

Oral presentation | 12 Organic Molecules and Bioelectronics : 12.6 Nanobiotechnology

📅 Tue. Sep 17, 2024 1:00 PM - 4:45 PM JST | Tue. Sep 17, 2024 4:00 AM - 7:45 AM UTC 🏨 C32 (Hotel Nikko 3F)

[17p-C32-1~13] 12.6 Nanobiotechnology

Nobuyuki Matsuki(Kanagawa Univ.), Makusu Tsutsui(Osaka Univ.), Keiko Tawa(Kwansei Gakuin Univ.)

1:00 PM - 1:15 PM JST | 4:00 AM - 4:15 AM UTC

[17p-C32-1]

Development of Single-Molecule Tunneling Measurement Towards Peptide Analysis

○Takahito Ohshiro¹, Yuki Komoto¹, Taniguchi Masateru¹ (1.Sanken, Osaka Univ.)

📌 Presentation by Applicant for JSAP Young Scientists Presentation Award

1:15 PM - 1:30 PM JST | 4:15 AM - 4:30 AM UTC

[17p-C32-2]

Fabrication of nanopores and molecular detection utilizing pulsed laser modulation

○Kiyosuke Matsuda¹, Hirohito Yamazaki^{1,2} (1.Nagaoka Univ. of Tech, 2.TRI)

1:30 PM - 1:45 PM JST | 4:30 AM - 4:45 AM UTC

[17p-C32-3]

Field effect control of permselective ion transport in a nanopore

○Makusu Tsutsui¹, Wei-Lun Hsu², Denis Garoli³, Iat Wai Leong¹, Kazumichi Yokota⁴, Hirofumi Daiguji², Tomoji Kawai¹ (1.Osaka Univ., 2.Univ. Tokyo, 3.IIT, 4.AIST)

📌 Presentation by Applicant for JSAP Young Scientists Presentation Award

1:45 PM - 2:00 PM JST | 4:45 AM - 5:00 AM UTC

[17p-C32-4]

Nanopore measurement with high selectivity using laser manipulation

○Kota Kaito¹, Hirohito Yamazaki^{1,2} (1.Nagaoka univ. of tech., 2.TRI)

📌 Presentation by Applicant for JSAP Young Scientists Presentation Award

2:15 PM - 2:30 PM JST | 5:15 AM - 5:30 AM UTC

[17p-C32-5]

Single-particle translocation dynamics in nanopores under polyethylene glycol

○(M2)Taiga Kawaguchi^{1,2}, Makusu Tsutsui², Sanae Murayama², Yuki Komoto², Masateru Taniguchi² (1.Osaka Univ., 2.SANKEN)

2:30 PM - 2:45 PM JST | 5:30 AM - 5:45 AM UTC

[17p-C32-6]

Identifying genome-derived difference in vector characteristics by nanopore sensing

○Makusu Tsutsui¹, Mikako Wada², Akihide Arima³, Yuji Tsunekawa², Takako Sasaki², Kazumichi Yokota⁴, Yoshinobu Baba³, Tomoji Kawai¹, Takashi Okada² (1.Osaka Univ., 2.Univ. Tokyo, 3.Nagoya Univ., 4.AIST)

2:45 PM - 3:00 PM JST | 5:45 AM - 6:00 AM UTC

[17p-C32-7]

Multi-class Shape Classification of Nanoparticles in Liquid by Analyzing Scattering Light Intensity Using Deep Learning

○(M2)Keisuke Yamamoto¹, Hiromi Kuramochi¹, Yasushi Shibuta¹, Takanori Ichiki^{1,2} (1.Tokyo Univ., 2.iCONM)

◆ Presentation by Applicant for JSAP Young Scientists Presentation Award

3:00 PM - 3:15 PM JST | 6:00 AM - 6:15 AM UTC

[17p-C32-8]

Evaluation of viable bacteria counts based on the electrochemical response of tetrazolium salts

○Akira Tokonami¹, Ikeda Hikaru¹, Fujimura Hayato¹, Sadanaga Yasuhiro¹, Shiigi Hiroshi¹
(1.Osaka Metropolitan Univ.)

3:30 PM - 3:45 PM JST | 6:30 AM - 6:45 AM UTC

[17p-C32-9]

Preparation of DNA Thin Films via Laser Molecular Beam Deposition for device applications

○Sui Liu¹, Hakurin Liu¹, Kotaro Soejima¹, Yokuken You¹, Tomohiro Murata², Xuechen Shen²,
Kosuke Minami³, Tomohiko Yamazaki³, Tomomasa Sato¹, Hideomi Koinuma⁴, Katsuhiko Ariga^{3,2},
Nobuyuki Matsuki¹ (1.Kanagawa Univ., 2.The Univ.of Tokyo, 3.NIMS, 4.SCT Inc.)

◆ Presentation by Applicant for JSAP Young Scientists Presentation Award

3:45 PM - 4:00 PM JST | 6:45 AM - 7:00 AM UTC

[17p-C32-10]

Establishment of a method to control the synthesis of fluorescent proteins by a mid-infrared pulsed laser

○Ryusei Sugawara¹, Luo Chien², Asuteka Nagao², Tsutomu Suzuki², Hirohito Yamazaki^{1,3}
(1.Nagaoka Univ. of Tech., 2.Tokyo Univ., 3.TRI)

◆ Presentation by Applicant for JSAP Young Scientists Presentation Award

4:00 PM - 4:15 PM JST | 7:00 AM - 7:15 AM UTC

[17p-C32-11]

Spatiotemporal Control of Condensation of Biomolecules by Focused Laser Beam
~Surfactant Dependence~○(M2)Shuma Matsumoto¹, Genki Fukasawa², Takahisa Matsuzaki¹, Tomoaki Matsuura³, Hiroshi
Y. Yoshikawa¹ (1.Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., 2.Grad. Sch. Life Sci. Tech., Tokyo Tech., 3.ELSI,
Tokyo Tech.)

4:15 PM - 4:30 PM JST | 7:15 AM - 7:30 AM UTC

[17p-C32-12]

Crystallization of Dps protein using peptide forming nanofiber

○Mitsuhiro Okuda^{1,2,3}, Gabriela Pretre³ (1.Meiji Univ., 2.CIC-nanoGUNE, 3.Komie Corp.)

