

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13548

研究課題名(和文)生物試料用カソードルミネッセンス顕微鏡法の開発

研究課題名(英文)development of cathodoluminescence microscopy for bio-materials

研究代表者

箕田 弘喜 (Minoda, Hiroki)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20240757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：電子顕微鏡を用いて、光の回折限界を超える高分解能な”光学顕微鏡”開発の可能性を探る。これを生物試料観察に利用するために、蛍光タンパク質であるGFPの電子線励起の発光特性について調べた。その結果、試料まわりにグリセロールが無いと、試料からの蛍光は直ちに退色する。さらに退色した後ではカソードルミネッセンスによる発光も生じない、このことから試料周りの環境条件としてグリセロールとの共存は非常に重要な要素である。また、カソードルミネッセンス顕微鏡の光学系を検討し、発光顕微鏡の制御システムを既存の電子顕微鏡に組み込むことに成功した。

研究成果の概要(英文)：In the present project, the possibility of super high resolution optical microscopy is investigated. Focused electron beam is illuminated onto the enhanced green fluorescent proteins (EGFP) and the electron induced light emission (cathodoluminescence; CL) is detected to form "optical microscope". The factors that affects the stability of the light emission from the EGFP were investigated. The stability does not depend on Ph of the sample solution. When glycerol is included in addition to the EGFP, the EGFP keeps to emit light, however, it is quenching without the glycerol. This clearly shows that the glycerol has an important role to stabilize the GFP. An optical system to create CL images was constructed and the CL images of the fluorescent diamond could be obtained. However, the detection efficiency of the light is not high enough and more efficient light detector is necessary.

研究分野：電子顕微鏡学

キーワード：カソードルミネッセンス 走査電子顕微鏡 発光 GFP

## 1. 研究開始当初の背景

**近年、生物試料の機能と構造の相関を調べる相関顕微鏡法の利用が広がりを見せている。**相関顕微鏡法とは、生物試料の特定部位が蛍光発光する試料について、FLMにより興味のあるターゲット部位を特定し、そこをTEMにより高分解能観察して、生物試料の機能と構造の相関を調べる顕微鏡法である。しかし、FLMの分解能は1 $\mu$ m程度であり、nm以下の分解能を有するTEMとの間には分解能に大きな違いがあるため、ターゲット部位のサイズがマイクロメートル以下の場合、現状の装置での相関計測は難しい。一方、我々は、GFPを用いてタンパク質の電子線ダメージを調べていたところ、GFPが電子線照射によりCL発光を生じることを最近見出した。タンパク質であるGFPは、電子線照射により壊れて発光強度は減衰すると予想されるが、CLは安定に生じるという予想外の事実を発見した。**このGFPによるCL現象を利用して、CL顕微鏡を利用すれば、蛍光顕微鏡より分解能の高い“光学”顕微鏡が実現し、より高分解能でターゲット部位の同定が可能となると考え、本研究を着想するに至った。そこで、以下の研究を進める。**

GFPを用いた生物試料用CL顕微鏡開発を目指す。具体的には、(1)GFPに対する電子線照射によるCL発光の安定性とその試料周りの環境依存性を調べ、CL強度が安定に得られる環境条件を探る。生物試料は、急速凍結し低温環境下での観察が行われることが多いが、近年、低温条件よりも液中条件の方が電子線に対する試料ダメージは小さいとの報告もある。試料周りの環境条件とCL強度やその安定性について検討する。(2)電子線走査によるCL顕微鏡の結像条件の探索を行う。SEM-CL装置は半導体試料などに利用されているが、SEMのような強い電子線照射条件では、プローブ径が小さすぎ、電

子線密度が高すぎるので試料の破壊が予想される。生物用CL顕微鏡に求められるのは10nm程度の分解能なので、10nm径のプローブで、電子線照射密度を下げ、破壊を避けつつ、十分なCL強度が得られる光学条件の検討が必要である。

本研究の成果により、汎用性の高い相関顕微鏡計測が可能になる。SEM-CL法は無機材料の光物性研究にすでに利用されている。本研究ではこれを生物試料に適用し、相関顕微鏡法に応用しようとするものである。TEMとFLMの組み合わせによる相関顕微鏡法はすでに確立した手法であるといえるが、これにCL顕微鏡を組み合わせることに特色がある。従来の相関顕微鏡法では、2つの顕微鏡の分解能に大きな開きがあり、100nm以下の試料に対しての応用が難しい。CL顕微鏡との組み合わせで、単一分子のような100nm以下のターゲットが、細胞中のどこにどのように分布しているのかといった高分解能での相関計測が容易に可能となる。

