生細胞表面のナノスケールの形状観察を実現する 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡の開発

井田大貴¹・高橋康史^{1,2,3}・珠玖 仁¹・末永智一^{1,2}

¹東北大学環境科学研究科 ☎ 980-0845 宮城県仙台市青葉区荒巻青葉 6-6

²東北大学原子分子材料科学高等研究機構 ☎ 980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2 丁目 1-1

³JST さきがけ ☎ 332-0012 埼玉県川口市本町 4-1-8

(2015 年 2 月 13 日受付 ; 2015 年 3 月 26 日掲載決定)

Nano-Scale Topography Imaging of Live Cell Surface Using Scanning Ion Conductance Microscopy

Hiroki IDA¹, Yasufumi TAKAHASHI^{1,2,3}, Hitoshi SHIKU¹ and Tomokazu MATSUE^{1,2}

¹Tohoku University, 6-6 Aramaki Aoba, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-0845

²WPI-Advanced Institute for Materials Research, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8577

³PRESTO, JST, 4-1-8 Hon-cho, Kawaguchi, Saitama 332-0012

(Received February 13, 2015 ; Accepted March 26, 2015)

Live cell imaging is important to understand the cell function such as membrane dynamics. Scanning probe microscopy (SPM) is used for evaluation of cell surface topography with nano-scale, but in most cases the measurement induced cell damage when probe contact with the cell surface. Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM) uses ion current as a feedback signal for nanopipette probe-sample distance control. SICM allows non-contact live cell imaging and high-resolution characterization of dynamic changes of cell surface. Furthermore, SICM can combine with other analytical tool as distance control technique.

KEYWORDS : sicm, spm, topography imaging, live cell, secm

1. は じ め に

生細胞表面の微小構造や化学物質の濃度変化が、生細胞の生理学的に重要な役割を果たしている。たとえば、細胞膜表面の内外では、生体分子やイオンなど、様々な物質のやり取りが行われている。微小な分子やイオンは、チャネルや膜透過などにより、短時間での瞬間的に輸送される。また、マイクロ・ナノメートルスケールの物質のやりとりは、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスなど細胞表面の微小構造の変化により生じる。さらに、アクチンや微小管など細胞表面の微小構造は、細胞の移動に関与している。そのため、生細胞表面の微小構造の形状測定は、細胞機能を理解するうえで非常に重要である。

一般的な光学顕微鏡では、光の回折限界により 200 nm 程度の分解能が限界とされている。また、電子顕微鏡では、ナノスケールの表面観察は可能であるが、生理条件下での測定が不可能なため微小構造の断続的なイメージしか得られない。走査型プローブ顕微鏡は、先端が非常に小さい探針を用いて、試料との相互作用により形状や化学物質の濃度などを測定できる装置である。なかでも、生理条件下での測定が可能である原子間力顕微鏡 (AFM) は、ナノメートルスケールの分解能をもち、細胞の形状測定に応用されてきた。しかし、AFM による測定は非常に高感度であるものの、カンチレバーによる物理的な接触を要するため、測定自体が細胞に対する刺激となってしまう恐れがある。これは、力学的な相互作用を利用する AFM の測定原理によるものであり、問題の解決にはまったく異なる測定原理の計測法が求められる。

走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (scanning ion conductance microscopy, SICM) は、探針に電解質溶液を充填したナノピペットを用い、イオン電流をフィードバック信号として用いて、試料の形状を測定する¹⁻³⁾。SICMには、

- ナノメートルレベルの高い解像度
- 生理環境中で測定可能
- 試料に非接触で測定可能
- 他の分析手法との併用が可能
- 試薬の局所投与や細胞回収が可能

という利点があり、生物試料の測定に向いている。本稿では SICM の装置概要と、生細胞表面の形状測定ならびに連続イメージングによる表面形状の経時測定について紹介する。