4:30 PM - 4:45 PM JST | 7:30 AM - 7:45 AM UTC

[17p-C32-13]

Fluorescence microscopy of single extracellular vesicles released from cultured breast cancer cells

○(M2)Makoto Tokami¹, Yasunori Nawa¹, Hajime Shigeto², Shohei Yamamura², Keiko Tawa¹
(1.Kwansei Gakuin Univ., 2.HMRI, AIST)

ペプチド解析にむけたアミノ酸 1 分子トンネル計測法の開発

Development of Single-Molecule Tunneling Measurement Towards Peptide Analysis

阪大産研¹ ○大城敬人¹, 小本祐貴¹, 谷口正輝¹
ISIR-SANKEN, Osaka Univ. ¹○Takahito Ohshiro¹, Yuki Komoto¹, Masateru Taniguchi¹

E-mail: toshiro@sanken.osaka-u.ac.jp

1. 緒言

ペプチドは、アミノ酸のユニットからなる生体高分子で、様々な機能発現することからシーケンシングの開発に近年興味が高まってきた。これまで、我々はトンネル電流を指標として1分子ごとのコンダクタンスの高速計測可能なセンサー開発を行ってきた。そこで我々は、高速リードが可能なシーケンサーとして、1分子量子シーケンサーをもちいたペプチドシーケンシング法を提案する。

1分子量子シーケンサーとは、ナノギャップ電極間を通過する一本鎖生体高分子の各モノマー種の違いを、トンネル電流を指標としたシグナルの違いによって配列決定をする方法である [1-4]。我々の方法では複数のエピ修飾をターゲット分子内で直接観察することができる。

本研究では、ペプチド解析の精度を高めるために、アミノ酸の1分子トンネル計測法を開発した。アミノ酸の一官能基レベルでの識別及び構造異性体の識別のため、1分子計測により得られるデータを基に機械学習を用いた識別法を開発した。20種類のアミノ酸の電気的特性を捉え、さらに修飾分子の高精度での識別能について検討した。さらに、これを用いてペプチドの違いの識別し定量すること検討を行った

2. 計測・実験条件

計測に用いる nano-MCBJ デバイスは、シリコン基板に金ナノ接合を形成するこの金細線を熱振動による自己破断後、ピエゾ素子をもちいて電極間距離を最適化し、電気計測を行った。金細線には酸化シリコンのナノ流路を重ね書きした。このときナノ流路とサンプルチャンバーの間の部品を接続するテーパ状の集束部を配置した。この流路を PDMS カバーで覆った上、電気泳動で核酸塩基鎖を電気泳動により分子制御し、高速電気計測

(10kHz-100kHz)を行った。測定時にはギャップ電極間には直流 0.1V でバイアス電圧を印加した。得られたシグナル波形を時間方向に分解し、シグナルの平均波形、コンダクタンスのピーク値、平均電流値、シグナル持続時間などの特徴量を基に機械学習モデルの学習と評価を行った。

3. 結果・考察

ペプチドは、アミノ酸のユニットからなる生体高分子で、ペプチドの構成要素である L/D 体を含むアミノ酸の識別を行った。得られたシグナルを、機械学習を用いて分子種を識別可能な学習を作成した。

その結果、39種の識別能は50%成功した。ランダムでは2.5%の正答率であることから、今回得られた識別能は十分に優位であるといえる。さらにアミノ酸の代表的なエピ修飾であるリン酸化（リン酸化チロシン）、メチル化されたアミノ酸（メチル化リジン）についても同様に計測を行い、機械学習によって識別を行った。その結果、化学修飾前のアミノ酸との識別能はいずれも高い識別能を持つことが分かった。

関連論文[1] Ohshiro T. et al., Nat. Nanotech. (2014), 9,835 [2] Ohshiro T. et al., Sci.Rep., (2019), 9, 3886 [3] Ohshiro T. et al., Sci.Rep. (2018), 8,8517. [4] Ohshiro T. et al., Sci. Rep. (2021),11,19304. [5] Ohshiro T. et al., Anal. Biochem. (2022), 114645. [6] Ohshiro T. et al., Sci.Rep, (2022), 12, 6945.

パルスレーザー変調を活用したナノポアの作製と分子検出

Fabrication of nanopores and molecular detection utilizing pulsed laser modulation

長岡技大 工学専攻¹, 長岡技大 産学融合トップランナー養成センター²○松田 杏介¹, 山崎 洋人^{1,2}Nagaoka Univ. of Tech.¹, Nagaoka Univ. of Tech. Top Runner Incubation Center for Academia-Industry Fusion.²○Kyosuke Matsuda¹, Hirohito Yamazaki^{1,2}

E-mail: s213086@stn.nagaokaut.ac.jp

ナノポア計測とは、ナノサイズの孔に分子が通る際の電流波形から大きさや構造、表面状態など分子の同定ができるラベルフリーの単一分子計測技術のことである。本研究室ではレーザーエッチングと電圧による絶縁破壊を組み合わせた独自の加工法（レーザーエッチング破断法）^[1]により、レーザー集光位置に単一ナノポアを作製することができる。これまでの研究成果で、パルスレーザーを用いることで、安定的にナノポアが加工できることが分かってきた。一方で分子計測における課題として、ナノポアを通過する分子の速度が速いことがあげられる。そこで本発表では、パルスレーザーエッチング破断法により作製したナノポアを用いた分子低速化法について発表する。Figure 1 に本研究で使用する実験装置の概略を示す。Si 基板に支持された膜厚 50 nm の SiN にパルス変調を施したレーザーを集光させ、電圧を印加し、孔径 1.3~2 nm のナノポアを作製する。実験条件として、レーザー波長 488 nm, レーザー強度 45 mW, 印加電圧 1V, Threshold 1.5 nA でナノポアを加工した。サンプルとして、poly dACAC 120 mer を使用した。Figure 2 に DNA 検出実験の結果を示す。印加電圧を増加すると分子の通過頻度が増加したことから(Figure 2a), 本手法を用いたナノポアでの DNA 検出に成功した。また、硫酸アンモニウム溶媒をナノポア加工時に使用して、ナノポア壁面の表面電荷を変化することで、DNA 通過速度の低減化ができるようになり、Figure 2b に示すように DNA の配列の識別にも成功した。

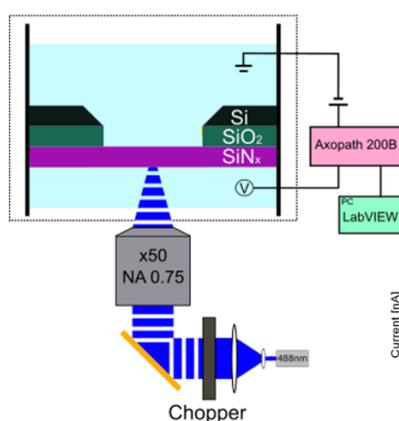


Fig. 1 Schematic diagram of experimental setup

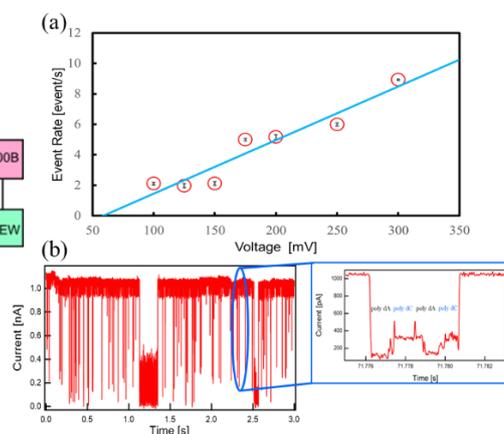


Fig. 2 DNA detection results

参考文献

[1] Hirohito Yamazaki et al. Photothermally Assisted Thinning of Silicon Nitride Membranes for Ultrathin Asymmetric Nanopores. ACS Nano. 2018. 12. 12. 12472-12481.

