

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	蛍光ダイヤモンドナノ粒子を使った新規1分子イメージング法の開発と生体分子観察への応用
研究機関・部局・職名	京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授
氏名	原田 慶恵

【研究目的】

個々の生体分子がどのようなメカニズムで機能しているのか、また、それらが生体内でどのような時間的、空間的秩序に基づいて機能しているのかを明らかにすることが生命現象の理解の本質である。その本質に迫るための最も直接的なアプローチは、生体分子が機能している様子を実際に観察する方法である。蛍光プローブで標識した個々の生体分子を、蛍光顕微鏡で1分子観察する方法が開発され、これまでにいくつかのタンパク質の運動や機能発現が可視化されている。しかし、現在1分子観察に使われている蛍光プローブにはいくつかの限界と問題がある。まず安定性である。1分子観察のために強い光で励起すると、蛍光色素分子や蛍光タンパク質分子の多くは数秒～数十秒で退色する。量子ドットは退色しにくいがブリンキングが起きるため、一定時間を超えるデータの収集が難しい。次に蛍光観察の選択性の問題である。生体内の蛍光1分子観察を行う際、内在する蛍光物質と、蛍光プローブを区別する必要がある。しかし、励起波長、蛍光波長あるいは蛍光寿命以外で両者を識別することができない。さらに角度変化の検出である。蛍光1分子観察では、現在、波長限界を超える分解能で並進運動を検出できる。しかし、ナノレベルで微粒子の回転運動や角度変位を精度よく捕らえるのは極めて困難である。以上のことから、退色やブリンキングがなく、自家蛍光物質との区別が可能であり、角度変化や構造変化を検出できるという特性を持った新しい蛍光プローブの開発が必要とされている。

研究代表者らは上記のニーズに答えることができる蛍光プローブとして、ダイヤモンドナノ粒子の蛍光特性に着目した。ダイヤモンドには不純物として窒素原子が存在する。この窒素原子と、炭素原子が存在しない空孔が隣接した状態を窒素-格子空孔中心 (Nitrogen-Vacancy Center、NVC)

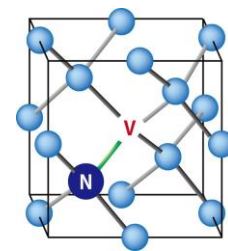


図1 ダイヤモンド結晶構造内のNVCの模式図

と呼ぶ (図1)。このNVCに1個の電子が外部から供給されると、負に荷電したNVCになる (以後、NV⁻と略す)。NV⁻は、よく使われる蛍光色素であるローダミンやCy3を励起するのと同じ、550 nm 付近の光で励起され、650～800 nm の範囲の蛍光を発する (図2)。NV⁻は退色やブリンキングが起きないことが実証されている。NV⁻では励起前の初期のスピン状態に依存して、2つの発光遷移過程が存在する (図3)。通常は図3左側の緩和過程で発光するが、2.87GHzの高周波を照射すると、磁気共鳴によって発

光に関わる NV⁻の電子スピンの強制的に励起され、ほぼ半分の確率で無輻射過程を経て励起エネルギーを放出することになる(図 3 右)。そのため磁気共鳴が起こっているときは NV が発する蛍光が弱くなる。この現象を光検出磁気共鳴 (Optically detected magnetic resonance, ODMR) という。また、周波数を変えながら高周波を照射した際の蛍光強度の変化を光検出磁気共鳴スペクトル (ODMR スペクトル) という。NV にはさらに外部から静磁場を印加すると磁気共鳴をおこす高周波周波数が、N-V 結合方向と静磁場との角度に依存して変化するという性質がある。したがって印加する外部静磁場の向きと、蛍光強度変化がおこる高周波周波数を解析することで、ダイヤモンド粒子の向きを決定することができる。本研究では、ダイヤモンドナノ粒子のこれらの優れた蛍光特性を取り入れた新しい 1 分子計測手法を開発し、これまでの蛍光プローブでは難しかった選択計測、長時間観察、角度解析を実現し、生体分子の観察に適用する手法を確立することを目的とする。

