

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

高橋康史 金沢大学理工研究域電子情報学系

1. 微小電流を利用した化学物質の電流イメージング

細胞表面の化学物質の濃度は時々刻々と変化しており、細胞の機能を理解するうえで、この変化を捉える計測手法の開発が不可欠である。Wightman 教授は、神経細胞などが放出するカテコールアミンを微小電極で酸化還元し、その電流を計測する手法を確立し、現在 *In vivo* の計測に利用している。この手法は、ms オーダーの高い時間分解能を有しており、電極が微小なため、組織上に電極を配置して計測を行うことが可能であるが、手動のマニピレータを利用するため位置と化学物質の計測データの関係性が曖昧であった。これに対して、1989年にテキサス大学の Bard 教授により開発された走査型電気化学顕微鏡 (SECM) は、ステップモータやピエゾステージを利用して、マイクロ電極を走査しながら酸化還元電流を検出する。生体試料の SECM の研究は、東北大学の末永智一教授が、1990年代前半から研究を行い、これまで細胞膜の透過性¹⁾や、呼吸量²⁾の定量評価に利用している。計測可能な化学物質は、酸素や過酸化水素など電極で酸化・還元が可能なものや、グルタミン酸など酵素反応を利用して検出するものが挙げられる。

SECM は、溶液中で拡散している化学物質を計測するため、試料の凹凸の影響を受けやすい。そのため、プローブ-試料間の距離制御が必要となる。また、解像度がマイクロ電極の半径に依存するため、電極の微細化も求められている。著者は、修士課程から一貫して SECM の開発に携わっており、解像度の向上を目指して、電極の微細化と、電極と試料との位置制御システムの開発を行ってきた。この中で、位置制御システムとして取り入れた走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) に関して、次の項目で紹介する。

2. ナノピペットを利用した非接触な形状イメージング

電極-試料間の距離制御は、試料の凹凸による形状

への影響を排除するだけでなく、電極を細胞に近接させることで、放出される化学物質を効率的に捉えることや、各測定点で得られる高さ情報から、形状イメージを同時に取得できるというメリットもある。そのため、SECM に単一細胞の形状イメージング技術を融合させることで、高解像度の SECM イメージを形状イメージと共に取得できる。

生細胞の細胞表面形状の計測に特化した技術として、SICM が挙げられる。SICM は、ナノピペットを走査型プローブ顕微鏡の探針に利用し、イオン電流を利用してピペットの位置を制御する。インペリアルカレッジロンドンの Korchev 教授が、SICM を利用した生細胞の形状測定を活発に行っている。SICM では、非侵襲的に細胞の形状イメージングを行うことや、ピペットを利用して局所的に化学物質を放出することが可能である。これまでの水平方向の分解能は、3 nm ほどの報告がある³⁾。さらに、プローブを動かす制御アルゴリズムの改良により、凹凸が他の細胞よりも著しい神経細胞などの全体をイメージング可能となった⁴⁾。また、パッチクランプ⁵⁾、共焦点顕微鏡⁶⁾とのハイブリットシステムや、高速システム⁷⁾が開発されている。著者は、この SICM と SECM の融合技術であるナノ電気化学顕微鏡の開発に 2008 年から取り組み、2010 年からは海外特別研究員として Korchev 教授のもとで開発を行い、生細胞表面の形状と化学物質の同時イメージングを行った。

3. ナノ電気化学顕微鏡の開発と PC12 のイメージング

SECM のマイクロ電極と、SICM のナノピペットの二つの機能を有するプローブとして、リング型⁸⁾と θ 型⁹⁾を開発した。ここでは、 θ 型のプローブに関して紹介する。先鋭化した θ 形状のクォーツガラスの片方のバレルに、ブタンガスを導入した状態で先端部を加熱することで、焼成カーボン層を形成し、このカーボン部分を電極として使用した。この手法は、特別な装