電界効果によるナノポアのイオン選択性制御

Field effect control of permselective ion transport in a nanopore

阪大産研¹, 東大工², Instituto Italiano di Tecnologia³, 産総研⁴

○筒井 真楠¹, Wei-Lun Hsu², Denis Garoli³, Iat Wai Leong¹, 横田 一道⁴,

大宮司 啓文², 川合 知二¹

Osaka Univ.¹, Univ. Tokyo², IIT³, AIST⁴, Makusu Tsutsui¹, Weil-Lun Hsu², Denis Garoli³,

Kazumichi Yokota⁴, Hirofumi Daiguji², Tomoji Kawai¹

E-mail: tsutsui@sanken.osaka-u.ac.jp

固体ナノポアは微細加工技術を用いて人工的に作製されるナノサイズの細孔である。ナノポアの大きさが電解質液中におけるデバイ長と同程度にまで小さいと、ナノポア壁面の表面電荷がイオン輸送に大きく影響するようになる。例えば負の表面電荷を帯びたナノポア膜の場合、アニオンは静電反発を受けナノポアを通過しなくなり、カチオンだけが通過するようになる。このイオン選択性を塩分濃度差下で実践すると、カチオンの拡散輸送に伴い電位差が生まれる。これにより、海水と河水の塩分濃度差から電気エネルギーを生み出す発電技術の研究開発が近年急速に進められている¹。この逆電気透析法による発電方式では、イオン透過率とイオン選択性が共に高い性質を有する膜ほど、イオン系のギブスエネルギーを高効率に電気エネルギーへと変換できる。これまでの研究では、共役性有機構造体や2次元ナノポア膜を用いて透過性と選択性を向上させる試みがなされてきた、これらのアプローチでは表面電荷密度が膜材質によって決定されるため、特にイオン選択性を意図する形に向上させることが困難であった。そこで本研究では、トランジスタの動作原理を応用し、ナノポア周囲をゲート電極で覆った構造を用いて電界効果によりイオン選択性制御が可能であるか検証を行った²。

電子線描画法と反応性イオンエッチング、高周波マグネトロンスパッタ法等の加工技術を用い、直径60 nmのマルチナノポアとサラウンドゲート電極で構成される集積ナノポア構造をシリコンウエハ上にある極薄窒化シリコンメンブレン中に形成した。これを用いて塩分濃度差を付与した状態でイオン輸送特性測定を実施した。ゲート電圧を加えない場合、メンブレン表面が負に帯電していることを示唆する極性の整流性と拡散電位差が観測された。そこに負のゲート電圧を加えると、ゲート電圧の増大に伴い拡散電位が負の方向に大きくなる傾向が現れた。これはゲート電圧によってメンブレン表面の負電荷密度が増大したことを示唆している。逆に正のゲート電圧を加えた場合には、ゲート電圧を大きくするに従いあるところで拡散電位がゼロを上回ると同時に、イオン電流の整流性の向きが反転した。これらの結果により、ゲート効果によってナノポアのイオン選択性が自在に制御可能であることを実証できた²。

[参考文献]

¹ Z. Zhang et al., Nat. Rev. Mater., 6, 622 (2021).

² M. Tsutsui et al., ACS Nano, 18, 15046 (2024).

レーザーマニピュレーションを活用した高選択性を有するナノポア計測

Nanopore measurement with high selectivity using laser manipulation

長岡技大 工学専攻¹, 長岡技大 産学融合トップランナー養成センター²

○海藤 光太¹, 山崎 洋人^{1,2}

Nagaoka Univ. of Tech. Department of Engineering, Nagaoka Univ. of Tech. Top Runner Incubation

Center for Academia-Industry Fusion ○Kota Kaito¹, Hirohito Yamazaki^{1,2}

E-mail: s213016@stn.nagaokaut.ac.jp

ナノポア計測とは、ナノサイズの孔を通過する一分子を電氣的に計測する技術である。本技術は計測装置の低コスト化や小型化を望める反面、検出限界があることや多数の生体分子で構成された条件下での選択性に問題がある。この2つの欠点を解決するため、本発表ではレーザーマニピュレーションと磁気ビーズを活用したナノポア測定手法を提案する。本手法では、検出する標的分子が結合した磁気ビーズをレーザーマニピュレーションによりナノポア付近に配置し、溶出することで低濃度かつ選択性の高いナノポア計測を目指す。Figure 1 に提案手法の概要を示す。ナノポア作製後、標的分子(GFP)が結合した磁気ビーズを2 μL 滴下し、磁石を用いて SiN 膜に磁気ビーズを引き寄せた後、波長 532 nm、出力 9.2 mW のレーザーを磁気ビーズに近づけることでビーズを操作できることがわかった。このレーザー操作により磁気ビーズをナノポア近傍に配置し、ビーズに 20 μm デフォーカスしたレーザーを照射することで SiN 膜を加熱、結合した生体分子を溶出した。これにより、狙った位置に局所的な高濃度標的分子場を形成することができ、電圧を印加することで標的分子の検出を試みた。本手法を用いて Figure 2 に示すような電流遮断波形が確認され、磁気ビーズからの標的分子の溶出とその検出に成功し、高い選択性を有するナノポア計測法が構築できた。本手法は、先行研究[1]と比較して、ナノポアに表面修飾などの化学的処理を行う必要がなく、汎用性に優れる。今後、複数種の磁気ビーズを用いて一条件の中で狙った磁気ビーズからのみ溶出する実験を行い、本手法の選択性についてさらなる検証を行う。

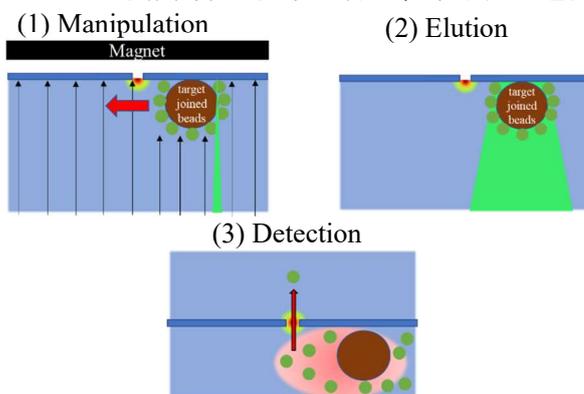


Figure 1 Schematic diagram of the proposed method

参考文献

- [1] Kyloon Chuah, Yanfang Wu, S.R.C. Vivekchand, et al. Nanopore blockade sensors for ultrasensitive detection of proteins in complex biological samples, Nat. Commun. 10, 2109 (2019).

