

補助事業番号 2024M-396

補助事業名 2024年度 高分解能”光学顕微鏡実現”に向けた蛍光蛋白質の探索
補助事業

補助事業者名 東京農工大学工学部化学物理工学科箕田研究室

1 研究の概要

本研究では、電子を利用した高分解能の電子線励起“光学顕微鏡”実現のために必要な電子線耐性の高い蛍光蛋白質の探索を行う。電子励起の発光像を利用することで、電子の短い波長を利用した高解像度を利用し、部位の光検出による特定を可能にする“光学顕微鏡”の機能を両立した顕微鏡法であり、電子顕微鏡像取得時に”光学顕微鏡像”の同時取得が可能であり、倍率ギャップは存在しない。しかし、電子線照射は生物試料のダメージを与えやすいので、電子励起の”光学顕微鏡”実現のためには電子照射による試料損傷が少ない蛍光タンパク質の利用が必須となる。そこで、本研究では、既存の装置を利用した電子励起発光検出システムを構築し、高分解能“光学顕微鏡”に応用可能な高い電子線耐性を持つ蛍光タンパク質を探索する。

2 研究の目的と背景

生命科学の基礎研究において、生物分子の構造と機能の相関を調べることは重要で、そのために、光・電子相関顕微鏡法(CLEM)という方法の利用が広がっている。興味ある部位に蛍光タンパク質を遺伝子発現させて蛍光像からその部位を特定し、その部位の高分解能の構造調査には電子顕微鏡を利用する。しかし、2つの顕微鏡を使うことによる手間と、2つの顕微鏡の倍率ギャップの大きさがより、この方法の広がりが阻害されている。そこで、その2つの顕微鏡の機能を併せ持つ顕微鏡として電子線励起発光(CL)を利用したCL顕微鏡を使った生命科学用の顕微鏡法の実現を目指すため、それに用いることができる高い電子線耐性の蛍光蛋白質の探索を目的として研究を行う。

3 研究内容

(1) 増強緑色蛍光蛋白質の電子線損傷の環境依存性の評価

(URL:<https://web.tuat.ac.jp/~minoda-lab/index.html>)

(現在論文投稿中)

ライフサイエンスの研究に最も古くから用いられている緑色蛍光蛋白質(GFP)のなかで、強い蛍光強度が得られるように遺伝子操作を行って開発された増強緑色蛍光蛋白質(EGFP)に比べての電子線損傷に対する耐性が高いと予想されるmAzamiGreen(mAG)について、室温乾燥環境、室温液中環境の2つの環境における電子線照射損傷に対する体制を調べた。

実験は、下記の図1のシステムによって実施した。使用した装置は、市販の透過電子顕微鏡に光学顕微鏡像や発光スペクトルを取得することできるように改造している。蛍光蛋白質の励起光源としては波長450nmのレーザーを使用している。

図2からわかるように、発光スペクトルは電子線照射量が増えると徐々に強度が減衰すると同時に発光ピークの波長が長波長側に移動する。これは、電子線照射損傷によって蛍光を発する部位である発色団の構造が変化することによる。そこで、解析により電子線照射前のスペクトル成分を取り出してその成分のみで強度がどのように変化するかを強度減衰時に一般的に使用されている減衰関数の式を使って近似して、その式に使用しているパラメータ変化から、電子線に対する耐性を示す特性ドーズを求めた。実験データとパラメータを求めるために使用した近似曲線の例を図3に示す。

