

氏名	いだ ひろき
授与学位	井田 大貴
学位記番号	博士 (学術)
学位授与年月日	学術 (環) 博第 272 号
学位授与の根拠法規	平成 31 年 3 月 27 日
研究科, 専攻の名称	学位規則第 4 条第 1 項
学位論文題目	東北大学大学院環境科学研究科 (博士課程) 先端環境創成学専攻
指導教員	ナノスケールの電気化学計測を実現する
論文審査委員	走査型プローブ顕微鏡技術の創成に関する研究
	東北大学教授 末永 智一
	主査 東北大学教授 末永 智一 東北大学教授 珠玖 仁
	東北大学准教授 梅津 光央 (工学研究科)

論文内容要旨

【緒言】

顕微鏡は、不可知の事象を視認できうる形へ変換する技術であり、少なくとも 17 世紀まで遡れるその発展の歴史は、科学技術の革新を常に傍らで支えてきた。多彩な発展を遂げる顕微鏡技術の次なる方針として、様々な領域の課題である正常に機能した試料のナノスケール観察が、大きな目標の一つとなっている。例えば、細胞生物学分野では、様々な超解像度技術が開発されているが、侵襲性の高い手法では観察した事象が実際の細胞機能を反映していない危険性があり、非侵襲計測で光の回折限界を超越できる観察技術が求められている。機能性材料の評価では、従来のバルク系におけるマクロスケールの解析から、ナノ構造の機能評価に主眼が移りつつあり、試料が機能した状態での局所計測の需要が高まっている。

そこで、ナノスケールの電気化学反応を利用した電気化学顕微鏡である、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM)、ならびに走査型ナノ電気化学セル顕微鏡 (SECCM) を発展させ、試料機能のナノスケール評価を実現する新規装置系を開発した。本論文では、時間分解能の大幅な改善を行った高速 SICM、膜界面での形状と化学動態を同時に追跡できる SICM と共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) の複合装置、電気化学計測中に光学顕微鏡による観察が可能なデジタルマイクロスコープ付き SECCM の三種類の装置開発について、詳細を記載した。また、これら三種の装置系を実測定へ応用し、それぞれ従来法では困難であった試料評価に成功して、その成果を記載した。

【計測原理と装置開発】

原理：走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM)

SICM は、非侵襲でのナノスケール形状測定に特化した SPM である。プローブには、電解質溶液を充填し、疑似参照電極を挿入したガラスナノピペット (先端径 50 ~ 100 nm) を用いる。生理溶液中でナノピペットに電圧を印加し、ピペット先端で生じるイオン流が試料への近接で空間的に阻害されて電流値が減少することを利用して、非接触でピペット-試料間の距離制御を行う。この距離制御を測定範囲中の各測定点で行う事で、非侵襲かつピペット径に起因する高空間分解能で試料表面の形状像を取得できる。SICM の測定対象は主に細胞試料であり、従来法では困難な、膜形状の実態のナノスケール評価に適している。

開発：高速 SICM

従来の SICM は、横方向への移動時にピペットが細胞に接触することによるダメージを避けるため、ピペットを試料表面から十分に引き上げたのちに横方向へ移動し、再度アプローチを行うホッピングモードが主流であった。しかし、ホッピングモードはナノピペットの移動距離の長大化を招き、それに起因する時間分解能の悪さが SICM の生細胞計測における重大な課題であった。そこで、新規走査アルゴリズムの開発・実装と、高速なピエゾステージへの換装、電磁ノイズの徹底した除去などにより、従来の 50 倍以上の高速測定が可能な高速 SICM を開発した。高速 SICM は、冗長なピペットの移動距離を削減し、高速でピペットを移動できるため、 $10 \times 10 \mu\text{m}$ 、 $64 \times 64 \text{ pixels}$ の範囲を 18 秒で取得できる。本装置により、細胞表面でのダイナミックな膜動態を追跡可能となった。

開発：SICM/共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM)

SICM は、従来法では観察困難な細胞膜界面の表面形状を取得できるが、形状像単独では解明できる事象に限度がある。そこで、焦点面の顕微鏡像を限定的に取得できる CLSM との複合装置を開発した。SICM と CLSM の融合には、手動 XY マニピュレータや、CCD の冷却ファンに対する除震機構の開発が不可欠であり、それらを自主開発することで、SICM/CLSM の立ち上げを実現した。本装置を用いることで、膜界面での形状・物質動態の同時観察を可能にした。

原理：走査型ナノ電気化学セル顕微鏡 (SECCM)