2. SICM 概要

2.1 SICM 原理

SICM は、ナノピペット (先端内径 ~ 100 nm) を探針に用いて、イオン電流をフィードバック信号に利用することで、探針が試料に完全に非接触で、形状測定を行うことができる。ナノピペット内に電解液を充填し、ピペット内部と試料側に Ag/AgCl 電極を配置し、この二本の電極の間に電圧を印加する。このとき、ナノピペット内へのイオンの流入出が起こる。その際に、ナノピペット内および試料側の溶液において、電気的中性を保つため、Ag/AgCl 電極では、以下の反応が起こる (Fig. 1 (a))。

この反応に伴う電流は、ナノピペット先端部でのイオンの移動に依存し、非常に安定した nA $\sim$ pA レベルの電流を計測される。ピペット先端が試料へ近接すると、空間的にイオンの移動が阻害されて電流値が減少する。Fig. 1 (b) に、シミュレーションにより得られた SICM のアプローチカーブを示す⁴⁾。このように、電流値が減少した点の位置情報から探針と試料の距離を非接触で測定でき、探針を走査することによって、試料の形状像を取得できる。

2.2 スキャンモード

一般的に走査型プローブ顕微鏡では、探針で検出するフィードバック信号が一定になるように探針と試料との距離を常に一定に保ち、走査する。このことで試料表面の形状や、特性を 2 次元イメージとして取得する。しかし、次の測定点の形状を予測することができないために、凹凸の激しい試料では、探針が試料に接触してしまう。特に、SICM は、イオン電流をフィードバック信号に利用した非接触な測定が利点の一つであるた

Fig. 1. (color online). Schematic illustration of (a) Electrochemical reaction of Ag/AgCl electrode and (b) approach curve of SICM.

め、この問題を解決することは非常に重要である。

そこで、ホッピングモードという、測定点ごとにピペットを大きく上下させる手法が開発された^{5,6)}。ホッピングモードでは、試料の近接によるイオン電流の減少が起こらない位置からピペットを 20 $\sim$ 100 nm/ms の速度でアプローチさせ、電流値の減少が基準値に達した地点の Z 座標を記録して、任意の高さまでピペットを引き上げる (Fig. 2)。これを測定点ごとに行うことで、ピペットと試料の接触を避けながらイメージングが可能となる。ホッピングモードでは測定点ごとにピペットを上下に大きく動かすため 1 イメージにかかる時間が増えるが、神経細胞などの複雑な構造を持つ試料でも高コント

Fig. 2. (color online). Schematic illustration of the hopping mode.

ラストで測定可能である。

2.3 装置構成

SICM は様々な機器で構成されるが、その中でも特に電流増幅器、ピエゾステージ、DC モーター、Field Programmable Gate Array (FPGA) ボードを搭載した PC は特に重要である (Fig. 3)。

生細胞の形状測定が可能な SICM では、測定時間が非常に重要である。特に、フィードバックシグナルであるイオン電流の検出に関しては、高感度かつ高速で応答する微小電流計測器が必要となる。そのため、パッチクランプなどで使用される電流増幅器 (ローパスフィルター 3 kHz) を一般的に使用する。

ナノピペットの精密な位置制御は、非接触での形状測定を行うために不可欠な要素の一つである。また、生細胞の表面構造は時々刻々と変化するため、迅速なイメージングが求められる。ピエゾステージに加重がかかると、ピエゾステージの動きが遅くなるため、軽量化が重要である。そこで、XYZ 一体型のピエゾステージではなく、試料を乗せた XY ステージと、ナノピペットを取り付けた Z ステージの二つのステージを利用することでピエゾステージの動きを高速化した。ピエゾステージは稼働する範囲が狭いほど (使用するピエゾ素子の容量が小さいほど)、共振周波数が高くなり、高速での制御が可能となる。特にホッピングモードでは、垂直方向のアプローチを行うため、測定時間短縮のため、垂直方向のピエゾステージの高速駆動が重要となる。そのため、我々は、可動範囲が 30 μm のピエゾステージを、試料の走査範囲の上限に直結する水平方向には、可動域が 100 μm と広いピエゾステージを用いている。

測定の際には、ナノピペットを試料に触れることなく、Z 方向のピエゾステージの可動域まで移動させる必要があるが、ピエゾステージの可動範囲は数十 μm と狭い。そこで、DC モーターの可動面に Z 軸ピエゾステー

Fig. 3. (color online). SICM setup.

