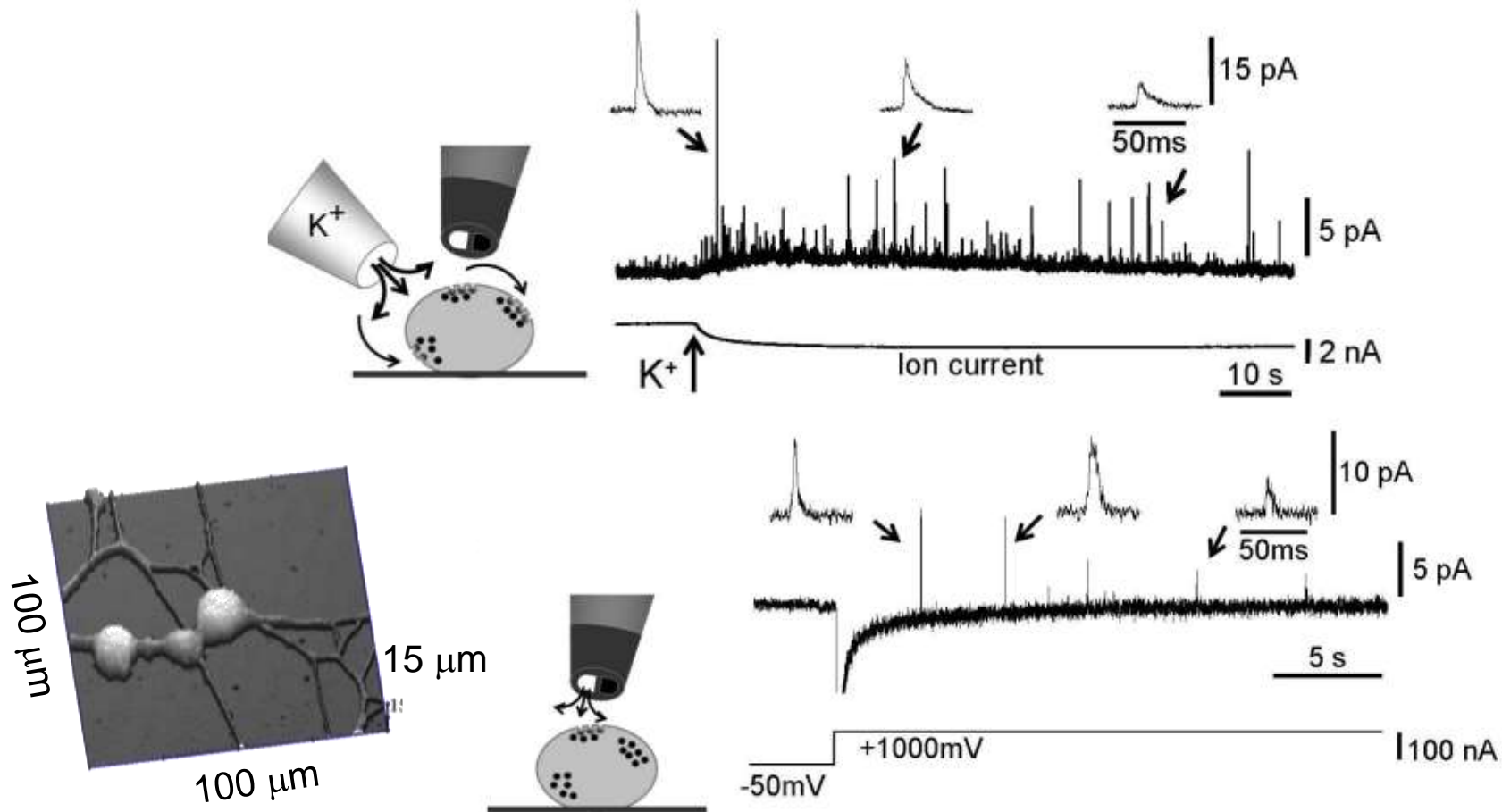
Takahashi, Y., et. al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 9638 (2011).