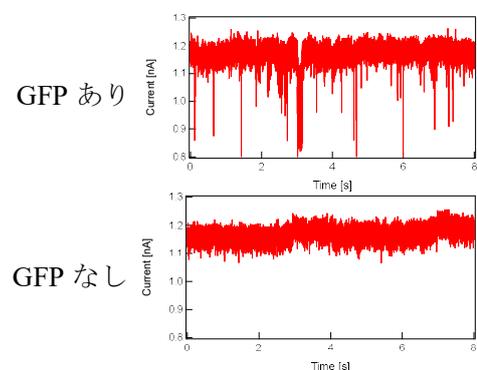


Figure 2 Experimental result

ポリエチレングリコール溶液中のナノポアにおける1粒子電気泳動ダイナミクス

Single-particle translocation dynamics in nanopores under polyethylene glycol

阪大¹ ○(M1)川口大雅, 筒井真楠, 村山さなえ, 小本祐貴, 谷口正輝

Osaka Univ. °T. Kawaguchi, M. Tsutsui, S. Murayama, Y. Komoto, M. Taniguchi

E-mail: taiga.kawaguchi32@sanken.osaka-u.ac.jp

固体ナノポアとは、シリコン基板上的の固体メンブレンに形成される直径数 nm から数百 nm の貫通孔であり、電解質液中で電気化学計測を実施し、DNA やウイルスなどの生体分子・粒子がナノポアを通過する際に得られるイオン電流変化を調べることで、その分子・粒子の大きさや形状、表面電荷などを非破壊的に知ることができます。このセンサでは測定する物質が微小なほどナノポアの通過時間が短くなる傾向があり、イオン電流計測が物質の泳動速度に追いつかなくなります。そのような場合、測定した物質の形状が抵抗波形に詳細に反映されないことが課題とされてきました。微小な物質を測定する際には、イオン電流計測が物質の泳動速度に追いつくために、電解質液の粘度を高くし物質の泳動速度を遅くする工夫が取られてきました。しかしその一方で、電解質液の粘度がナノポア内の粒子の泳動ダイナミクスにどのような影響を与えるかは詳しく調べられてきませんでした。そこで、我々は前回までの研究[1]において、グリセロールを用いて電解質液の粘度を高め、高粘性下におけるナノポア内の1粒子電気泳動ダイナミクスを観測しました。その結果、ポリスチレンナノ粒子がナノポアに入るまでの時間を t_{on} 、出ていくまでの時間を t_{off} とすると、水の場合では t_{on} と t_{off} の比が大きく変化せず対称的な抵抗波形が得られたのに対し、グリセロール溶液の場合ではナノポアに印加する電圧を高くするほど、 t_{on} が長くなり、 t_{off} は短くなり傾向が見られました。本研究では、この原因を探るために、電解質液に平均分子量が 200 のポリエチレングリコール(PEG200)とリン酸緩衝液の混合比を変えた非ニュートン流体中で1粒子電気泳動ダイナミクスがダイラタントな性質によってどのように変化するかを調べました。

Ag/AgCl 電極を用いたイオン電流計測により、直径 300 nm のナノポアを通過するリン酸緩衝液とポリエチレングリコールの混合液中の直径約 180 nm のポリスチレン粒子を検出しました。その結果、PEG200 を 20 vol.%混合させた溶液中では、ナノポアに印加する電圧を高くするほど、イオン電流信号波形が非対称な形状になる傾向を観測しました。この傾向はグリセロールで電解質液の粘度を高くした場合の傾向と一致しました。そこで、PEG200 を 50 vol.%混合させた溶液中でも同様の実験を行うと、20 vol.%混合させた場合よりも t_{on}/t_{off} の比が大きくなり、より抵抗波形が非対称になることが分かりました。これは、電解質液の粘度が高いほどナノポア通過時に受ける局所粘度の動的変化が大きくなることを示唆しています。

【参考文献】

[1] T. Kawaguchi et al, *Small Methods*, DOI: 10.1002/smt.202301523

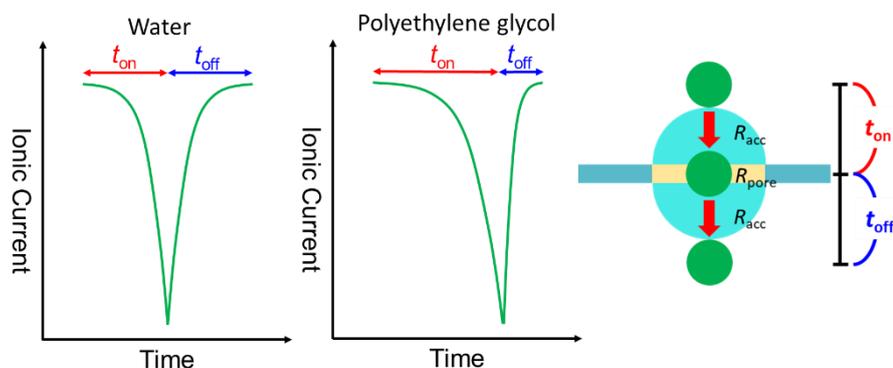


Figure 1. The particle signals before (t_{on}) and after (t_{off}) of the nanobeads through the nanopore.

ナノポア計測によるウイルスベクター識別

Identifying genome-derived difference in vector characteristics by nanopore sensing

阪大産研¹, 東大², 名古屋大³, 産総研⁴

○筒井 真楠¹, 和田 美加子², 有馬 彰秀³, 恒川 雄二², 佐々木 貴子², 横田 一道⁴,
馬場 嘉信³, 川合 知二¹, 岡田 尚巳²

Osaka Univ.¹, Univ. Tokyo², Nagoya Univ.³, AIST⁴, Makusu Tsutsui¹, Mikako Wada², Akihide
Arima³, Yuji Tsunekawa², Takako Sasaki², Kazumichi Yokota⁴, Yoshinobu Baba³, Tomoji Kawai¹,
Takashi Okada²

E-mail: tsutsui@sanken.osaka-u.ac.jp

固体ナノポアは液中の微小物体を1粒子・分子レベルで検出する超高感度なセンサである¹。本研究では、その高い空間分解能に注目し、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの1粒子識別がどこまで可能かを検証した。計測対象には、異なる分子長の単鎖 DNA を内包した AAV9 を用いた²。また、ナノポアは電子線描画法と反応性イオンエッチングにより直径 40 nm から 150 nm のものを加工し実験に供した。

AAV9 を含むリン酸緩衝液中において 1 対の銀/塩化銀を用いたイオン電流計測を実施した。AAV9 が含まれた緩衝液と反対側にある電極の極性が正となる向きに電圧を加えると、ナノポアにおけるイオン輸送を反映したイオン電流が計測されるだけで、ベクター粒子のナノポア通過を示唆するような電流変化は観測されなかった。一方、電圧の極性を反転させるとパルス状の電流信号が検出された。ナノポアのメンブレンは窒化シリコンで作られたものであり、その表面が中性に近い緩衝液中において負電荷を帯びていることを踏まえると、観測されたパルス信号は電気浸透流によってベクター粒子がナノポアを通過したことを示すものであると解釈できた。この条件を用いて、様々な直径のナノポアで計測を実施したところ、直径 66 nm まで細孔径を小さくすることで、イオン電流信号の S/N 比を向上させることができた。しかしそれ以上に小さなナノポアになると S/N 比はさらに向上できるものの、ナノポアがベクターで詰まる傾向がより顕著になった。このため、ベクター計測には直径 66 nm のナノポアが好適であると考えた。そこで、66 nm のナノポアを用いて、粒子内が空のベクターと、1500 塩基から 4800 塩基までの様々な塩基長の単鎖 DNA を内包した AAV9 の 1 粒子計測を実施した。その結果、ベクター内のゲノムサイズが大きいものほど、波高の高いイオン電流信号が観測された。そこで、有限要素法によるイオン電流シミュレーションを行い、その解析結果を計測で得られたイオン電流信号波高と照合することで、検出されたベクター粒子径を推定した。その結果、ベクター粒子径には内包する DNA の長さに応じた数 nm レベルの差が存在することを明らかにできた²。

[参考文献]

¹ A. Arima et al., Anal. Chem., 93, 215 (2021).