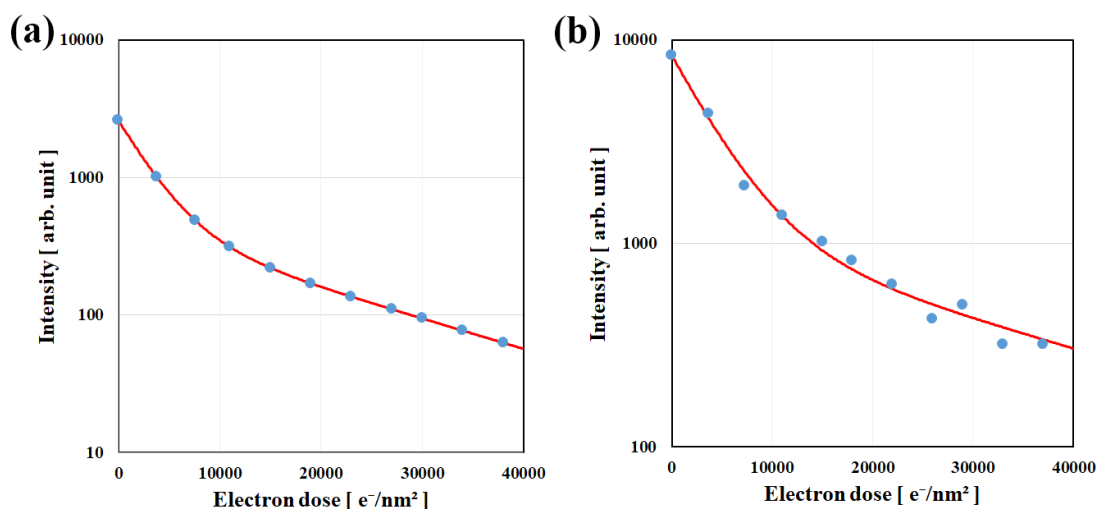


図3 (a) 乾燥環境と (b) 湿潤環境における電子線ドーズ量の関数としての 初期蛍光成分からの発光強度の変化を示すグラフの例。(b)の湿潤環境で、強度減衰が遅く、水があることで電子線耐性が高いことが分かる。

乾燥環境と液中湿潤環境でのグラフを比較すると、図3(b)の液中環境での強度減衰が緩やかであることが見て取れる。これは、液中環境の方が、電子線耐性が高いことを示している。

詳細な解析から、強度減衰は、速い減衰と遅い減衰の2種類の経路での減衰があり、速い減衰は、電子線照射による直接破壊による消光であり、遅い減衰は、長波長側に発光ピークがある成分への変化による強度減衰であることが分かった。遅い減衰の特性ドーズ量は平均値で、乾燥環境中では24000 electrons/nm²、液中環境下では67000 electrons/nm²と求めた。この蛍光蛋白質は、この研究で目標としていた10000 electrons/nm²、以上の電子線耐性を持つ蛍光蛋白質を探索するという目標値を上回る耐性を有しており、当初の目的を達成することができた。

(2) 電子線耐性の高い蛍光蛋白質の探索

(URL: <https://web.tuat.ac.jp/~minoda-lab/index.html>)

4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

光電子相関顕微鏡システムに今回探索された蛍光蛋白質mAGを実際の生命科学分野の研究に利用できるようにするために、光検出システムを備えた走査型の電子顕微鏡を開発し、応用研究を進めていけば、生命科学に関わる高スループットの新しい構造評価システムが実現すると期待できる。その結果、生命科学に関わる基礎研究の発展や、新しい診断装置の実現につながると期待できる。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

生命科学でも応用可能な新しい顕微鏡法の実現を目指して研究を進めてきたが、その中で今回の研究により、新しい光・電子相関顕微鏡法の実現に1歩近づいた。今後、この成果をいかして、新しい計測装置実現につなげていきたい。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

本事業における比較対象とする増強蛍光蛋白質による論文成果

“Effect of the surrounding environment on electron beam irradiation damage of enhanced green fluorescent protein”

Haruyoshi Osakabe, Mihiro Suzuki, Toshiki Shimizu, Hiroki Minoda

Ultramicroscopy 268 (2025) 114082

(URL: <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2024.114082>)

7 補助事業に係る成果物

(1)補助事業により作成したもの

該当なし

(2)(1)以外で当事業において作成したもの

該当なし

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名: 東京農工大学大学・工学部(トウキョウノウコウダイガク・コウガクブ)

住 所: 〒183-8588(半角)

東京都小金井市中町2-24-16

担 当 者: 教授 箕田 弘喜(ミノダ ヒロキ)

担 当 部 署: 化学物理工学科・箕田研究室(カガクブツリコウカクカ・ミノダケンキュウシツ)

E - m a i l: hminoda@cc.tuat.ac.jp

U R L: <https://web.tuat.ac.jp/~minoda-lab/index.html>