ジを固定し、DC モーターとピエゾを連動させて使用することで、ナノピペットを試料に自動で近接させることができる。DC モーターはピエゾステージほどの精密な制御はできないが、数十 μm の広い可動域を持つため、ピペットを試料近傍まで移動させるのに適している。

当研究室では、SICM の制御を独自開発したプログラムにより行っているが、電流増幅器で計測したイオン電流をフィードバックシグナルとして利用し、ピペットの制御を行うには高速で応答可能な制御装置が求められる。FPGA は事前にプログラムをコンパイルすることで、電子回路を構成できる集積回路である。自由に電子回路を構成できるために CPU の苦手な並列処理が得意であり、数十 μs レベルでの高速な制御が可能である。また、何度でも回路を書き換え可能であり、書き換え時間も非常に短く、装置開発の面でも大きな利点を持つ。FPGA ボードは PC に PCIe で接続しており、測定中でも相互にデータ通信が可能である。

これらの装置のうち測定部は、測定中でも細胞が視認できるように CCD カメラを取り付けた倒立顕微鏡上に構築した。また、振動や外部の電場によるノイズを除去するために、測定部をファラデーケージで覆い、倒立顕微鏡ごと装置を除振台の上に設置した。

測定時には、ピペット内部と試料側に配置された Ag/AgCl 電極の間に 0.2 V を印加する。ピペット側は、負の電圧を印加するとピペット先端で溶液の流れが発生してイオン電流が不安定になるため、正の電圧を印加する。

2.4 探針

ナノピペットは、ボロシリケートガラスキャピラリー (外径 1.0 mm, 内径 0.78 mm) を CO₂ レーザープレーにより先鋭化することで作成する。イオン電流の減少する

距離はピペットの先端部の内径に依存し、小さいほど分解能が向上する。しかし、ピペット先端部の内径が小さくなると、イオンの流入出の経路が狭まることにより抵抗が大きくなる。抵抗の増大は観測されるイオン電流の低下を招くが、ノイズの大きさは変わらないためシグナルノイズ比が悪化する。このトレードオフを考慮し、当研究室ではピペット先端の内径が100 nm程度になるように先鋭化している。また、前述のとおり、ピペットの狭窄部は抵抗の増加を招くため、ピペットの先端が急激に窄まる形状が好ましい。そのため、レーザーブラーのパラメータ設定には、再現性高く上記の要求を満たすことが求められる。

2.5 他の分析手法への応用

SICMは、液中において非接触でナノスケールの形状測定ができるため、試料の高さ情報を要する他の分析手法へ応用されている。

走査型電気化学顕微鏡 (SECM) は探針に微小電極を用い、電気化学反応種や、電気化学メディエータを介した電極反応により、試料表面の電気化学特性を評価できる。溶液中に拡散する化学物質を検出できる範囲は電極の直径に依存し、小さい電極を用いる場合は試料表面に近接させる必要がある。しかし、SECMは電極の距離制御が難しく、従来は分解能を犠牲に、マイクロメートルスケールの電極を使用するしかなかった。そこで、距離制御の手法としてSICMをSECMと組み合わせることで、ナノメートルスケールの電極を使用した高分解能な評価が可能になった。SECM-SICMは探針に、電極とナノピペットを有する複合電極を用いる。当研究室では、 θ 型クォーツキャピラリを先鋭化して一方にブタンガスを充填し、焼成カーボンを形成して電極とする方法か、ナノピペットの周囲にPtをスパッタし、ナノピペットの周囲にリング電極を形成する方法を用いて、探針を作成する (Fig. 4)⁷⁾。また、装置としては、SICMに電流計測チャンネルを一つ増設するだけでよい。