² M. Tsutsui et al., ACS Nano, doi.org/10.1021/acsnano.4c01888.

深層学習を用いた液中ナノ粒子の散乱光輝度解析による 多クラス形状分類

Multi-class Shape Classification of Nanoparticles in Liquid
by Analyzing Scattering Light Intensity Using Deep Learning

東大院工¹, ナノ医療イノベーションセンター²
○山本啓介¹, 倉持宏実¹, 澁田靖¹, 一木隆範^{1,2}

The University of Tokyo¹, Innovation Center of NanoMedicine (iCONM)²
Keisuke Yamamoto¹, Hiromi Kuramochi¹, Yasushi Shibuta¹, Takanori Ichiki^{1,2}
E-mail: yamamoto@bionano.t.u-tokyo.ac.jp

【緒言】我々は、不均質な液中ナノ粒子集団を効率良く評価するために、個々の粒子を識別した状態での1粒子測定と多項目解析の実現を目指してきた。現在広く普及している液中1粒子計測技術 Nano Tracking Analysis (NTA)[1]では評価可能な性状が限られているが、NTA法で得たブラウン運動の軌跡データ解析に深層学習を適用することにより、ナノ粒子の形状異方性の検出に成功した[2]。本研究では、ナノ粒子の光散乱画像から得られる輝度情報を基に、形状分類の可能性を検討した(Fig.1)。これまでに、4種類の金ナノ粒子について、どの2種の組み合わせについても、軌跡データと同様に輝度情報で形状分類できることを確認した。今回は、4種類の粒子の輝度データを同時に学習させて多クラス分類について検討した。

【実験方法】4種類の金ナノ粒子懸濁液(球状:40 nm径, 80 nm径; ロッド状:40 nm径×180 nm長, 50 nm径×150 nm長)を準備し、ナノ粒子分析装置(NTA法, レーザー:405 nm, 100 mW)で計測して連続画像(100 frames)を撮影した。取得した連続画像データをもとに、1粒子毎に液中ナノ粒子のブラウン運動を追跡し、粒子重心の座標変位を求めた。各種1500個ずつ、合計6000粒子について、重心座標を中心に100 pix四方の輝度情報を抽出し、1粒子毎の散乱光強度を積算し、散乱光強度の時系列データとした。今回はアスペクト比(1.0=球, 3.0, 4.5)ごとに3種のラベル(それぞれクラス0, 1, 2)を付与し、3値分類を行った。1次元畳み込み(1D-CNN+Bi-LSTM)モデル[2]を使用して深層学習による解析を行い、形状分類の正答率を求めた。

【結果及び考察】作成したデータセットでモデルを学習・評価した結果、テストデータに対する平均正解率は約74%に達した。One vs Restで3パターンの精度を測ったところ、ROCカーブは順調な学習を示し、特にクラス0 vs クラス1+2分類のAUC値が最も高く、球状粒子の特徴をよく学習していることが分かった。学習済みモデルで40 nm径の球状金ナノ粒子の形状を

予測させたところ、500粒子中454個(約91%)を球と判定した。また、同数のアスペクト比4.5のロッド(クラス1)と3.0のロッド(クラス2)ではそれぞれ220個(約44%), 366個(約73%)を正しくクラス分けし、3.0のロッドも順調に学習が進んでいることが分かった。適合率が低かった4.5ロッドの場合でも434個(約85%)をロッド(クラス1か2)と判定しており、このモデルを使用することで球とロッドの分類可能性が示された。また、異なるアスペクト比のロッド同士を分類する手法には改善の余地があると考えられる。

【結言】NTA法と深層学習解析を組み合わせることで、4種類の金ナノ粒子の散乱光輝度変化から、粒子のアスペクト比ごとに分類を行う3クラス分類モデルを作成した。今後は粒子のアスペクト比や形状のバリエーションを増やすと共に、材質の異なるマテリアルへの応用を検討する。

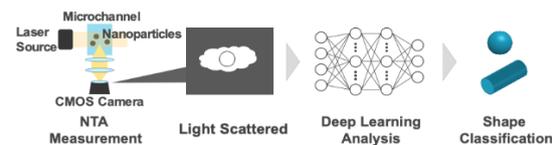


Fig.1 Schematic diagram of shape prediction model by combining NTA measurements and deep learning analysis.

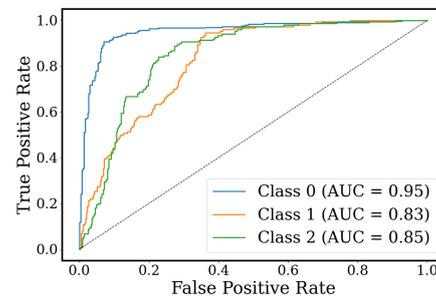


Fig.2 ROC curve of each class. Class 0, 1 and 2 correspond to two nanosphere, nanorod whose aspect ratios are 4.5 and 3.0.

【参考文献】

- [1] R. A. Dragovic, et al., *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* **7**, 780 (2011).
- [2] H. Fukuda, et al., *APL Machine Learning* **1**, 046104 (2023).

テトラゾリウム塩の電気化学応答に着目した生菌数評価 Evaluation of viable bacteria counts based on the electrochemical response of tetrazolium salts

阪公大院工¹ ○床並 朗¹, 池田 光¹, 藤村 颯斗¹, 定永 靖宗¹, 椎木 弘¹

Osaka Metropolitan Univ.¹, °Akira Tokonami¹, Hikaru Ikeda¹, Hayato Fujimura,

Yasuhiro Sadanaga¹, Hiroshi Shiigi¹

E-mail: shii@omu.ac.jp

【緒言】病原性細菌を危害要因とした食中毒事故や感染症の流行は、衛生管理技術の発達した近年においてもしばしば発生し、大きな社会混乱を引き起こす。一般生菌数は、一定条件下で発育する生菌総数であり、食品分野での微生物汚染の主要な指標である。この生菌数の評価には、培地上での増殖を指標とする培養法が信頼性の高い検査法として広く利用されているが、分離や増菌などの工程に数日を要し、製品出荷後に検査結果が判明するという致命的な問題があった。テトラゾリウム塩の一つである 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) は、黄色の水溶液として得られる。MTT は細胞膜透過性を有し、生細胞内において生成する代謝産物により還元され、細胞内で不溶性ホルマザンに変換されて紫色を呈する。本研究では、MTT の電気化学特性に着目して生菌数の評価を行った。¹⁻³⁾

【実験】グルコースを含む普通ブイヨン培地に MTT を 0.1 mM となるように加えた。ここに細菌分散液を加え、37 °C で培養した。この細菌分散液に、作用極としてグラッシーカーボン電極、対極として白金電極、対称極として銀 | 塩化銀電極を用い、サイクリックボルタンメトリー (CV) を行った。