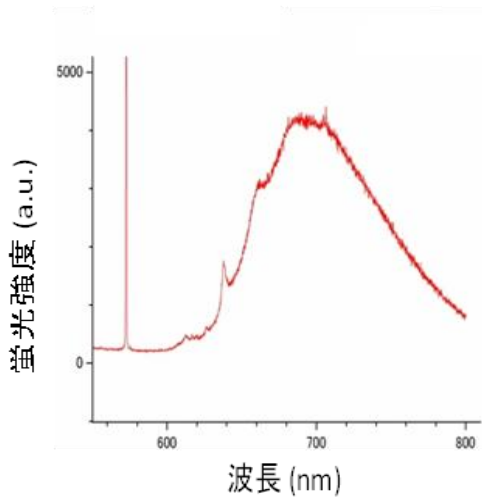


図 2 NV の蛍光スペクトル

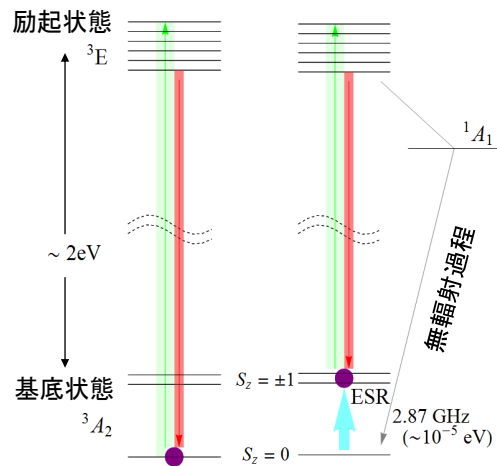


図 3 NV のエネルギー準位

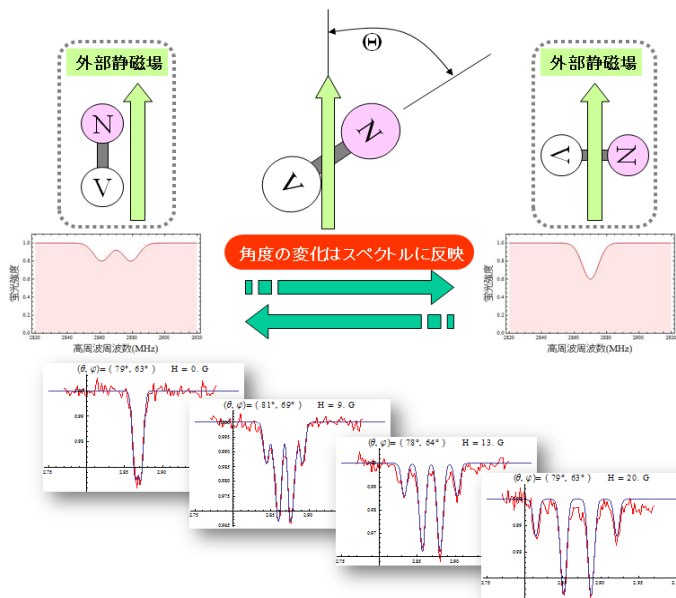


図 4 静磁場に対するスペクトルの角度依存性と評価手法ならびに解析例

【総合評価】	
	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】	
① 総合所見	
<p>光退色やブリンキングのないダイヤモンドナノ粒子をプローブとしたイメージング技術の展開を目指す本研究課題は、達成されればこれまでの研究のブレークスルーを引き起こすことは容易に想像でき、本研究の推進は時代に合ったものである。現時点では本研究課題に関して、まだ十分説得力のある成果を提出できているとは言えないが、本課題終了後も継続して努力することを期待する。ダイヤモンドナノ粒子に基づく新規性の高い蛍光分子の開発に成功し、さらには、光検出磁気共鳴顕微鏡の開発により、生体分子の1分子イメージング技術を世界に先駆けて開発した点は、高く評価される。さらに、本技術を細胞内1分子イメージングのみならず線虫内の1分子イメージングを達成し、また細胞膜のEGF受容体に結合させたダイヤモンドナノ粒子の角度変化を観察していることは、本技術の生命科学・医科学への応用展開のみならず、医療・創薬への展開が期待される優れた成果である。</p>	

② 目的の達成状況	
<p>・所期の目的が <input type="checkbox"/>全て達成された ・ <input checked="" type="checkbox"/>一部達成された ・ <input type="checkbox"/>達成されなかった)</p>	
<p>本研究課題の目的は、細胞や個体内での1分子イメージングのために、蛍光色素・蛍光タンパク質・量子ドットの弱点を凌駕する新規なプローブとしてダイヤモンドナノ粒子を利用するための、測定装置とプローブの開発と位置づけられる。従来の蛍光分子の欠点を克服するためにダイヤモンドナノ粒子の窒素—格子空隙中心の特殊な電子状態を活用した、極めて新規性の高い蛍光材料開発と1分子イメージング技術の開発を目的としており、ダイヤモンドナノ粒子による蛍光分子の開発に世界に先駆けて成功し、さらに、光検出磁気共鳴顕微鏡を開発するなど研究は、順調に進捗した。当初計画では生命科学研究での新たな成果を得ることが大きな比重を占めていたが、指摘事項に適切に対応、計測システムの開発に集中した研究推進を図っており、この対応によって進捗状況は順調になったと判断される。ただし、論文発表は多いが、研究代表者が責任著者として発表したものは限られており、今後は研究代表者独自の研究成果を上げることが期待される。</p>	

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

現在、生体分子の1分子イメージングは急速に研究が進展しているが、蛍光分子の退色やブリンキングなどが課題として残されていた。本研究課題では、ダイヤモンドナノ粒子の特性を生かすことで、従来の蛍光分子の課題を解決する新たな蛍光材料の開発が達成されつつあり、大きな先進性、優位性がある。さらに、ダイヤモンドナノ粒子のイメージングのための新規顕微鏡システムの開発にも成功しており、核磁気共鳴を蛍光顕微鏡技術に拡張し、単一分子の蛍光計測技術と結合させる試みは極めて先端的であり、技術の確立による関連分野へのインパクトは大きく、MRIの分子レベルへの拡張などの周辺分野への波及効果も十分期待できる。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

本研究課題の開発目標の一つであるダイヤモンドナノ粒子の開発は、核磁気共鳴イメージング (MRI) の高分解能化と深くかかわっている。このMRIの高分解能化が急速に進展し、さまざまな産業利用が期待されている状況で、本研究課題で開発されるダイヤモンドナノ粒子が、MRIの生命機能に関わる産業利用で有効に働く可能性は大きく、このスピノフ技術が社会的な貢献につながる可能性はあると感じる。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

本研究課題の目的の達成に向けた研究計画は適切に立てられており、研究代表者のリーダーシップのもと、適切な研究分担に基づく共同研究実施体制が適切に構築されている。研究開発の3つの目標に向かって、バランスよくリソースを配分し、共同研究を推進することで研究開発を進捗させたが、特に、顕微鏡本体の構築を効率的に進めてきた点は高く評価できる。原理実証の論文発表やダイヤモンドナノ粒子の調整法の特許出願も行っており、本課題で開発する次世代技術の先取権を主張することにも注意が払われている点が評価できる。本課題終了後は基盤研究(B)などで研究を継続することとなったことは評価できるが、本課題を通じて研究代表者が責任著者として発表した原著論文は限られており、今後は研究代表者独自の研究成果を上げることを期待する。