## 2. 研究の目的

同一視野の透過電子顕微鏡(TEM)像と蛍光顕微鏡(FLM)像が同時に観察できる電子・光子ハイブリッド顕微鏡を近年開発した。この装置を用いて、蛍光タンパク質(Green fluorescent Protein: GFP)への電子線照射によりカソードルミネッセンス(CL)発光が生じることを見出した。この現象を利用すれば、FLM像とTEM像に加え、同一視野のCL像を利用した相関電子顕微鏡法の可能性がある。そこで、**本研究ではCLを利用した生物試料用の“光学”顕微鏡の開発の可能性を探り、FLMとTEMにCL顕微鏡を加え、3つの方法による相関顕微鏡法の可能性を拓く。**

## 3. 研究の方法

**電子顕微鏡と蛍光顕微鏡の間を結ぶ CL 顕微鏡の実現のために、以下の2つのテーマを推進する。**

**(1) GFP の電子線照射時の安定性向上のための適切な試料周りの環境条件を調べる。**

具体的には、試料溶液の pH や溶液状態のままか、急速凍結状態かといったいくつかの試料環境と CL 強度との関係を調べ、**安定に高強度の CL を実現する試料環境制御条件を探索する。**

**(2) 生物試料用 CL 顕微鏡の光学条件の検討を行う。**

本研究において、生物試料用 CL 顕微鏡に要求される分解能としては、10nm 程度で十分である。**そこで、10nm の電子プローブ径に対し、十分に CL 強度が得られるような、電子線強度を実現する光学系を構築する。**

#### 4. 研究成果

上記研究テーマの(1)と(2)についてそれぞれ得られた成果についてまとめる。

(1) GFP の電子線照射時の安定性を調べるために、電子線照射時の強度変化、およびスペクトル変化を調べた。その結果、通常の電子顕微鏡観察程度の賞さ電子密度であれば、CL 強度は、電子線照射によって大きく強度変化、あるいはスペクトル変化がないことが分かった。これは、pH を 7 から 9 程度の範囲で変えてもそれほど大きな違いはない。しかしながら、試料にグリセロールを加えておくことは、実験の範囲内では必須であり、グリセロールを加えない場合、試料からの発光は、電子線照射により直ちに退色してしまうことが分かった。これはグリセロールの電子線破壊効果によるものであると考えられる。電子線照射により試料、あるいは試料の周りの指示膜等から 2 次電子が照射される。これにより、試料周りは電子欠乏の状態になりやすい。実際、電子線照射前後の蛍光スペクトルの変

化から、GFP は酸化によって生じるスペクトルの赤化と同様な変化をしてみていることから、この傾向が示唆される。

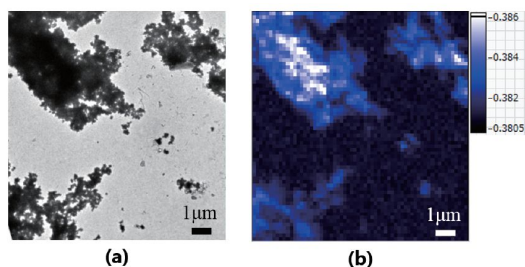
酸化は、酸化数の増加(電子の欠乏)が進むと考えることが出来る。この程度が強くなると、発光しにくくなって、退色すると解釈出来る。従って、CL 発光を安定に得るためには、電子供給体を試料周りに多く配置して、電子線照射による 2 次電子発生による試料からの電子欠乏を抑制することが効果的であると予想できる。

電子線照射による試料の破壊の原因として、イオン化等の電子構造へ影響によるものと、エネルギー注入による加熱による破壊の 2 つが主に考えられる。試料溶液の量が極めて少量であることから、試料周りへのグリセロールの存在が、EGFP の熱的破壊の影響を抑制しているとは考えにくいことから、電子線照射による試料の破壊、あるいは退色の原因は、電子構造の破壊と考えられる。スペクトル変化と併せて考えると、グリセロールは、電子の欠乏を抑制して試料破壊を防いでいると予想される。

安定な蛍光発光や CL 発光を実現するためには、今後、試料周りの環境として電子ドナーや電子アクセプターとしての役割を担いうる分子等を試料周りに配置して、スペクトルの変化や退色時間等について調べていく必要があるとの結論に達した。また、試料の安定性として、試料へ照射する電子のエネルギーについても検討する必要がある。

