The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Molecular Imaging with Surface-Enhanced Raman Scattering in a Cell
Author(s)	畔堂, 一樹
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59618
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　畔堂　一樹　）	
論文題名	**Molecular Imaging with Surface-Enhanced Raman Scattering in a Cell** （細胞内における表面増強ラマン散乱を用いた分子イメージング）

論文内容の要旨

Light scattering at a molecule contains the information on the molecular vibration in its spectrum. It has been used for detection and the analysis of species of molecules, structures and environments. This light scattering is called Raman scattering. Raman scattering analysis does not require the labeling of molecule, so that it is useful in particular for observing bio-molecules in living cells. For bio application, near infrared and visible lasers are used to make Raman scattering since Raman scattering is a weak optical phenomenon, so that it is difficult to observe biological activities in a short time. Hence, a method is developed to enhance the scattering efficiency by putting the biomolecules on the metal surface. This method is known as surface-enhanced Raman scattering (SERS), that has been intensively studied. Metal surface for SERS has fine surface structures in nanometer scale. Sharpened tips and nanoparticles also have been used for the nanoscopic observation of nanomaterials including carbon nanotubes and grapheme.

In this thesis, I present a method with use of SERS technology of dynamic imaging of molecules in a living cell. A metal nanoparticle is used as a molecular sensor based on SERS mechanism. The particle dynamically provides Raman spectrum of molecules near the particle. The nanoparticle can move freely or mandatorily inside a cell by the cellular function. The position of the particle is detected by a position-sensor (CCD), and the molecule and environment at the particle position is obtained as a Raman spectrum.

I have developed a three-dimensional nanoparticle tracking system combining with a confocal Raman microscope for realizing tracking a metal nanoparticle in a living cell with SERS measurement. The nanoparticle tracking system consists a dual-focus dark-field imaging system. Motion of the nanoparticle was captured by the tracking system and SERS was simultaneously detected with a feedback system to keep the beam focusing on the nanoparticle with 100 ms/frame. I have analyzed the SERS dataset statistically to find molecules strongly correlated the particle motion.

I have functionalized metallic nanoparticles to probe the change in pH that provides chemical conditions around the particles during the transportation process. p-mercaptobenzoic acid (pMBA) was adsorbed on surface of silver nanoparticle. pMBA changes its structure by protonation or deprotonation depending on the local pH. The structure change is detected by SERS. This pH change is measured temporally and locally at the particle through Raman spectrum measurement in nano-scale.

I also studied the mechanism of a motor protein, F1-ATPase with the metallic particle. F1-ATPase is a protein to synthesize an ATP with ADP and Pi with rotating like a motor. This rotation is step-by-step motion. This synthesis as a chemical reaction can be detected as the change in Raman spectrum. I have fixed a gold nanoparticle to the rotational unit of the F1-ATPase. The particle motion according to the rotation of F1-ATPase is detected with a dark-field microscope. A few-tens-nanometer step-wise motion measured in the dark-field microscope and Raman spectrum every a few hundreds seconds are simultaneously measured. This result indicates the possibility of single molecule detection with SERS.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（ 畔堂　一樹 ）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	河田　聡
	副 査	教授	民谷　栄一
	副 査	教授	Verma Prabhat
	副 査	教授	尾崎　幸洋（関西学院大学理工学部）

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、金属ナノ粒子とその近傍に形成される近接場光を用いた、ナノスケールでの 3 次元トラッキング及びラマン散乱顕微法の開発を試みた研究をまとめたものである。その成果は以下のとおりである。

金属ナノ粒子を細胞内 3 次元空間で追跡、撮像し、同時に金属ナノ粒子近傍の分子からのラマン散乱を検出する顕微鏡法を開発し、試料内部の分光情報や、細胞内輸送を高分解能で観察する手法を提案している。構築した顕微鏡システムに対して、精度評価を行い、ナノスケールの位置精度を実現している。

金属ナノ粒子を三次元空間で追跡することで、試料内部の分子のラマン散乱スペクトルを高い空間分解能で取得できることを示している。実際にナノ粒子を生きた細胞内部で追跡し、ラマン散乱を同時に取得している。これにより、提案する手法が様々な細胞内部の動態の非染色・分析観察に応用できることを示している。

金属ナノ粒子の 3 次元空間での追跡及び、ラマン散乱の検出によって得られた時間・空間・スペクトルデータに対して、網羅的に理解するための数学的手法が提案されている。金属ナノ粒子の挙動とスペクトルを合わせて多変量解析することによって、金属ナノ粒子の動きに関連した生体分子振動情報の抽出が可能であることを示唆している。

金属ナノ粒子表面を機能性分子で修飾し、細胞内部の環境を観察する手法が提案されている。機能化した金属ナノ粒子は pH に依存したラマンバンドの信号の増減を示している。実際に生きた細胞内部に機能化した金属ナノ粒子を導入し、高分解能での pH の検出に成功している。この結果は、従来法で困難であった細胞内部の局所領域における高分解能観察が、提案する手法により可能であることを示唆している。

以上のように、本学位論文では、金属ナノ粒子の 3 次元追跡とラマン散乱の組み合わせがナノスケールでの顕微観察法を発展させ、従来法では困難であった細胞内部での局所領域における生体分子の観察に利用できることを示している。提案する手法を実現する装置を実際に開発し、生きた細胞内部の生体分子や、局所空間の環境の観察に用いている。これらの結果は、応用物理学、特にナノフォトニクスの発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。