

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月7日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19516

研究課題名(和文)低エネルギー電子誘起"光学顕微鏡"の開発へ向けて

研究課題名(英文)Toward the development of "light microscope" induced by electron excitation

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：緑色蛍光タンパク質(GFP)を用いた低速電子線励起によって生じるカソードルミネッセンス発光を利用した"光学顕微鏡"の開発を目指してカソードルミネッセンスの電子線照射による影響を調べた。タンパク質は電子線損傷しやすく、電子の照射により容易に破壊されやすいと考えられているが、本実験でテスト試料として用いたeGFPは、分子の中では電子線による破壊に比較的強いとされているルブレンに比べて1桁以上壊れにくいという結果が得られた。また、破壊のし易さは、試料周りの環境によって大きく依存することも分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般に、タンパク質は電子線損傷しやすく、電子の照射により容易に破壊されやすいと考えられているが、本実験でテスト試料として用いたeGFPが、分子の中では電子線による破壊に比較的強いとされているルブレンに比べて1桁以上壊れにくいという結果が得られた。また、破壊のし易さは、試料周りの環境によって大きく依存することも分かった。以上のことから、本研究により電子線誘起の光学顕微鏡開発の可能性がさらに高まったと言える。この装置の実現は、従来より格段に高い空間分解能での生命現象観察・研究の道を拓く意味で、今後のこの分野の発展を大きく前進させたと言える。

研究成果の概要(英文)：In this research project, the possibility to develop low energy electron illumination induced light microscopy was examined. It is well known that Green fluorescent protein is widely used in the life science. We found that the enhanced GFP (eGFP) can emit cathodoluminescence (CL) by electron irradiation. Wavelength of the electron wave is much shorter than that of the light wave and it would permit the possibility to develop a "light microscope" induced by electron irradiation. This should have higher spatial resolution than conventional light microscopes. To realize high resolution "light microscope" using light emission from eGFP CL, we investigate electron damage of the eGFP. The proteins are considered to be electron sensitive, but eGFP is more than ten times stronger for electron irradiation than Rubrene which is considered to have high resistance against the electron irradiation. We also found that the electron resistance of the eGFP depends on the neighboring environment.

研究分野：ナノサイエンス

キーワード：eGFP カソードルミネッセンス 電子線誘起光学顕微鏡 光学顕微鏡

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

応募者は、透過電子顕微鏡に光学顕微鏡のユニットを組み込んで、同一視野の電子顕微鏡像と蛍光顕微鏡像の同時取得が可能な電子・光子ハイブリッド顕微鏡を開発し、この装置を用いた研究の中で、緑色の蛍光を発するタンパク質である eGFP からの電子励起発光、すなわちカソードルミネッセンス(CL)発光を見出した。さらに、eGFP を電子顕微鏡内で溶液中に保持した状態と乾燥状態の比較や、溶液の pH を変えて eGFP の試料周りの pH による強度やスペクトル形状を調べ、スペクトル形状は pH によりわずかに変化するが、発光強度は電子線照射に対して非常に安定で、照射を続けてもその強度はほとんど変化しないことから、この現象を利用することで、高分解能の“光学顕微鏡”実現の可能性を感じた。

蛍光と CL 発光は内殻電子の励起源が異なるだけで、励起電子の緩和による発光という点では等しいが、我々の実験で使用している電子のエネルギーは 80~200keV と非常に高エネルギーであり、蛍光(FL)発光の励起光のエネルギーに比べてはるかに高い。この励起エネルギーの違いが、電子照射時の試料破壊の原因と考えれば、低エネルギー電子線を励起源として使用すれば、低損傷、あるいは無損傷と言える CL 顕微鏡の可能性があると考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

高分解能で生物試料の構造評価が可能な電子顕微鏡法と、細胞内の特定の部位に蛍光標識して、細胞内の機能発現を明らかにする蛍光顕微鏡を組み合わせて、試料の機能と構造の相関を調べるための方法である相関光・電子顕微鏡法(CLEM)が重要性を増しているが、構造と機能の相関をより詳細に調べるためには、静態観察だけでなく機能発現の際にリアルタイムで高い分解能での構造解析をすることが望まれる。高分解能の構造評価が可能な電子顕微鏡法では、電子線照射による試料破壊が大きな課題であり、したがって、この方法を動態観察に利用することは難しい。一方、蛍光顕微鏡観察では試料破壊は生じないため、動態観察に利用できるが、ナノメートルスケールの分解能での詳細構造の評価は不可能である。そこで、高分解能の“光学顕微鏡”実現の可能性を探索するのが本研究課題の目的である。