光で見るとも鮮明

SECMによる測定例

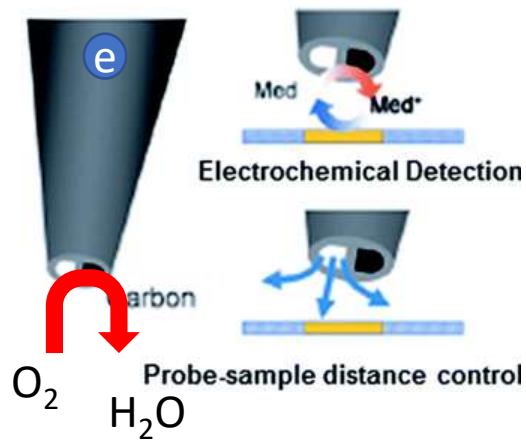
局所的な刺激と神経伝達物質の計測

• Local K⁺ stimulation



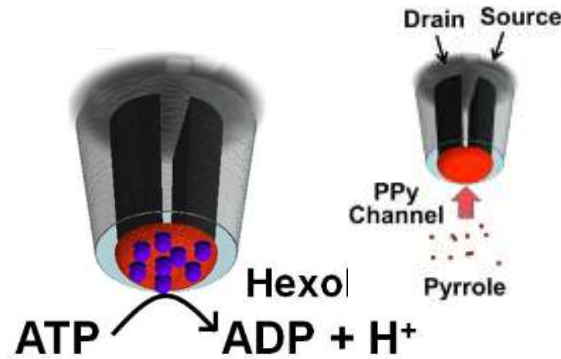
ケミカルの検出の戦略

Electrochemical detection



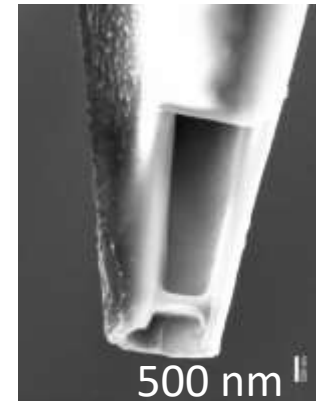
Sensitivity	△
Selectivity	◎
Resolution	◎
Response	◎

Electron conductance detection



Resolution	×
Sensitivity	◎
Selectivity	○
Response	×

Ion conductance detection



Resolution	◎
Sensitivity	◎
Selectivity	△
Response	◎

新技術の特徴・従来技術との比較

- これまでのプローブ顕微鏡のほとんどが構造を可視化するものであった。
- 新技術は化学物質の濃度変化等をとらえることができる。
- 更にこれらの技術を確立している
 - 高速化技術（走査機構／画像処理）
 - ライブセルイメージング技術
 - 試薬に対する応答を可視化

想定される用途

液中に存在するサンプルのナノスケールの構造変化や
化学物質の濃度変化の計測

(例)

- 細胞表面の形状測定・代謝物測定
- 蓄電材料の評価
- 触媒材料の評価

(今後) ナノピペットを用いた刺激・センシングと光学
技術の融合により、シグナル伝達と形状変化の関係を
評価

企業への期待

- イメージング技術を取り扱っている企業は、本技術の導入が有効と思われる。
- 共同研究に関しても受け付けております。

本技術に関する知的財産権

特許 1

- 発明の名称 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡
- 出願番号 特願2020-137405
- 出願人 国立大学法人金沢大学
- 発明者 高橋 康史

特許 2

- 発明の名称 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡
- 出願番号 特願2020-137427
- 出願人 国立大学法人金沢大学
- 発明者 高橋 康史

本技術に関する知的財産権

特許3

- 発明の名称 走査型プローブ顕微鏡及びその制御方法
- 特許番号 特許第6842750号
- 出願人 国立大学法人金沢大学
- 発明者 高橋 康史

お問い合わせ先

金沢大学ティ・エル・オー

TEL 076-264-6115

FAX 076-234-4018

e-mail info@kutlo.co.jp