(2) CL 顕微鏡の光学系、および制御系を開発した。モデルサンプルである蛍光ダイヤモンドで取得した CL 像(b)とそれに対応する電子顕微鏡像(a)を次ページに示す。図の(a)と(b)の視野は等しい。(a)の電顕像でより暗く見える領域は、試料が厚いため、(b)の CL 像では明るく見える傾向がある。いずれにせよ、発光性の試料が存在する領域からは CL 発光が見えていて、発光像が形成されているこ

とから、CL 発光像を得るシステムを構築することが出来たと言える。



具体的な開発内容としては、集束した電子の試料上での集束位置を外部制御により2次元ラスタ走査が可能になるようにシステムを構築し、集束位置からの発光強度を CCD カメラによって検出し、各プローブ位置からの発光強度を2次元の像として構築するためのシステムである。電子プローブの位置制御は、電子顕微鏡本体の制御系を利用してする必要があったことから最短で、20  $\mu$ s の時間分解能でのプローブ制御しかできなかったが、システム開発には成功した。

残念ながら、我々の装置では得られたプローブ径は半値全幅にして約 50nm 程度であり、目標としていた 10nm には達しなかった。

我々の使用した装置は、電子・光の相関計測を可能にするため、電子顕微鏡に光照射、および蛍光検出のための光学系を組み込むために、市販の装置から対物レンズを交換しており、磁極ギャップの大きなものを使用している。これが原因で、試料周りの対物レンズが作る磁場が弱く、電子集束力が弱いので、ある程度想定されてはいたが、予想以上に集束力が弱かった。もう1段階電子ビームを集束させるための光学系を検討する必要がある。しかしながら、現状では、これ以上電子ビームを集束させても CL 顕微鏡としての性能向上にはつながらないということが明らかになった。

電子ビームを集束すると、電子流量が減少してしまうが、これにより、CL 発光強度が弱くなってしまいうため、CL 像を得るのに必要な電子量が不足してしまうという問題による。

これについては、光検出する CCD カメラをより高感度なものに更新する必要があることが分かり、これは今後の課題として残った。

現状では光検出感度に影響して得られる CL 像の分解能も制約を受けている。すなわち、発光強度をある程度確保する必要があることから、現実の像を取得するためには電子のプローブ径 100nm 程度で使用する必要があり、現在のところ、分解能 100nm 程度にとどまっている。しかし、この値は、結像に使用している光の波長約 500nm 程度に比べて、細かいところまで見えていることから、回折限界を超える“光学”顕微鏡を実現することに成功した。今後、光検出感度を上げることで、既存の電子顕微鏡の電子集束能でも 50nm 程度までの分解能の実現は期待できる。更なる高解像度化のためには、より電子線集束度を上げることが出来る電子レンズへの組み換えが必要になる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

K. Nagayama, T. Onuma, R. Ueno, K. Tamehiro and H. Minoda, (2016) Cathodoluminescence and Electron induced Fluorescence Enhancement of EGFP, J. Phys. Chem. B 120, 1169-1174. (査読有)

DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b08138

現在 2 報目の論文を準備中

[学会発表](計 3 件)

1) 電子・光子ハイブリッド顕微鏡を用いた GFP の発光スペクトルの環境依存性の研究  
為廣克起, 秋葉圭一郎, 箕田弘喜  
2016.9.19 日本物理学会 2016 秋季大会  
(於: 金沢大学, 角間キャンパス,

〒920-1192 石川県金沢市角間町)

2) 高分解能“光学顕微鏡”実現に向けた CL  
マッピングシステムの開発

関川大貴, 秋葉圭一郎, 箕田弘喜

2016.9.19 日本物理学会 2016 秋季大会

(於: 金沢大学, 角間キャンパス,

〒920-1192 石川県金沢市角間町)

3) 分光器付き電子・光子ハイブリッド顕微鏡  
による GFP の発光現象の研究

為廣克起, 関川大貴, 上野竜佑, 箕田弘喜

2016.3.16 日本物理学会第 71 回年次大会

(於: 東北学院大学, 泉キャンパス,

〒981-3193 仙台市泉区天神沢二丁目 1-1)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

箕田 弘喜 (MINODA Hiroki)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号: 20240757

### (2) 研究分担者      なし