【結果と考察】 MTT を含む大腸菌懸濁液中での CV (−0.3V~+0.7 V vs. Ag|AgCl) では 1 対の酸化還元電流が見られた (Fig.1)。電流応答はインキュベーション時間の増大とともに減少した。これは、生菌に取り込まれた MTT がホルマザンに変換され、再び細胞外に溶解することなく細胞内に沈着し、懸濁液中に溶存する MTT が減少するためである。また、懸濁液における生菌数の増大に伴って電流応答が減少した。これらのことから、生菌に取り込まず、懸濁液中に残存する MTT の電流応答に着目することで生菌数を見積もることが可能である。また、一般生菌に含まれる他の菌種を用いた場合においても同等の応答が得られた。そこで、実試料 (腐敗鳥肉) の計測についても検討したところ、本法で電流値から見積もられた生菌数と、従来の培養法で得られた結果には良い一致が見られた。

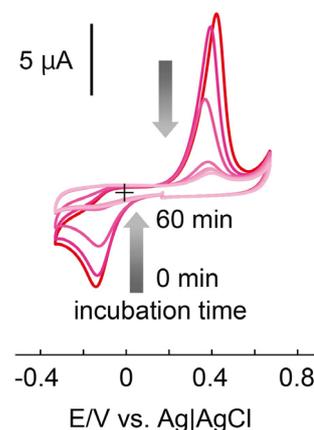


Fig.1 CVs in bacterial suspension with 0.1 mM MTT.

- 1) H. Ikeda, A. Tokonami, *et al. Anal. Chem.*, **95**(33), 12358 (2023).
- 2) H. Ikeda, A. Tokonami, *et al. Chem. Pharm. Bull.*, **72**(3), 253-257 (2024).
- 3) H. Ikeda, A. Tokonami, *et al. Electrochemistry*, **92**(2), 022015 (2024).

デバイス応用へ向けたレーザー分子線堆積による DNA 薄膜の作製

Preparation of DNA Thin Films via Laser Molecular Beam Deposition for device applications

神奈川大¹, 東大院新領域², 物材機構³, SCT (株)⁴

○劉 帥¹, 劉 博林¹, 添島 弘太郎¹, 楊 昱軒¹, 村田 朋大², Xuechen Shen²,
南 皓輔³, 山崎 智彦³, 佐藤 知正¹, 鯉沼 秀臣⁴, 有賀 克彦^{2,3}, 松木 伸行¹

Kanagawa Univ.¹, The Univ. of Tokyo², NIMS³, SCT Inc.⁴

○Sui Liu¹, Hakurin Liu¹, Kotaro Soejima¹, Yokuken You¹, Tomohiro Murata², Xuechen Shen²,
Kosuke Minami³, Tomohiko Yamazaki³, Tomomasa Sato¹, Hideomi Koinuma⁴
Katsuhiko Ariga^{1,2}, Nobuyuki Matsuki¹

E-mail: matsuki@kanagawa-u.ac.jp

【はじめに】近年、デオキシリボ核酸 (DNA) はその特徴的な分子構造を活かした機能性ナノ材料としての応用が期待されている[1-3]. 我々は、無機・有機材料のハイブリッドな分子層堆積を可能とするレーザー分子線堆積法 (LMBD 法) を用いて DNA を薄膜化し新たなデバイス応用の実現を目指している[4]. 本研究では、レーザー種や照射条件を様々に変化させて DNA 薄膜を作製し、その結合構造や電気特性など諸物性に与える影響について調べた。

【実験方法】高真空 LMBD 装置内へ有機洗浄した Au 蒸着ギャップ電極付合成石英基板ノンドープ Si 基板を導入し、基板と対向位置に配置したターゲット DNA 原料に赤外連続レーザー (CWIR, 波長: 808 nm, パワー 3.2 W) または可視パルスレーザー (Pulsed-Vis, 波長: 532 nm, パワー 2.8 W) を照射し基板上へ製膜を行った。比較のため DNA 水溶液による Drop-cast (DC) 法でも製膜を行った。フーリエ変換赤外分光 (FT-IR) 吸収測定および恒湿下電気特性測定を行い、DNA の結合構造、および相対湿度に対する抵抗率変化を評価した。

【実験結果】Fig. 1 に 1700 cm⁻¹ における Guanin C=O 伸縮吸収ピーク最大値で規格化した FT-IR スペクトル結果を示す。1221 cm⁻¹, 1083 cm⁻¹ のリン酸塩基結合吸収ピークに着目すると、Pulsed-Vis-LMBD DNA 膜は DC DNA 膜と同様のピーク高さを有しておりリン酸塩基結合構造が保持されているが、CWIR-LMBD DNA 膜においては同吸収ピークが顕著に減少またはほぼ消失している。CWIR-LMBD DNA 膜においては、レーザー加熱により DNA 構造が断片化したと考えられる。Fig. 2 に各 DNA 膜について測定した抵抗率の相対湿度依存性を示す。30% ~ 65% の範囲において Pulsed-Vis および DC DNA 膜は 4 桁程度の顕著な抵抗率変化を示しているのに対し、CWIR-LMBD DNA 膜では殆ど変化を

していない。この原因は結合構造変化に伴う水和化の相違に帰せられると予想されるが、詳細については現在検討中である。

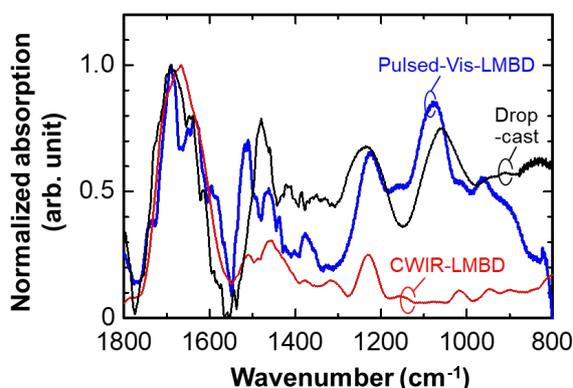


Fig. 1 FT-IR spectra of DNA thin films prepared via Pulsed-Vis-LMBD, CWIR-LMBD and drop-cast methods.

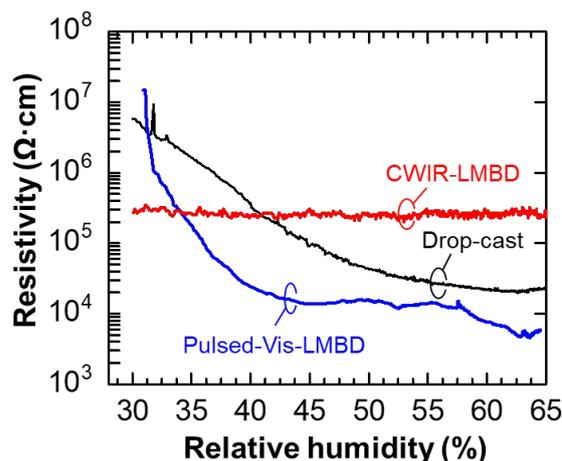


Fig. 2 Relative humidity dependence of resistivity for DNA thin films prepared by Pulsed-Vis-LMBD, CWIR-LMBD and drop-cast methods.

- [1] N. C. Seeman, *Nature* **421**, 427 (2003).
- [2] L. Hui *et al.*, *Adv. Func. Mater.* **32**, 2112331 (2022).
- [3] K. E. Dunn *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **34**, 97 (2023).
- [4] T. Murata *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **96**, 29 (2022).

