

# カソードルミネッセンス顕微鏡による細胞中の 高空間分解能蛋白質イメージング

## High Spatial-resolution Protein Imaging with Using Cathodoluminescence Microscopy

2011002



研究代表者 大阪大学 基礎工学研究科 准教授 橋本 守  
共同研究者 大阪大学 基礎工学研究科 助教 新岡 宏彦

### [研究の目的]

生命機能を明らかにするためには細胞内部における蛋白質種の同定と、その空間分布を明らかにする必要がある。電子顕微鏡を用いた場合、数 nm の空間分解能でイメージングが可能であり、蛋白質種の同定手法として免疫金染色法が知られているが、この手法では蛍光顕微鏡のようにカラーで複数の蛋白質種を見分ける事は不可能であった。

本研究では、カソードルミネッセンス (CL) を用いることにより、電子顕微鏡レベルの高空間分解能と、複数蛋白質種の識別能力を併せ持つ顕微鏡手法の確立を目的としている。CL とは物質に電子線を照射した際に誘起される光であり、異なる CL スペクトルを持つナノ蛍光体粒子をそれぞれ目的の蛋白質に修飾後 CL イメージングすることにより、蛋白質種を見分ける事が可能であると考えられる。上記目的達成のために、電子線励起によりそれぞれ異なるスペクトルで発光するナノ蛍光体の作製、細胞内に導入した発光波長の異なるナノ蛍光体の CL イメージングを行った。

### [研究の内容, 成果]

#### 1. SEM-CL 顕微鏡装置

本研究では、FE-SEM (JEOL, JSM-6500F)

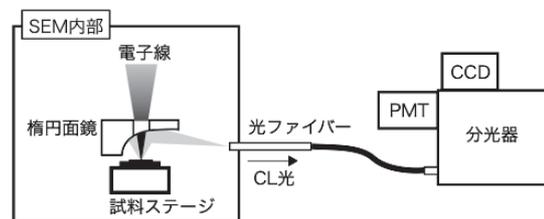


図1 SEM-CL 顕微鏡装置  
楕円面鏡には電子線を通す穴がついている

に図1に示すようなCL測定系(楕円面鏡, 光ファイバー, 分光器, CCD, 光電子増倍管(PMT))を連結した装置を用いた。SEM内部において試料上を電子線スキャンし、発生したCL光は試料上の楕円面鏡にて集光後、光ファイバーを通して分光器に導入した。CLスペクトルはCCDによって取得し、イメージングはPMTにて行った。

#### 2. ナノ蛍光体のCLスペクトル

ゾルゲル法を用いて、電子線励起によって発光するナノ蛍光体の作製を行なった。3種のナノ蛍光体粒子  $Y_2O_3:Tm$ ,  $Y_2O_3:Tb$ ,  $Y_2O_3:Eu$  のCLスペクトルを示す。それぞれの蛍光体は希土類の発光に由来したシャープなスペクトルを示しており、分光計測によって容易にそれぞれの粒子を識別可能である。

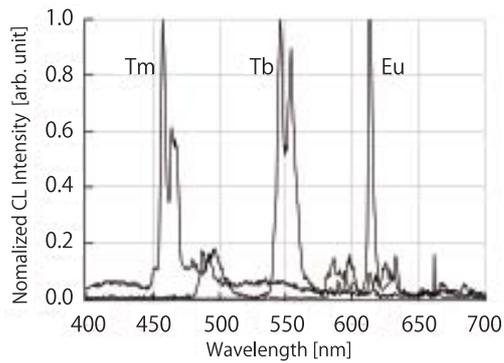


図2 ナノ蛍光体 ( $Y_2O_3:Tb$ ,  $Y_2O_3:Tm$ ,  $Y_2O_3:Eu$ ) それぞれのCLスペクトル

### 3. 細胞中ナノ蛍光体のマルチカラーCLイメージング

細胞中ナノ蛍光体のCLカラーイメージングを行なった。計測試料は、3種類のナノ蛍光体を取り込ませた Macrophage-like cell (J744A.1) を用いた。3種のナノ蛍光体  $Y_2O_3:Tm$ ,  $Y_2O_3:Tb$ ,  $Y_2O_3:Eu$  をそれぞれ、蒸留水と混合し、超音波処理を施す事で蛍光体の分散液を作製した。分散液を培養中の細胞に滴下し、細胞の食作用を利用する事でナノ蛍光体を細胞内に導入した。その後、細胞固定、脱水とエポキシ樹脂への包埋を行い、マイクロームを用いて500 nmの切片とし、ガラス基板上に乗せた。さらに、水酸化カリウムエタノール溶液でエポキシ樹脂を溶解させた後、金蒸着を行い、観察試料とした。

