

研究終了報告書

「NV センタデルタドープ薄膜による生体分子の機能・相互作用解析」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：石綿 整

1. 研究のねらい

NV センタは、スピン依存発光を持つ原子サイズのセンサーであり、観測対象にナノメートルの領域まで近づけることができる高感度量子計測材料として注目されている。この NV センタの特徴は、 $\sim(6\text{nm})^3$ の微小体積からの核スピン解析を可能とし、同時に 1°C 以下の分解能を持つ高感度な量子温度計測を可能とすることである。これらの特徴から、NV センタを用いたナノスケール量子計測は、一細胞以下の領域における生体现象への応用が期待されている。

NV センタを用いたナノスケール生体計測への課題は、「NV センタでなくては計測できない生体パラメーターは何か」を定義することであると考えられる。本研究では、NV センタを用いた生体相転移計測によるナノスケール生体ダイナミクス解析を目的とし、NV センタ合成技術と生体計測技術の開発を並行して行うことで、微小領域 NMR 計測による分子状態解析の応用を世界にさきがけて実現した。

2. 研究成果

(1) 概要

NV センタを用いた微小領域 NMR 計測による生体応用計測の実現に際し、本研究では主に以下4つのテーマに取り組んできた。

①生体応用可能なナノスケール NMR イメージング技術の開発:

これまで国内では、ナノスケール NMR 計測を用いたイメージングは達成されていなかった。本研究では、共焦点顕微鏡と核スピンイメージングの両方が可能な計測系の開発を実現した。さらに、温度、湿度、および CO_2 濃度が制御可能な形へと発展させて、生体応用が可能なナノスケール NMR イメージング技術を実現した。

②デルタドープ薄膜上への生体サンプル作成技術の確立:

本研究では、脂質二重層における相転移計測を実現するために、ダイヤモンドデルタドープ薄膜上への脂質二重層形成技術を確立した。具体的には、デルタドープ薄膜上に親水性の表面を形成し、リン脂質によるミセルが形成された溶媒を表面に拡散させ、ベシクルフュージョン法を用いることにより脂質二重層を形成した。脂質二重層の形成に関しては、AFM および蛍光分子を用いた FRAP を用いて確認した。

③ナノスケール生体现象解明に向けたシミュレーターの開発:

ナノスケール NMR における計測では、直接的に生体パラメーターを計測していないため、拡散係数の導出には、ナノスケールにおける核スピンのダイナミクスと NV センタにおいて計測される磁場効果に対応させる必要がある。本研究では、ナノスケール NMR において観測されるプロトン核スピンと、NV センタにおいて観測される磁場に対応させる、モンテカルロシミュレーション技術の開発を行った。ダイヤモンド表面 $\sim(6\text{nm})^3$ の領域における脂質二重層プロトンの2次元分子拡散モデルを、MD シミュレーションと組み合わせることで、リン脂質の拡

散係数のモデリングを可能にした。

④NV センタを用いた生体パラメーター計測(温度・リン脂質拡散係数):

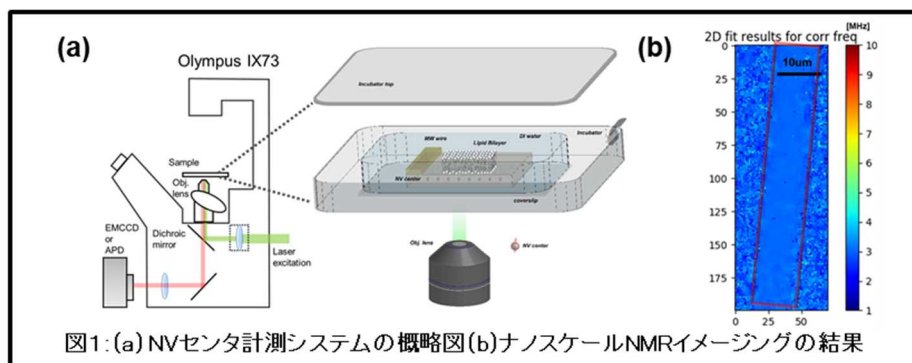
本研究では、脂質二重層における相転移を、NV センタを用いてラベルフリーに計測する技術確立した。具体的には、Thermal Echo 法を利用した計測から、温度計測精度として40mK を達成し、脂質二重層における 0.1°C以下の温度変化を計測することに成功した。さらに、Correlation spectroscopy 計測結果と二次元分子拡散モデルの比較により、脂質二重層の相転移を、温度変化に対するリン脂質拡散係数変化として求めた。