中赤外パルスレーザーによる蛍光タンパク質の合成制御方法の確立 Establishment of a method to control the synthesis of fluorescent proteins by a mid-infrared pulsed laser

長岡技大 工学専攻¹, 東大 工学部², 長岡技大 産学融合トップランナー養成センター³

○菅原 隆世¹, 羅 簡², 長尾 翌手可², 鈴木 勉², 山崎 洋人^{1,3}

Nagaoka Univ. of Tech. Department of Engineering¹, Tokyo Univ. Faculty of Engineering², Top
Runner Incubation Center for Academia-industry Fusion³, °Ryusei Sugawara¹, Luo Chien²,
Asuteka Nagao², Tsutomu Suzuki², Hirohito Yamazaki^{1,3}

E-mail: s213037@stn.nagaokaut.ac.jp

感光性分子を用いた生命反応の制御に関する研究が注目されている。従来の方法として修飾をした生体分子にレーザーをトリガーとして生体反応を制御するものであり、特徴として時空間的に選択性が高く、基礎研究ならびに医療応用が可能である。課題として、トリガーとなるレーザーが近紫外光から可視光領域で正常な生体組織にダメージを与えることや、生体分子の修飾による悪影響が懸念される。この課題を解決するために本研究では中赤外パルスレーザーに着目した。中赤外パルスレーザーは短波長と比べエネルギーが小さく生体組織を尊書させる恐れが小さい。また、中赤外照射のみの制御が可能となれば生体分子への修飾が不要となる。しかし、中赤外レーザー照射による制御方法は研究が進んでおらず、具体的な合成因子への影響や制御条件が不明である。よって本研究では中赤外パルスレーザー照射によるタンパク質合成活性を蛍光タンパク質の蛍光強度から評価し、その影響の調査と制御条件を確立することを目的とする。実験方法としてタンパク質合成系(PUREfrex®: ジーンフロンティア株式会社)に緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子の鋳型 DNA(GFP plasmid)を混合させこれらを直径約 20–70 μm の油中液滴に封入し、自作したウェルに滴下し Si ウエハー光学窓で封をした(Fig.1 左)。そのウェルをチャンバー内に入れ、中赤外パルスレーザーを照射しながら 37°C で 2 時間アニーリングを行った。レーザー波数は DNA のリン酸基に強い吸収がある 1070 cm^{-1} とした(Fig.1 右)。パルス幅は 500 ns、繰り返し周波数は 100 kHz とし、同時に照射していないサンプルもアニーリングした。その後、蛍光顕微鏡より各ドロップレットの蛍光強度を測定し、合成量を評価した。Fig.2 に結果の測定した蛍光強度の分布を示す。照射したサンプルの蛍光強度は照射していないサンプルと比べ蛍光強度が 4 割程度減少した。このことから、中赤外パルスレーザー照射により生体分子の特定の分子振動を誘発し合成反応の制御できることが示された。

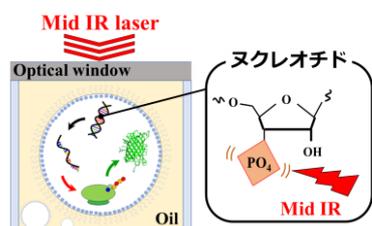


Fig.1 Internal configuration of wells

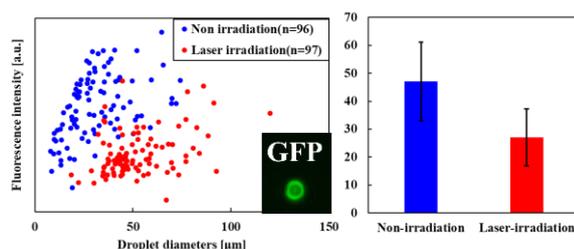


Fig.2 Fluorescence intensity of droplets irradiated by mid-infrared pulsed laser(Left:Distribution, right:Average)

集光レーザービームによる生体分子濃縮の時空間制御 ～界面活性剤依存性～

Spatiotemporal Control of Condensation of Biomolecules by Focused Laser Beam ～Surfactant Dependence～

阪大院工¹, 東工大生命理工², 東工大地球生命研³

○(M2) 松元 脩真¹, (M2) 深澤 元喜², 松崎 賢寿¹, 松浦 友亮³, 吉川 洋史¹

Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.¹, Grad. Sch. Life Sci. Tech., Tokyo Tech.², ELSI, Tokyo Tech.³

○Shuma Matsumoto¹, Genki Fukasawa², Takahisa Matsuzaki¹, Tomoaki Matsuura³, Hiroshi Y.

Yoshikawa¹ E-mail: matsumoto@mp.ap.eng.osaka-u.ac.jp

【序論】 細胞内は、タンパク質、DNA、糖質、脂質などの生体分子が高密度に詰め込まれた「分子夾雑環境」であり、多くの生化学研究で用いられる均一かつ希薄な溶液環境とは大きく異なる。このような分子夾雑環境を人為的に作り出すことができれば、細胞内での生体分子の構造・機能を理解するための重要な生体外モデル系となりうる。そこで近年我々は、集光レーザービームを用いて生体分子の濃縮を時空間制御する手法の開発に取り組んできた(1)。本手法は、レーザーの物理作用(光圧、光熱変換等)により分子の集合・配列を制御することに基づいており、既に様々な分子の結晶化の制御などに応用されている(2)。本研究では、集光レーザービームによる生体分子濃縮の最適条件を探索し、界面活性剤が重要因子の一つであることを見出したので報告する。

【実験・結果】 連続発振レーザー($\lambda = 1064 \text{ nm}$) を蛍光タンパク質(mCherry)/オリゴ DNA/有機低分子色素の三種の混合水溶液の気液界面に対物レンズ(NA: 0.95)により集光照射し、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡で分子濃縮ダイナミクスを蛍光観察した。Fig. 1 に蛍光タンパク質の代表的結果を示す。レーザー照射により集光領域にタンパク質が数十倍以上濃縮される様子が観察された。興味深いことに、このような分子濃縮の効果は、溶液中の界面活性剤(Tween 20)濃度に伴って大きくなることがわかった。本結果は、レーザーが生体分子濃縮の時空間制御に有効であることを示しており、分子混雑環境の新しい実験モデル系となりうることを示唆している。

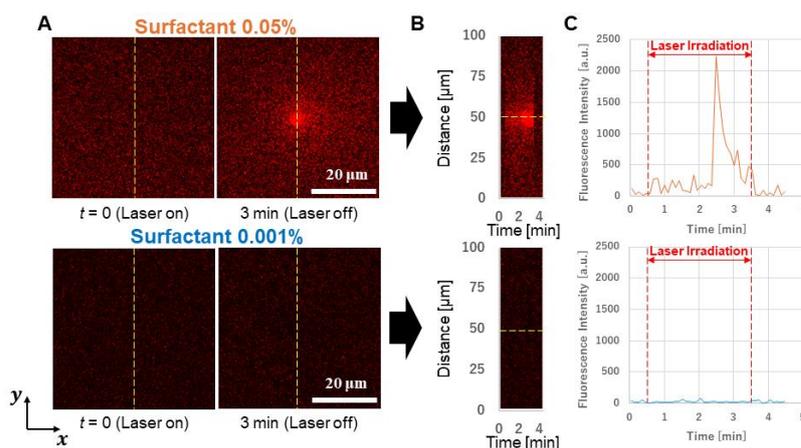


Fig. 1 (A) Dynamics of protein (mCherry) condensation with a focused laser beam. (B) Spatiotemporal maps created from line profiles of (A). (C) Time course of fluorescence intensity of mCherry at the laser focus according to the yellow dashed line in (B).