SECCM は、局所領域での電気化学活性とナノスケール形状を同時計測できる SPM である。SICM と同様、プローブには疑似参照電極を挿入し、電解質溶液を充填したナノピペットを用いるが、非溶液中でピペットを試料へ近接させる点で異なる。この状態でアプローチすると、ナノピペット先端の液滴により試料-ピペット間でアトリットルスケールの極小セルが形成され、領域限定的な電気化学計測が可能となる。この極小の反応セルは容量成分が非常に小さいために高速での電位操作が可能であり、一般的な電気化学顕微鏡による局所計測とは異なる情報も提供できる。

開発：デジタルマイクロスコープ付き SECCM

SECCM と SICM は装置系の多くが共通しているが、細胞計測を専門とする SICM と異なり、SECCM では主たる測定対象が機能性材料である。従って、試料の多くが不透過であり、倒立顕微鏡による観察・プローブの位置制御が不可能であった。そのため、従来の装置系では測定箇所の規定や、手動ステージによるプローブのアプローチが不可能であり、狙った構造の可視化が困難であった。そこで、デジタルマイクロスコープを搭載した SECCM 系を、大気条件下とグローブボックス中に二台立ち上げ、電気化学計測中の光学顕微鏡観察を可能にした。

【応用研究】

● 高速 SICM を用いた微絨毛動態の定量評価

上皮細胞の細胞膜上に存在する微絨毛は、アクチン繊維束によって細胞皮質上に構成されるサブマイクロスケールの突起構造である。過去には、微絨毛は細胞表面積を増大させる静的な構造であると考えられていたが、近年では Ca^{2+} シグナリングや、細胞の伸長、膜張力の緩衝などの動的な細胞機能へ深く関与することが示されてきた。しかし、細胞膜上の透明かつサブマイクロスケールの微絨毛の観察は困難であり、従来では侵襲的かつ瞬間的な計測手法での評価が主流であった。

開発した高速 SICM は、上皮細胞上の微絨毛動態観察を可能にした。高速化に伴う膨大な計測結果を自動解析プログラムにより解析することで、細胞表面上での動態や、高さの中央値、細胞上での密度を定量的に評価できた。上皮成長因子の添加は、細胞表面からの微絨毛の消失を引き起こすが、その際に波状の微絨毛と直線形の微絨毛の二種類が出現することを観察した。微絨毛構造の解消の生理的な意義は、細胞伸長に伴う膜表面積の増大を緩衝するためであると考えられる。また、観察された二種類の微絨毛は、形状や移動速度、移動方向も異なり、細胞膜下での異なる構造・ドライビングフォースの関与が示唆された。以上の通り、高速 SICM は細胞表面の微小構造観察に有用な手法であり、今後様々な細胞機能の解明へ適用されることが期待される。

● 膜透過性ペプチドの膜透過に起因する細胞膜ダイナミクス の直接観察

オクタアルギニンペプチド (R8) を含む膜透過性ペプチド (CPPs) は、高効率かつ調整が容易なことから、不透過性分子の細胞内への効率的な導入手法として期待されている。しかし、CPPs の流入機構の詳細や CPPs が細胞膜に及ぼす形態的な影響は未だ議論が進行中である。CPPs の内在化に伴う膜動態を明らかにするため、開発した CLSM と高速 SICM の複合装置を用い、R8 流入に起因する膜形状変化を計測した。

R8 の流入課程には大別して二種類存在し、低濃度ではマクロピノサイトーシスで、高濃度では細胞膜を直接透過することで内在化することが知られている。2 μM R8-Alexa 存在下の膜動態を計測すると、膜のラフリングを伴うマクロピノサイトーシス動態が観察された。一方 R8-Alexa 濃度を 20 μM に上げると、R8-Alexa の流入領域で数 μm のブレブ構造と、近傍に深さ 0.2~1 μm の陥入構造が可視化された。興味深いことに、ブレブ形成は CLSM で R8 流入が認められない細胞でも生じるが、その様な条件で形成されるブレブの殆どは近傍に陥入構造が伴わないことを示した。以上の結果は、ブレブ形成が R8-Alexa の直接膜透過に直接的に寄与しないことを示している。対照的に、CPPs の取込を促進させ、脂質パッキングの緩みを誘起するピレンブチレートの添加時には、R8-Alexa の流入領域において明確なブレブ構造を伴わない陥入構造が観察された。以上の結果は、R8-Alexa は濃度や細胞膜の物理状態に応じて、細胞膜の構造変化を引き起こす事を示しており、とりわけ陥入構造は R8-Alexa の直接膜透過との強い関係が示唆している。

● SECCM を用いた二硫化モリブデン (MoS_2) の局所活性計測

地球温暖化の進行に伴い、低炭素社会の実現の必要性が広く叫ばれるにつれ、化石燃料を消費しない水素発生触媒を用いた水素製造への期待がますます高まってきている。近年、水素発生触媒には、高効率だが高価かつ埋蔵量が限られる白金の代替に、二次元材料である MoS_2 ナノシートが注目され、高効率化が図られている。しかし、従来では MoS_2 の活性をマクロ系での平均化情報から判断しており、材料設計に有用なナノ領域での活性情報は十分理解されていなかった。