(2) 詳細

研究テーマA「生体応用可能なナノスケール NMR イメージング技術の開発」

本研究では図1(a)に示すように、Olympus IX73顕微鏡の内部をくり抜き、ブレッドボードを導入し、入射レーザー光が調整可能な光学系を構築することで、同じ励起光に対して共焦点顕微鏡とイメージングの両方を行うことが可能な計測系を開発した。さらに、インキュベーターを導入し、温度を室温から 45°Cの範囲で変更できるようにすることで、NV センタの生体計測環境を整えた。設定温度は、熱電対により計測温度と比較可能であり、また、インキュベーターでは、生細胞計測に向けた湿度、CO₂ 濃度も制御可能である。

上記 NV センタ計測システムを利用して、ナノスケール NMR イメージングを国内で初めて実現し(図1(b))、NV センタを用いた脂質二重層の観測に成功した。ナノスケール NMR イメージングでは、XY8 パルスシーケンスを連続的に 1000 回打ち込むことで、EMCCD フレームレートにより制限される感度の低下を補った。また、同じレーザー光を利用し、共焦点顕微鏡とイメージングを実現することで、NMR 計測において重要となる磁場アライメントの高感度補正を行っている。

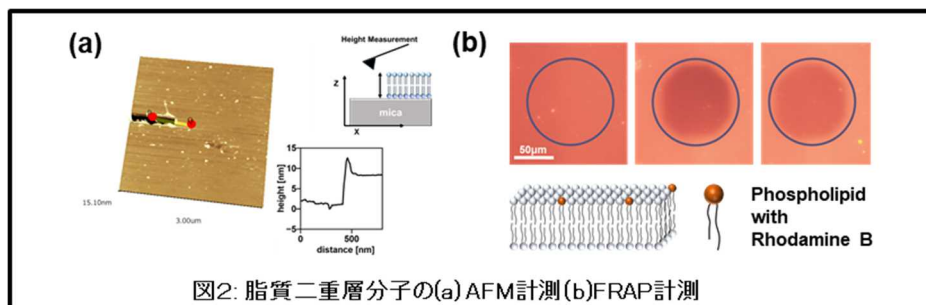


研究テーマB「デルタドープ薄膜上への生体サンプル作成技術の確立」

ナノスケール NMR の生体応用には、ダイヤモンドデルタドープ薄膜上への生体サンプル作成技術の確立が必須である。本研究では POPC,DOPC,DPPC 等リン脂質を利用してミセルを溶媒中で形成し、それを親水性の表面に分散することで、ベシクルフュージョン法により脂質二重層をデルタドープ薄膜上へ形成した。

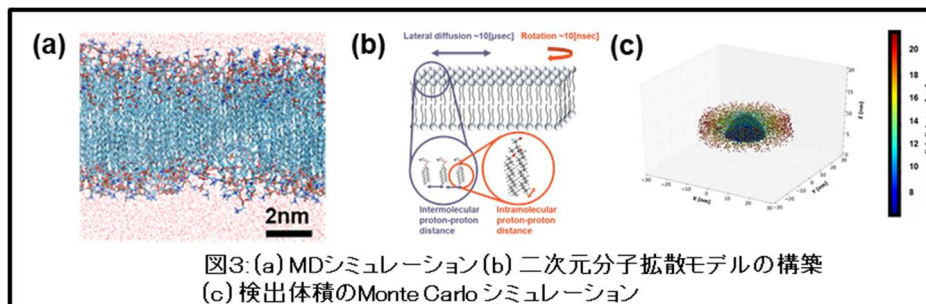
まず初めに、親水性の表面を持つマイカの上に脂質二重層を形成し、PBS 中で AFM 計測を行い、溶媒中でのマイカ上への脂質二重層の形成を確認した。図2(a)に示すように、脂質二重層をマイカ上全面に形成した後、AFM を利用して生成した脂質二重層を一部除去し、脂