パッチクランプは細胞とナノピペットを密着させ、ピペットで隔離した領域に存在するイオンチャンネルを通るイオン電流を計測する手法である。しかし、パッチクランプでは光学顕微鏡を見ながらピペットを操作するため、局所を狙うのではなく配置が容易な部分を測定するのが一般的である。そこで、SICMで取得した形状像を利用することで、細胞の好きな位置にアプローチすることができ、局所的なイオンチャンネルの活性を評価できる⁸⁾。SICMとパッチクランプはどちらも探針に先鋭化したガラスキャピラリを用いるため、容易に応用可能である。

ほかにも、共焦点顕微鏡とSICMを組み合わせること

Fig. 4. (color online). (a) the SEM image of the SECM/SICM probe and (b) Schematic illustration.

で、サンプル表面に焦点を合わせて測定できる表面共焦点顕微鏡や⁹⁾、ピペット内に生体分子を充填することで、形状測定した後に局所インジェクションを行うことができる¹⁰⁾。

3. 測定例

3.1 生細胞の表面形状測定

SICMで取得したイメージからは細胞の三次元形状を明確に読み取ることができる。Fig. 5は培地中における様々な細胞 (HeLa細胞, CHO細胞, MCF-7細胞, C2C12細胞) のSICMイメージである。これを見ると、MCF-7細胞, HeLa細胞, CHO細胞の高さがそれぞれ10, 9, 9 μm であることがわかり、細胞表面の湾曲の違いからHeLa細胞とCHO細胞を容易に区別できる。また、C2C12細胞では筋肉細胞への分化が確認でき、SICMイメージでは光学顕微鏡で判別が困難な特徴も観察可能なことが示された (Fig. 5)⁶⁾。

3.2 連続測定

SICMによる形状測定は非侵襲であるため、連続測定が可能であり、細胞の経時変化を観察できる。ヒト扁平上皮癌細胞 (A431) に、細胞分裂や移動、形態変化を賦活させるEGFを添加し、形態変化を測定した (Fig. 6)³⁾。その結果、EGFを添加しなかった細胞では、細胞の位置の変化が確認できたが、表面構造の違いは見られなかった。一方、EGFを添加した細胞では、葉状仮足の伸縮と糸状仮足の伸長が確認でき、表面構造が著しく変化する様子が確認できた。また、固定化細胞では微絨毛に変化が見られなかったことから、測定による試料への影響がないことが示された³⁾。

3.3 SECM-SICM

SECM-SICMは試料の形状像と電気化学特性を同時に評価できる。ナノピペット壁面にPtをスパッタして、リング電極を形成した複合電極を用い、0.50 mM FcCH_2OH PBS溶液中で、基板上にスポット固定したグルコースオキシダーゼ (GOD) のSECM-SICMイメージを測定した (Fig. 7)¹¹⁾。Ptリング電極に+500 mV vs.

Fig. 5. (color online). Photograph (left) and SICM topographic images (right) of (a) HeLa, (b) CHO, (c) MCF-7 and (d) C2C12 cells.

Ag/AgCl を印加することで FcCH_2OH の酸化反応が発生し, $[\text{FcCH}_2\text{OH}]^+$ が生じる。一方, スポット固定した GOD はグルコースの酸化と電極反応で生じた $[\text{FcCH}_2\text{OH}]^+$ の還元反応を触媒する。よって, Pt リング電極が GOD に接近した時, $[\text{FcCH}_2\text{OH}]^+/\text{FcCH}_2\text{OH}$ のレドックスサイクルが生じ, 電流値が増幅される。SICM による形状像では, 縁が約 200 nm のリング状構造が確認でき, 光学顕微鏡では識別が困難なサイズの規則的な窪みを観察できた (Fig. 7 (a))。一方, SECM による電気化学マッピングでは, SICM で取得した形状像に一致した電流値の増幅が確認でき, グルコース添加前後の電流値変化から, GOD の活性を高解像度で捉えることができた (Fig. 7 (b and c))。また, ナノピペット

Fig. 6. Time-lapse SICM imaging of A431. (a) fixed A431, (b) live A431, (c) live A431 stimulated with EGF (50 ng/ml).

