

ナノスリット導波路を用いた細胞内生体分子のリアルタイム蛍光イメージング

Fluorescence imaging of intracellular biomolecules using nanoslit waveguides

早大理工¹, 東北大学際研²○大久保幸太朗¹, 櫛田昂歳¹, 和泉聡志¹, 山本英明², 谷井孝至¹Waseda Univ.¹, Tohoku Univ.²Kotaro Okubo¹, Takatoshi Kushida¹, Satoshi Izumi¹, Hideaki Yamamoto², Takashi Tanii¹

E-mail: ohkubo@tanii.nano.waseda.ac.jp

【はじめに】ゼロモード導波路を用いたリアルタイム一分子蛍光イメージング法では、励起光を導波路内に閉じ込めることにより、生体分子間相互作用の 1 分子観察を可能にする。これまでに DNA ポリメラーゼ、リボソーム、分子シャペロンといった重要なタンパクの分子間相互作用が細胞内濃度で計測されてきた[1]。一方、表面修飾を用いた細胞パターンニング技術を用いれば、培養細胞の特定部位が導波路の上に接着するように制御できる[2]。したがって、これら 2 つの技術を融合すれば、単離精製したタンパク質を固定する従来法を超えて、細胞の特定部位に発現したタンパク質の挙動を細胞内で直接観察できる技術となりえる。この融合技術のポテンシャルを評価するために、今回、モデル系として培養神経細胞の発火現象に着目した。そして、培養神経細胞の軸索を導波路上に誘導し、軸索を伝わるパルスが Ca イメージングによってどのように観察されるかを調べた。

【実験方法】軸索を伝搬するパルスを計測できるようスリット型導波路とした。ガラス基板上に蒸着した Al 薄膜に、図 1 に示すスリットと窓を形成し、その内部のガラス表面を poly-D-lysine で修飾して細胞接着領域とした。それ以外の Al 表面にはオクタデシルシラン単分子膜で修飾して細胞接着を阻害した。播種した神経細胞は窓の部分に接着し、その後、窓からスリットを介して反対側の窓へと軸索を伸長する。そして、播種後約 10 日間でランダム接続回路を形成する。スリット幅 (120 nm) より長波長の励起光 (488 nm) を照射すると、励起光はスリット内部に閉じ込められる。神経回路の発火に伴い、軸索表面のカルシウムチャネルが開くと、細胞内に流入した Ca イオン濃度依存的にスリット部からパルス蛍光が観察されるように設計されている。

【実験結果】幅 120 nm のスリットを用いた軸索の蛍光強度計測では、窓部の 1/5~1/10 程度の蛍光強度が観測され、退色までの経過時間も十分に長かった。したがって、励起光はスリット内部に閉じ込められていると考えられる。また、スリットに沿って複数の蛍光スポットが観察された。図 2 に示すように、窓部に接着した細胞体の近く突起の発火 (緑線) に同期して、それらの蛍光スポットは発火した (赤線)。発表では電磁場シミュレーションによる解析結果と対応づけながら、軸索上の Ca チャネルの 1 分子計測の実行可能性について議論する。

なお、本研究は基盤研究(C)(26390035)の支援を受けて進められている。

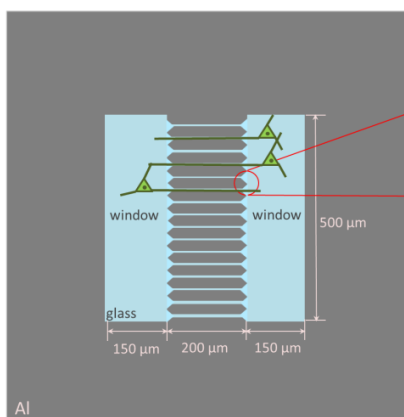


図 1 窓とスリットをもつ ガラス基板の構造。

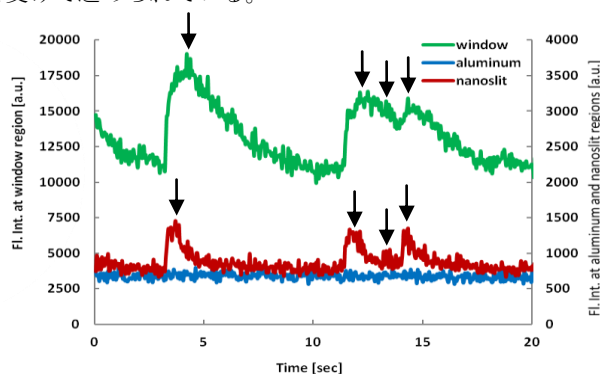


図 2 Ca イメージング結果. 赤線: 120 nm 幅のスリットに沿って伸長した軸索において、スリットを介して観察された蛍光スポットの時間変化. 緑線: 窓部に接着した細胞体の近くの突起における蛍光強度変化. 回路は、図中の矢印の時点で発火している。

[1]T. Miyake, et al: Anal. Chem. 80 (2008) 6018.

[2]H. Yamamoto, et al: J. Neurochem. 123 (2011) 904-910.