質二重層が除去されたマイカ表面と脂質二重層が存在する領域の厚みの違いを AFM で計測した。図2(a)に示すように、5nm 程度の脂質二重層の厚みを溶媒中で確認できた。ダイヤモンド上への脂質二重層の形成には、ダイヤモンド上の表面を親水性にする必要がある。そこで、本研究では、熱混酸処理をデルタドープ薄膜に対して行うことでダイヤモンド上に親水性の表面を形成した。表面の親水性を評価するために、XPS を利用して表面の酸素密度の上昇を計測し、ダイヤモンド表面が酸素終端されていることを確認した。図2(b)に示すように蛍光プローブを含むリン脂質 Lissamine Rhodamine B 1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanola を 1% mol で脂質二重層に混入することで FRAP 計測を行っている。FRAP 計測から、ダイヤモンド表面における脂質二重層の形成を確認している。



研究テーマ C「ナノスケール生体现象解明に向けたシミュレーターの開発」

ナノスケール NMR における計測結果は、直接的に生体パラメーターを計測していないため、拡散係数の導出には、ナノスケールにおける核スピンのダイナミクスと NV センタにおいて計測される磁場効果に対応させる必要がある。本研究では、ナノスケール NMR において観測されるプロトン核スピンのダイナミクスと、NV センタにおいて観測される磁場を対応させるモンテカルロシミュレーション技術の開発を行った。まず、ダイヤモンド表面 $\sim (6\text{nm})^3$ の領域におけるオイル中プロトンの 3 次元拡散モデルを構築し、実際の結果と比較することで定量性を確認した。脂質二重層プロトンのモデリングには、リン脂質の回転とリン脂質の拡散を含めた双極子相互作用モデルを構築した。特に本研究では、これら二つのダイナミクスが異なるタイムスケールで起こることを利用し、nsec スケールのリン脂質の回転運動に関しては、MD シミュレーションを利用して同定し(図3(a))、MD シミュレーションでは計算できない μsec スケールのリン脂質拡散は、python を利用したモンテカルロシミュレーションで拡散係数のみをパラメーターとした二次元分子拡散モデルを構築した(図3(b))。また、図3(c)に示すようにナノスケール NMR の検出体積を二次元に広がる脂質二重層を仮定したモンテカルロシミュレーションから確認している。



研究テーマ D「NV センタを用いた生体パラメーター計測(温度・リン脂質拡散係数)」

本研究では、NV センタによる温度、およびリン脂質拡散係数の導出に成功し、脂質二重層における相転移をラベルフリーに計測する技術を確立した。図4(a)に示すように Thermal Echo 計測において掃引されるマイクロ波の周波数依存性により 40mK の温度計測精度を確認している。また、実際にインキュベーターに設定された 0.5°C ずつの温度変化に対して熱電対設置位置と NV センタ計測位置において 90mK の温度設定の差異を検出した。温度計測精度として 40mK を達成することで測定系における 0.1°C 以下の温度変化の計測を確立している。

図4(b)に示すように、Correlation spectroscopy の計測結果を二次元分子拡散モデルと比較することで、脂質二重層における温度変化に対する拡散係数の変化を確認した。計測結果より、26.5°C において $1.5 \text{ nm}^2/\mu\text{s}$ (図4(b)左)であった拡散係数が、36°C においては $3.5 \text{ nm}^2/\mu\text{s}$ (図4(b)右)に変化することが確認できた。さらに、36°C での計測後に、温度を再び 26.5°C に戻したところ、拡散係数も $1.5 \text{ nm}^2/\mu\text{s}$ に戻ったことから、再現性と計測結果の正確性の高い結果が得られたことが確認できた。この結果よりラベルフリー脂質二重層相転移計測を実証している。[Advanced Quantum Technology (2021) DOI:10.1002/qute.202000106.]