Fig. 7. (a) Topographic and (b-d) electrochemical images of GOD immobilized substrate (a and b) before and (c and d) after adding 20 mM glucose in 0.50 mM FcCH_2OH + 0.1 M KCl. The SECM nanoring and SICM nanopipette electrodes were held at 500 and 200 mV vs. Ag/AgCl, respectively, for (a-c), while the potential of the SICM nanopipette electrode was changed to -200 mV vs. Ag/AgCl for (d).

に印加する電位を変えても電気化学マッピングに変化がないことから, SICM と SECM の間に干渉がないことが示された (Fig. 7 (d))。

4. ま と め

本稿では, 生理環境下でナノメートルスケールの形状測定が可能な SICM の概要と, 実際に SICM を用いた表面形状の測定例について紹介した。SICM は生細胞表面の形状を非侵襲で評価でき, 従来の分析手法では困難であった細胞表面構造の経時変化を観察可能である。ま

た、他の分析手法と組み合わせることで、細胞表面の電気化学特性のマッピングなど、新しい知見を得ることが可能である。今後、SICMのさらなる改良と普及により、生細胞表面の新しい機能が発見されることを期待する。

文 献

- 1) P.K. Hansma, B. Drake, O. Marti, S.A.C. Gould and C.B. Prater : *Science* **243**, 641 (1989).
- 2) Y.E. Korchev, C.L. Bashford, M. Milovanovic, I. Vodyanoy and M.J. Lab : *Biophys. J.* **73**, 653 (1997).
- 3) Y. Takahashi, K. Ito, X.W. Wang, Y. Matsumae, H. Komaki, A. Kumatani, K. Ino, H. Shiku and T. Matsue : *Electrochemistry* **82**, 331 (2014).
- 4) M.A. Edwards, C.G. Williams, A.L. Whitworth and P.R. Unwin : *Anal. Chem.* **81**, 4482 (2009).
- 5) P. Novak, C. Li, A.I. Shevchuk, R. Stepanyan, M. Caldwell, S. Hughes, T.G. Smart, J. Gorelik, V.P. Ostanin, M.J. Lab, G.W.J. Moss, G.I. Frolenkov, D. Klenerman and Y.E. Korchev : *Nat. Methods* **6**, 279 (2009).
- 6) Y. Takahashi, Y. Murakami, K. Nagamine, H. Shiku, S. Aoyagi, T. Yasukawa, M. Kanzaki and T. Matsue : *PCCP* **12**, 10012 (2010).
- 7) Y. Takahashi, A.I. Shevchuk, P. Novak, Y.J. Zhang, N. Ebejer, J.V. Macpherson, P.R. Unwin, A.J. Pollard, D. Roy, C.A. Clifford, H. Shiku, T. Matsue, D. Klenerman and Y.E. Korchev : *Angew. Chem., Int. Ed.* **50**, 9638 (2011).
- 8) J. Gorelik, Y.C. Gu, H.A. Spohr, A.I. Shevchuk, M.J. Lab, S.E. Harding, C.R.W. Edwards, M. Whitaker, G.W.J. Moss, D.C.H. Benton, D. Sanchez, A. Darszon, I. Vodyanoy, D. Klenerman and Y.E. Korchev : *Biophys. J.* **83**, 3296 (2002).
- 9) J. Gorelik, A. Shevchuk, M. Ramalho, M. Elliott, C. Lei, C.F. Higgins, M.J. Lab, D. Klenerman, N. Krauzewicz and Y. Korchev : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 16018 (2002).
- 10) B. Babakinejad, P. Jonsson, A.L. Cordoba, P. Actis, P. Novak, Y. Takahashi, A. Shevchuk, U. Anand, P. Anand, A. Drews, A. Ferrer-Montiel, D. Klenerman and Y.E. Korchev : *Anal. Chem.* **85**, 9333 (2013).
- 11) Y. Takahashi, A.I. Shevchuk, P. Novak, Y. Murakami, H. Shiku, Y.E. Korchev and T. Matsue : *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 10118 (2010).