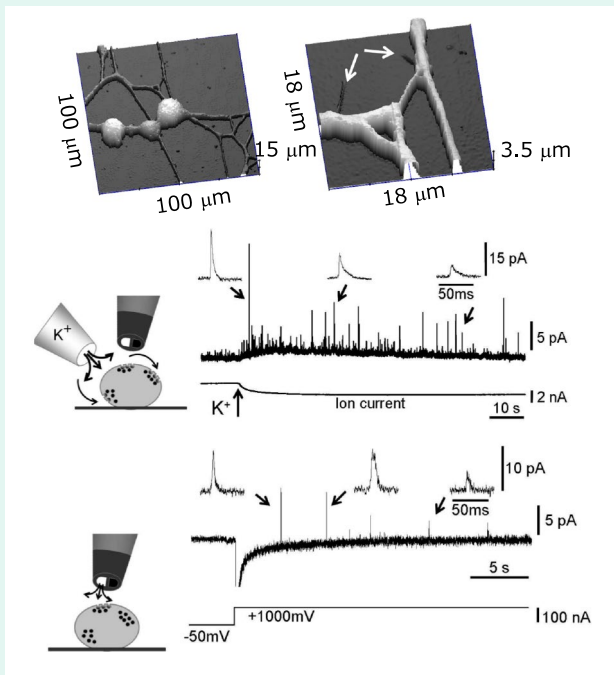


図 1 ナノ電気化学顕微鏡を利用したPC12の形状イメージング。100 nm ほどの Varicosity を可視化することができた。また、神経伝達物質の計測では、カーボン電極に +650 mV vs. Ag/AgCl の電圧を印加して、放出される神経伝達物質を酸化して、その電流応答を経時的にとらえた。細胞全体をもう一本のピペットで刺激した場合と、ナノピペットで刺激した場合で放出頻度に違いがみられた。

置を必要とせず、また、電極の作製が非常に簡便である。この θ 型プローブを用いて、神経伝達物質の単一細胞レベルでの計測を行った。プローブのサイズが 100 nm ほどであり、光学顕微鏡の分解能を上回る解像度で神経細胞の形状イメージを非標識で取得できた(図 1)。さらに、ナノ電気化学顕微鏡では、化学物質の局所的なインジェクションにも利用できる。実際に、局所的に PC12 (ラット副腎褐色細胞腫) を刺激するため、SICM のバレルに 1.0 M の K^+ を充填し、SICM のバレル側に電圧を印加して、細胞への化学的な刺激を行った。すると、刺激によりカテコールアミンの放出が誘導され、個々のベシクルの放出に対応したスパイク状の電流シグナルを計測することができた。また、細胞全体を刺激する従来法と比べ、スパイク状の電流シグナルの応答頻度が非常に少ないことから、局所的にカテコールアミンの放出を誘導できていることがわかる(図 1)。このように、ナノ電気化学顕微鏡を用いることで従来の単一細胞レベルで評価されていた現象を、細胞の局所で計測できるようになった。

4. おわりに

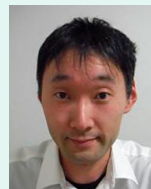
ナノ電気化学顕微鏡は、生細胞の局所的な化学物質の濃度変化や酵素の代謝や反応性の理解に広く資すると期待できる。その一方で、数十 nm のシナプス間隙で行われる化学物質の放出や、nM レベルの化学物質の計測には、空間分解能と時間分解能が求められる。その実現には、従来の延長ではなく、新しい原理を計測に加えていく必要がある。特に、化学物質を酸化・還元電流でとらえることに関しては、微小電流計測器の改良のみではなく、ISFET や高速 CV などの計測要素を取り入れていく必要がある。今後は、技術の改良と共に神経伝達物質の放出サイトのマッピングを行う予定である。

謝 辞

本研究は、末永智一教授(東北大学)、Yuri Korchev 教授(インペリアルカレッジロンドン)とその研究室のメンバーとの共同で行われた。

文 献

- 1) Matsue, T. *et al.* (1994) *J. Phys. Chem.* **98**, 11001-11003. DOI: 10.1021/j100094a002.
- 2) Shiku, H. *et al.* (2001) *Anal. Chem.* **73**, 3751-3758. DOI: 10.1021/ac010339j.
- 3) Shevchuk, A. I. *et al.* (2006) *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 2212-2216. DOI: 10.1002/anie.200503915.
- 4) Novak, P. *et al.* (2009) *Nat. Methods* **6**, 279-281. DOI: 10.1038/nmeth.1306.
- 5) Korchev, Y. E. *et al.* (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 616-619. DOI: 10.1038/35023563.
- 6) Gorelik, J. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16018-16023. DOI: 10.1073/pnas.252458399.
- 7) Novak, P. *et al.* (2014) *Nano Lett.* **14**, 1202-1207. DOI: 10.1021/nl404068p.
- 8) Takahashi, Y. *et al.* (2010) *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 10118-10126. DOI: 10.1021/ja1029478.
- 9) Takahashi, Y. *et al.* (2011) *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 9638-9642. DOI: 10.1002/anie.201102796.



高橋康史

高橋康史 (たかはし やすふみ)

金沢大学理工研究域准教授

2009年東北大学大学院環境科学研究科博士課程修了、博士(学術)、JSPS 海外特別研究員、東北大学原子分子材料高等研究機構助手、助教を経て現職。

研究内容: 電気化学計測

連絡先: 〒 920-1192 石川県金沢市角間町自然科学研究科 2 号館 2A316 号室

E-mail: yasufumi@se.kanazawa-u.ac.jp

URL: <http://fukuma.w3.kanazawa-u.ac.jp/frame.html>