Ref: (1) S. Matsumoto et al., The 61st Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Nagoya, Nov 2023, 2Pos 235 (2) Sugiyama et al., *Acc. Chem. Res.* 2012, 45, 11, 1946–1954.

ナノファイバーを形成する自己組織化ペプチドを用いた Dps タンパク質の結晶化

Crystallization of Dps protein using peptide forming nanofiber

明治大¹, CIC-nanoGUNE², Komie corp.³ ○奥田充宏^{1,2,3}, Gabriela Pretre³

Meiji Univ.¹, CIC-nanoGUNE.², Komie- Corp³, °Mitsuhiro Okuda^{1,2,3}, Gabriela Pretre³

E-mail: okuda.mitsuhiro@selforganization.pro

【研究背景】 自己組織化ペプチドは、その集合能と機能性材料と組み合わせることで機能性材料の集合体を形成することから、DDS やバイオセンサーなどへの応用が期待されている。この自己組織化ペプチドの集合能を利用し、タンパク質の結晶化が可能であると考えられた。

【研究目的】 様々な自己組織化ペプチドが開発されているが、その中でも数アミノ酸残基でβシート構造を基にナノファイバーを形成するペプチドに注目し、カゴ状タンパク質に自己組織化ペプチドを付加することでカゴ状タンパク質の結晶化を目指した。カゴ状タンパク質はフェリチンファミリーの中でもサイズが最も小さいとされる Dps タンパク質 (直径 9 nm) を選択し、Dps タンパク質の結晶化を試みた。Dps タンパク質の中心部にある空洞内 (直径 4.5 nm) に無機材料ナノ粒子を形成させることが可能で、Dps の結晶構造を利用した磁性体や半導体ナノ粒子の配列構造作製への展開が期待できる。

【実験方法】 遺伝子工学的に Dps タンパク質の N 末端に自己組織化ペプチドを結合させたプラスミドを設計し、大腸菌により発現、精製をおこなった。作製した自己組織化ペプチド-Dps タンパク質複合体は蒸気拡散法もしくはバッチ法により結晶化を試み、pH、塩濃度をパラメータとして最適化を行なった。また結晶化させた溶液の集合状態を透過型電子顕微鏡で確認した。

【実験結果と考察】 塩を加えない中性以下の溶液を光学顕微鏡で観察したところ、透過性の高い 100 μm サイズ以上の結晶様体を確認した。溶液を透過型電子顕微鏡で観察したところ Dps の配列構造を確認した (Figure 1)。自己組織化ペプチドを持たない天然の Dps タンパク質では同条件では結晶化しないことから、自己組織化ペプチド-Dps タンパク質複合体が規則正しく配列することで結晶様体を形成していると考えられる。以上より自己組織化ペプチドが Dps 間の相互作用を促すことで Dps の結晶様体を形成すると考えられる。今後、自己組織化ペプチド-Dps タンパク質の空洞内に無機物ナノ粒子を形成させ、同条件で結晶様体を作製することでナノ粒子の配列構造を作製する予定である。



Figure 1. TEM image of peptide-Dps crystals.

培養乳がん細胞から放出された単一エクソソームの蛍光顕微鏡観察 Fluorescence microscopy of single extracellular vesicles released from cultured breast cancer cells

関西学院大 院理工¹, 産総研 健康医工学² ◦(M2) 富上 眞¹, 名和靖矩¹, 重藤 元²,
山村 昌平², 田和 圭子¹

Graduate School of Science and Technology, Kwansei Gakuin Univ.¹, HMRI, AIST²,
◦Makoto Tokami¹, Yasunori Nawa¹, Hajime Shigeto², Shohei Yamamura², Keiko Tawa¹

E-mail: ktawa@kwansei.ac.jp

エクソソーム (Extracellular Vesicles: Evs) は mRNA や DNA、CD9 などの膜タンパク質を含む直径 100 nm 程の細胞外小胞体で、細胞間のコミュニケーションツールとして体液中に広く存在する。細胞から放出された Ev は、細胞の種類や環境によって組成が変化し、疾病診断や予測に利用できる。当研究室では、蛍光増強効果を持つプラズモニクチップを用いて、血清から分離された単一 Ev をサンドイッチイムノアッセイで捕捉し、蛍光顕微鏡下で輝点として観察・定量評価する方法を確立してきた。本研究では、シャーレに播種した乳がん細胞 MCF-7 をインキュベートし、確立したプラズモニクチップ上のイムノアッセイによって培養液中の Ev の定量評価を行った。

乳がん細胞は濃度 6.66×10^3 cells/ml で培養された MCF-7 をシャーレに播種し、CO₂ 下 37.5 度の恒温槽で 1 週間インキュベートした。プラズモニクチップは、ピッチ 480 nm で直径 20 mm の同心円構造 (Bull's eye) パターンがアレイ化したレプリカに、銀と SiO₂ 薄膜をそれぞれ膜厚 50 nm と 20 nm で成膜した。この表面に 3-Aminopropyltriethoxysilane、続いて NHS-PEG-NHS cross linker を修飾し、基板上に Anti CD63 抗体を結合させ捕捉界面を構成した。シャーレから採取した培養液をフィルター分離で細胞を取り除いた後、この界面に培養液を加えた。洗浄後に検出抗体として蛍光標識抗体 APC-Anti CD9 抗体を加え、アッセイを構築した。顕微鏡観察では、水銀ランプと EM-CCD カメラを搭載した正倒立蛍光顕微鏡を用い、透過法で蛍光輝点の観察を行った。正倒立両側に Cy5 フィルターユニットを、光照射 (励起) に 40× (倒立側)、発光検出に 100× (正立側) の対物レンズをそれぞれ用いた。

Fig.1(a)に Ev を含まない培地を加えた参照溶液の蛍光像を、(b), (c)に播種から 3 日後、6

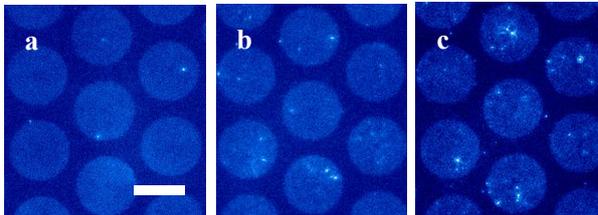


Fig.1 Fluorescence images measured (a) for control solution, (b) after 3-days cultivation of MCF-7, and (c) after 6 days. Bar corresponds to 20 μ m.

日後の培養液の蛍光像をそれぞれ示す。蛍光像中の輝点は半値幅解析を行うことで Ev への帰属を行った。細胞から放出された Ev として帰属される輝点数は、 2.2×10^3 μ m²あたり (パターン 7 個相当) 参照溶液で 0 個、3 日後で 6 個、6 日後で 14 個と評価できた。

謝辞: 光硬化性樹脂を提供くださいました東洋合成工業に感謝します。