開発したデジタルマイクロスコープ付き SECCM は、特定の MoS_2 単粒子を狙って計測することが可能であり、局所改変や極小粒子の計測も可能である。本装置を用いて 1H MoS_2 の領域限定的な活性評価を行った結果、理論計算やマクロ計測などで予想されていた、エッジ領域の活性がテラス領域よりも高いという知見を実証できた。また、先端径 40 nm のピペットを用いた高空間分解能計測では、結晶成長で生じる粒界や約 130 nm の結晶の活性評価に成功した。試料を加熱することで結晶に欠陥が生じ、触媒活性が向上することが知られていたが、その様な試料を SECCM で計測することで、加熱による欠陥形成様態と、触媒活性の向上を視覚的・定量的に提示することに成功した。ナノピペットによる局所的な電圧印加での構造改変に成功し、SECCM を用いた試料の局所改変の可能性を提示できた。

本研究は、SECCM が材料開発に有用な情報を提示できることを示しており、二次元材料を含む様々な機能性材料評価への幅広い展開が期待できる。

【展望】

本研究で開発した高速 SICM、SICM/CLSM、デジタルマイクロスコープ付き SECCM は、それぞれ本論文に記載した応用以外にも、様々な展開が期待される。また、電気化学顕微鏡自体が、適用対象や装置性能について発展の余地を大いに残しており、今後のさらなる躍進が期待される。近い将来、本論文で示したような装置開発によってナノ領域へのインタラクトがより簡便になり、マクロとミクロを繋ぐ理解が更に重要になることが予期される。

論文審査結果の要旨及びその担当者

論文提出者氏名	井田 大貴
論文題目	ナノスケールの電気化学計測を実現する走査型プローブ顕微鏡技術の創成に関する研究
論文審査担当者	主査 教授 末永 智一 教授 珠玖 仁 教授 梅津 光央 (工学研究科)

論文審査結果の要旨

本論文は、新規電気化学顕微鏡である高速走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM)、高速 SICM/共焦点顕微鏡 (CLSM) 複合装置、走査型ナノ電気化学セル顕微鏡 (SECCM) の開発と、これらのシステムを用いたナノメートルスケールでの細胞機能の探索、及び 2 次元材料の局所機能を評価した結果について論じている。

本論文は 7 章から構成されている。

第 1 章では、既往の観察手法と電気化学顕微鏡の比較から、本顕微鏡の特徴やナノスケール観察における長所が示されている。

第 2 章では、本論文中で共通する基本的な実験操作、電気化学顕微鏡の基本構成、走査アルゴリズムの詳細を記述している。

第 3 章は、本論文の主題である新規電気化学顕微鏡の開発に関わる章である。スキャンレートを 50 倍以上改善した高速 SICM システム、形状・標識試料の動態を同時追跡可能な高速 SICM/CLSM 複合装置、デジタルマイクロスコープを搭載して光学観察を可能にした SECCM システムの三種の装置について、その開発過程を改良点も含めて詳細を記載している。

第 4 章では、高速 SICM を用いて可視化した上皮細胞上の微絨毛動態について、成長因子による刺激の有無や、形態の異なる微絨毛間での挙動の差などを定量的に分析した。高速 SICM は細胞表面の微小構造観察に有用な手法であり、様々な細胞機能の解明へ適用であることを示した。

第 5 章では、高速 SICM/CLSM 複合装置を用い、標識した膜透過性ペプチド (CPPs) の取込に起因する連続的な膜形態変化を観察した。CPPs の流入点には、従来報告されていたブレブの下に陥入構造が存在することを示し、その陥入構造と R8 流入の間に強い関係性があることを明らかにした。

第 6 章では、水素生成触媒として期待される機能性 2 次元材料である MoS₂ の局所活性計測を行った結果について述べている。ナノメートルスケールでの領域限定的な活性評価に成功し、エッジ領域が高活性であることを実験的に明らかにした。

第 7 章では、本研究を総括し、今後の展望を示した。

以上のように、本論文は、ナノメートルスケールで試料機能を可視化できる高速 SICM システム、高速 SICM/CLSM 複合装置、及び光学観察を可能にした SECCM システムの作製と、これらのシステムを用いた高速・高解像度の細胞観察と 2 次元材料の局所機能の可視化に関する研究成果について記載したものである。本研究で得られた成果・知見は、ナノメートルスケールでの機能探索の進展に大きく貢献することが期待でき、環境生命化学および局所計測科学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(学術)の学位論文として合格と認める。