3. 研究の方法

本研究では、低エネルギー電子を使用した電子線励起“光学顕微鏡”開発の可能性を探る。そのために、主に以下の2つの項目について研究・開発を進めた。

(1) 電子のエネルギーを変えて、試料ダメージとの関係を調べる。

(2) 既存の装置を使用した低エネルギー電子線照射の機構を構築する。

まずは、透過電子顕微鏡を利用した電子線照射損傷の加速電圧依存性を調べる。透過電子顕微鏡で可能な電子の最低エネルギーは 20keV であることから、反射電子線回折(RHEED)装置を利用しての実験も行う。RHEED では、3keV から 1keV の低エネルギー電子照射励起の発光計測を目指す。そのため RHEED 装置を改造して上記(2)の機構を構築し、低エネルギー電子誘起の CL 発光検出を実現する。更に、電子線励起発光(CL)が検出できるように光検出のシステムを設置する。光検出や分光は、差動距離の長い光学系を持つ既存のシステムを移設して使用することで、RHEED システムに取り付け可能である。

以上の装置改造により、20keV 以下の低エネルギー電子照射での CL 強度検出、および分光計測とその時間(電子ドーズ量)依存性の調査が可能になる。入射電子のエネルギーを変えて、電子ドーズに対する発光強度変化やスペクトル変化の時定数を調べ、寿命を調べることで、非破壊計測に耐えうるエネルギー領域が評価して、蛍光タンパク質に対する低エネルギー電子照射による CL 顕微鏡の可能性を検討する。

4. 研究成果

本研究を進めるにあたり、電子線照射によって蛍光タンパク質(FP)に何が起きるのかについて、基礎的な知見を得るための研究を行った。本研究では、FPとして蛍光強度が増強するように緑色蛍光タンパク質(GFP)を改変したeGFPを試料として用いた。本研究は、我々が、eGFPからのカソードルミネッセンス(CL)発光を見出したことを受けて構想されたのであることから、最初にCL発光を見出した環境である乾燥(dry)状態を基準として研究を始めた。

まず、グリセロールと混ぜてある試料と混ぜてない試料を乾燥状態にした2つの場合で電子線照射による蛍光スペクトルを比較した。蛍光スペクトルは、電子線照射により変化し、元々あった520nm付近のピークが減少し、585nm付近にピークが現れた。これは電子照射をすることで520nmの発光をする型の光特性が変化した結果、585nmの発光を示す型が出来たことによると考えられる。eGFPではこの波長領域にピークが現れる発光種は今まで報告されていないことから、我々は、この波長領域にピークを与えるeGFPを新しい型のタンパク質であると考え、これをCL^{bright}型と呼ぶことにする。光変換による蛍光ピークは612nmと報告されたため、CL^{bright}型の発光種は、光変換型発色団とは異なる光特性を示す発色団であると考えられる。電子線照射によって引き起こされるeGFPの発光特性の変化は、光変換に対応して電子線誘起変換と呼ぶべきものであると言える。今回計測できた500nmから1000nmの波長領域の積分発光強度の電子線照射量依存性を調べたところ、変化の様子は複雑ではあるが、概ね、積分強度は1度増加し、その後強度が減衰する傾向を示す例が多かった。最終的な発光強度の減少は、高速電子の照射により破壊が起きたことによるものと解釈できるが、我々は、破壊が顕著に確認される前の増強過程に注目し、蛍光強度が最も増強した時点における増強率の値を、試料周りの環境との依存性に対して調べることにした。また、試料条件によっては、増強を示さずに発光強度が落ちた例もあるが、その場合は、最小単位の電子線を照射した直後の強度の変化率を上増強率の代わりに比較の数値として求めた。eGFP周囲にグリセロールが存在しないときに得られた“増強率”は460-480nmの波長で励起した場合にはグリセロールがある場合より大きな値であったのに対し、380-420nm励起は、グリセロールがあった場合より小さな値が得られた。また、どちらの環境でも460-480nm励起よりも380-420nm励起の蛍光増強率が大きかった。