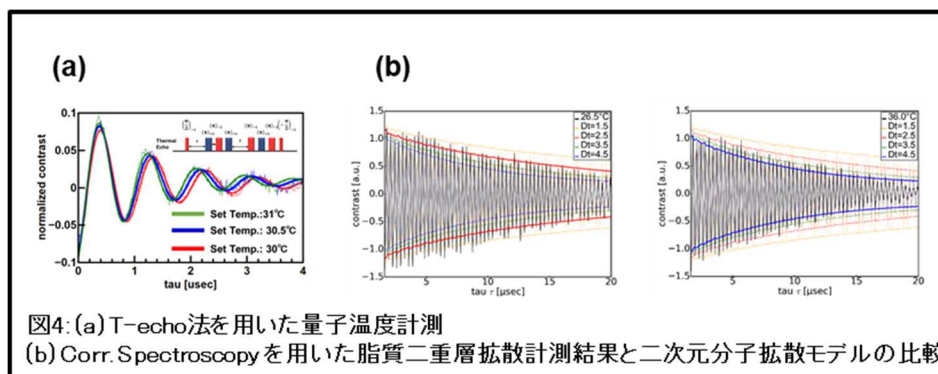


図4: (a) T-echo法を用いた量子温度計測

(b) Corr. Spectroscopy を用いた脂質二重層拡散計測結果と二次元分子拡散モデルの比較

3. 今後の展開

これまで本研究を介して生体環境における NMR イメージング技術の確立、生体サンプル作成技術の確立、ナノスケール分子ダイナミクスシミュレーターの開発、NV センタを用いた生体パラメーターの計測(温度、リン脂質拡散)を実現してきた。本研究の最大の成果として、世界に先駆けてナノスケール NV センタ計測でしか計測できない生物物理現象として生体内での相転移を証明した。脂質二重層のみならず FUS における LLPS 計測等他の生体相転移計測を進める予定である。ラベルフリーな脂質二重層相転移計測は異なる相により構成される脂質二重層中のラフト計測を可能とし、脂質二重層中の異なるドメインを計測することで細胞の温度調整機構の解明などに応用が考えられる。

4. 自己評価

本研究の最大の目標は NV センタのマイルストーン技術であるナノスケール NMR を用いて生体パラメーター計測を世界に先駆けて実現することである。本研究では NV センタ電子スピンにおける重ね合わせ状態を用いた高感度微小領域 NMR 計測を行い、ラベルフリーな核スピン拡散係数

導出を実現した。同時に複数の NV センタ電子スピン状態を利用することにより高精度温度計測を実現している。これら二つの計測を同時に行うことでラベルフリーな脂質二重層相転移計測を実現した。NV センタを用いたマルチパラメーター計測は他の計測技術では不可能な生体計測であり、主に生体での相転移計測において今後その有効性を示すことを本研究で実証した。脂質二重層に限らず FUS における LLPS 等他の相転移計測への応用が考えられる。

脂質二重層相転移計測は細胞膜において異なる相として局在し、細胞の状態やシグナル伝達を決定するラフトのラベルフリーな計測に有効である。ナノスケールに高感度なラベルフリー細胞膜診断は今後細胞状態診断技術としての研究を介して、新しい創薬の手法を産業界に提示すると考える。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

Hitoshi Ishiwata, et al, “Label-Free Phase change detection of Lipid Bilayers using Nanoscale diamond magnetometry” **Advanced Quantum Technology (2021)** accepted for front cover of issue 4 2021. DOI:10.1002/qute.202000106.

(2) 特許出願 なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表(招待講演のみ):

2018年5月 量子生命科学研究会第二回学術集会

「NV センタデルタドープ薄膜による生体分子の機能・相互作用解析」

2019年8月 光科学異分野横断萌芽研究会

「NV センタによる生体応用」

2019年9月 生物物理学会

「Nanoscale thermometry and magnetometry in biology using NV center in diamond」

2019年11月 第一回量子生命科学会若手の会

「核スピンイメージングを用いた脂質二重層相転移計測」

2020年8月 EPR virtual meeting Asia Pacific edition

「Label-free phase change detection of lipid bilayers using nanoscale diamond magnetometry」

2021年1月 第12回Qコロキウム

「ナノスケール量子計測を用いたラベルフリー脂質二重層相転移計測」

受賞:

1. The 3rd International Forum on Quantum Metrology and Sensing (IFQMS 2020), Short Presentation Award

2. The 1st International Forum on Quantum Sensing (IFQS 2019), Poster Award