蛍光強度は、吸収強度と比例していると考えることが出来る。したがって、電子照射で出来た型の吸収強度は380-420nmの領域に存在している可能性がある。また、短波長領域で励起してから別の発色団の型に変化した後、緩和して585nmピークの発光を示すという可能性も考えられる。ストークスシフトが元の発色団の型と同程度であるならば、発光極大の波長が長波長シフトしたとき吸収極大の波長も長波長シフトするはずである。実際、510-565nm励起によって変換後の蛍光が観測され、実際に長波長シフトしている可能性が高いことがわかった。(データは示さない。)このことから、更に新しい発色団のCL^{dark}型を考える必要がある。この型は短波長領域(380-420nm付近)での吸収に割り当てること、実験結果を説明することが出来ると考えられる。先行研究によると、eGFPが光変換すると488nmで励起できなくなった。一方で561nmで励起できたことから、赤発色団の吸収は緑発色団よりも長波長シフトしていると考えられる。電子線誘起変換によって生成されたCL^{bright}型も蛍光スペクトルが長波長シフトしたことから、吸収も長波長シフトし460-480nmで励起できなくなった可能性がある。以上のことを踏まえたエネルギーダイヤグラムを提案した。

次に、試料周りに水がある場合とない場合についての発光について検討を行った。水がない場合と同様に、初期の蛍光には520nm付近にピークが存在し、電子照射をすることで520nmのピーク強度が減少し、585nmのピークが現れた。また、電子照射後の蛍光強度比は同様に460-480nm励起よりも380-420nmの方が大きいという結果になり、電子照射後の蛍光強度の回復について、eGFP周囲に水が存在しない場合よりも存在する場合の方が大きく回復する結果となった。

このように、eGFPの電子線照射による影響は、試料周りの環境に大きく影響することが明らかとなった。ここでは、変化が比較的明瞭であることから、試料状態のモニターとして、CLではなく、蛍光発光の結果を示したが、蛍光スペクトルの変化は、発光領域中に含まれる発光種の割合の変化と考えることができ、CLスペクトルについても同様な影響を受けると考えられることから、電子線励起の発光顕微鏡開発にあたり、試料環境、および試料状態の確認は非常に重要な要素であることが確認できた。

上記の結果は、試料に対して加速電圧200kVの高速電子を照射した場合の変化であるが、照射電子のエネルギーを変化させた場合、変化の速さや電子線照射時の発光強度が変化することを除けば、定性的には同様なことが起きる。そこで、本研究の主要な研究項目の1つである、低速電子を試料に照射した場合の蛍光やCL発光の変化について、加速電圧200kVの場合との比較実験を行った。まずは、既存の透過電子顕微鏡で実現できる最低の加速電圧である20kVにおける結果について議論する。

図1は、電子線照射時のCL強度、およびスペクトル変化の様子を表した例である。左側のスペクトルはオレンジが電子線照射直後のスペクトルで、黄色は電子をしばらく照射した場合のスペクトルである。また、右側は、同一視野に電子を照射した場合のCL像で、丸く見える明るい領域は、電子を照射してCL発光している領域の様子を示した像で、しばらく電子を照射すると、発光強度が下がる様子を示している例である。発光像を観察する場合、分光器に入っていた光の光路を切り替えて、CCDカメラで記録するシステムなので、スペクトルに見られる500nmから1000nmの波長領域の積分強度を見ていることになる。CL発光強度は、減衰していく例が多かったため、定量的な解析を行った。

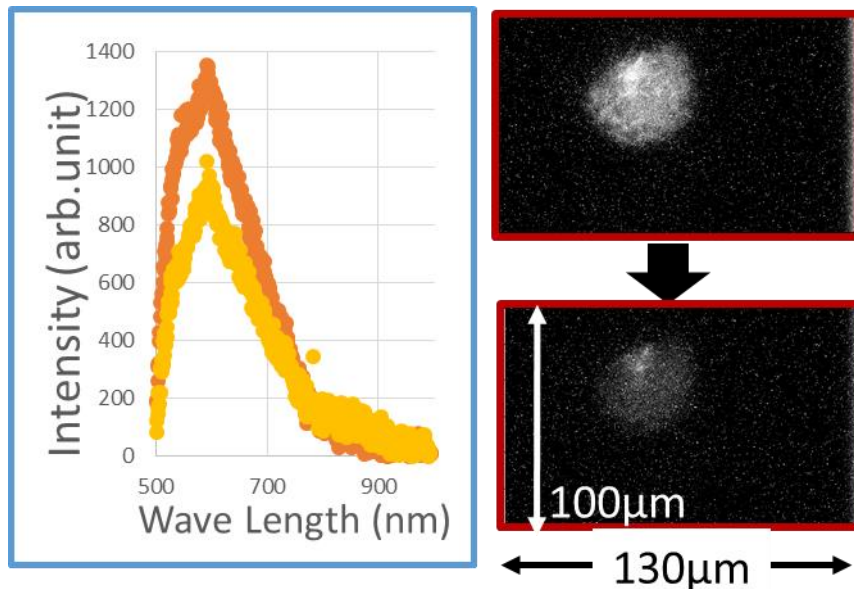


図1 低速電子照射時のCL発光スペクトルの強度、およびスペクトル変化

当初、強度減衰する場合、電子の照射量に対して指数関数的に減衰すると予想して、解析を試みたが、片対数グラフで直線状に減衰する場合と、減衰の際に折れ曲がりが見られる場合があった。そこで、折れ曲がりがある場合については、2種類の減衰曲線の和として解析を行った。

1種類の減衰曲線の場合は、 $y=A\exp[-(x-x_0)/q]$ でフィッティングしており、2種類の減衰曲線の和としてフィットする場合には、 $y=A_1\exp[-(x-x_0)/q_1]+y=A_2\exp[-(x-x_0)/q_2]$ でフィッティングしている。ここで、 x_0 は減衰の始まるDose量、 q 、 q_1 、 q_2 は特性Dose量、 A 、 A_1 、 A_2 は、それぞれの特性Dose量に対応する初期値である。赤の実験曲線と青のフィッティング曲線は、いずれのケースもほとんど重なっており、それぞれの関数で、良くフィットできていることが分かる。

このフィッティングから得られた特性Dose量から損傷断面積($\text{cm}^2 \times 10^{-18}$)を、 $10 \text{ e}/(\text{s} \cdot \text{nm}^2)$ 近傍の電子線照射密度の条件においてしらべた。その結果、 q と q_1 から求めた損傷断面積はほぼ同じ値であったのに対し、 q_2 から得られた損傷断面積は前者2つの場合より1桁程度大きな値となった。このことから、 q と q_1 は同一の損傷機構に対応する特性Doseが得られたものであると考えられる。すなわち、eGFPの電子線照射による退色機構は、一般に2つあり、減衰過程が1つの減衰曲線でしかフィットできなかった例は、速い損傷過程が何らかの理由で、起きなかった、あるいは観測できなかったことを示唆している。折れ曲がりが見られた場合でも比較的グラフの初期の段階に見られている。同様の強度変化の解析は、図1の左に示すようなスペクトル変化の計測結果を利用してグラフを作成して行った場合と、図1の右にあるCL像の強度変化の結果を利用してグラフを作成して行った場合があるが、計測器の計測感度の関係で、スペクトルを得るためには一定程度の露光時間(計測時間)を必要とするため、スペクトル変化の計測結果を利用してグラフを作成する場合は、高い時間分解能で計測を行うことが難しかったため、初期の段階での折れ曲がりを見出すことが難しいケースも多かった。つまり、1つの減衰曲線でしかフィットできなかった場合があるのは、試料による破壊過程のばらつきがある可能性のほか、計測方法の時間分解能の低さが原因である場合もあったものと推察される。また、2種類の損傷機構がどのような機構であるかは、現在のところ明らかになっていないが、単粒子解析による構造解析によって、今後明らかにしていく予定である。

今回の実験による解析によって得られた減衰断面積の値を、分子として比較的電子線耐性の高いと言われるルブレンについての20keVのエネルギーの電子を照射したときに得られた損傷断面積の値と比較すると、1桁から2桁程小さく、電子線照射に対して高い耐性を持っていることが分かった。高い耐性を持つ理由は今後検討の必要があるが、eGFPの発色団分子は β バレル構造の中にあることから、 β バレル構造によって発色団分子が囲まれていることが、電子に対する強い耐性の原因の1つである可能性がある。

上記の損傷断面積の結果は、加速電圧20kVの場合の値であり、透過電子顕微鏡を用いて、実現できる最低の加速電圧であるが、比較のために透過電子顕微鏡で通常利用している200kVでも同様な実験・解析を行ったところ、加速電圧が高い場合にも定性的には同じような結果が得られた。すなわち、CL強度は電子線照射を続けると減衰する場合があり、減衰する場合の減衰曲線を200kVの場合同じ関数でフィッティングする場合、1つの曲線で良くフィッティングできる場合と、2つの減衰曲線の和でフィッティングしたほうがより良い場合があり、1つの曲線でフィッティングした場合に得られる結果は、2つの曲線において大きな特性Doseに対応する値と比較

的に近い値を得た。200kVで得られた2種類の損傷断面積の値は、加速電圧20kVと比べると、大きな損傷断面積の値はより大きく、小さな損傷断面積の値はより小さな値となった。

先行研究で報告されている、損傷機構の加速電圧依存性についての議論を参考に考察すると、高い加速電圧で加速された電子を利用した場合により壊れやすいのは、電子の衝突過程によって運動量を与えられることによる破壊、すなわちノックオンと呼ばれる過程による破壊であり、加速電圧が低い電子を利用した場合により壊れやすいのは、イオン化や熱的な破壊など、電子から化学的なエネルギーを与えられることによっておこる破壊であると考えられることから、2つの損傷断面積のうち、大きな損傷断面積を与える破壊機構はノックオン、あるいはそれに関連した現象による破壊過程であり、小さな損傷断面積を与える破壊機構は、イオン化や熱的な破壊に関連したものであると考えられる。

上記の議論の議論をより詳しく行うとともに、より低エネルギー電子による破壊過程の様子を調べるために、さらに低加速の条件での電子線照射実験を行う必要があるが、透過電子顕微鏡では実現不可能であるため、本研究では、反射高速電子回折(RHEED)装置を利用して低加速条件での実験を可能にするための準備として、既存のRHEED装置改造を進めた。まずは、光検出のためにミラーの構造について検討した。一般にカソードルミネッセンスは、照射電子の加速電圧が低いほど試料から照射される光の強度が弱いと言われている。このためより効率的に光を取りこむ必要がある。楕円ミラーと放物線ミラーを検討したが、光の取り込み方法について、RHEED装置の真空チャンバーの構造上の制約を考慮して、放物面ミラーを採用することとした。また、これに伴って、ミラーを取りつけるためのステージ周りのデザイン修正を行い、必要なアタッチメントを作製した。新規に作成したミラーや改良した試料ステージの動作確認を行い、このシステムを利用した実験を開始した。目的としている1～3kV程度の低加速条件では、電子線密度を十分にとることができていない。この装置では、装置の更なる改造を行わないと光照射ができないため、光学的なシステムの検出効率を確認するのも手間取っており、現状では、十分な強度のCLの発光計測に成功しておらず、再現性のあるデータの取得には至っていない。光学系の調整を継続的に行って、電子線損傷の定量的評価を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

現在論文投稿準備中

[学会発表] (計 3 件)

- [1] eGFPの”電子線誘起変換”の試料環境依存性について
松井香樹、秋葉圭一郎、箕田弘喜、2018.9.16 日本生物物理学会 (於 岡山大学)
- [2] 電子線照射によるGFPの蛍光増強
松井香樹、秋葉圭一郎、箕田弘喜、永山國昭、2017.9.23 日本物理学会 2017 秋季大会 (於 岩手大学)
- [3] GFPの電子線励起は高スペクトルと蛍光スペクトルの不一致について
秋葉圭一郎、為廣克起、箕田弘喜、2017.9.23 日本物理学会 2017 秋季大会 (於 岩手大学)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 無し

6. 研究組織

(1) 研究分担者 無し

(2) 研究協力者 無し

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。