図4に細胞のSEM像と、計測波長462 nm, 550 nm, 614 nmにおけるCL像をそれぞれ示す。図3より、SEM像からは細胞中に導入された3種類のナノ蛍光体を見分ける事はできないが、CL像では発光波長の違いによりそれぞれのナノ蛍光体の空間分布をイメージング出来ていると言える。

### 4. レーザーアブレーションによるナノ蛍光体の微細化

CL顕微鏡は10 nm以上の空間分解能を有しているが、蛋白質等生体分子観察においてその空間分解能はナノ蛍光体のサイズによって制限

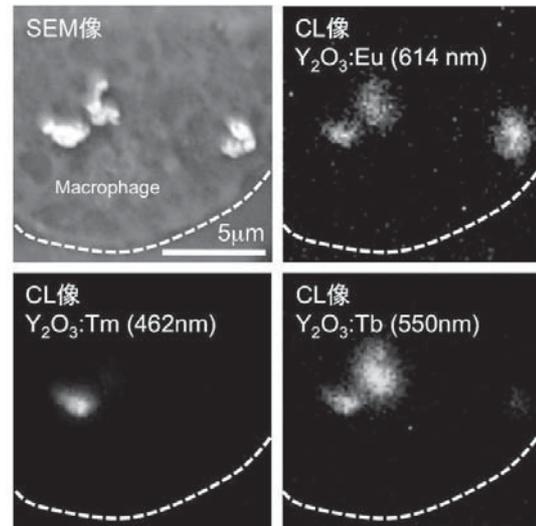


図3 マクロファージ細胞内ナノ蛍光体のSEM像及びCL像  
カッコ内は計測波長を表わす

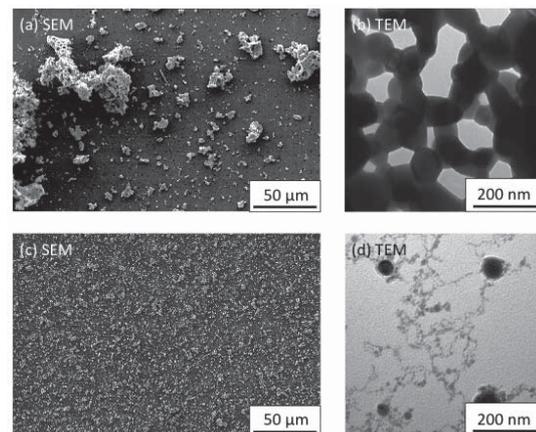


図4 ナノ蛍光体のSEM像及びTEM像  
(a) (b) はレーザーアブレーション処理前  
(c) (d) はレーザーアブレーション処理後

される。ソルゲル法で作製したナノ蛍光体は凝集や焼成の際のネッキングによりそのサイズが大きく、空間分解能を悪くする要因となる。そのため、液相レーザーアブレーション法を用いて、凝集ナノ蛍光体の分散化および微小ナノ蛍光体の作製を行った。液相レーザーアブレーション法は高強度のパルスレーザーを集光した際に生じるプラズマや衝撃波を用い、液中ナノ粒子の微細化/分散化を行なう手法である。図4はレーザーアブレーション法を施す前後のナノ蛍光体 ( $Y_2O_3:Eu$ ) のSEMおよびTEM像である。これらの像より、ナノ蛍光体が微細化

/分散化されている事が見てとれる。

## 5. ナノ蛍光体の高輝度化

微細化に伴い、ナノ蛍光体のCL発光強度は減衰する。従って、微細化により空間分解能を改善しても、S/Nが下がることによって計測時間が長くなることや、そもそもイメージングができなくなる恐れがある。そのため、ナノ蛍光体の高輝度化を行なった。

$Y_2O_3$ は酸化物であり導電性が低く、電子線照射によりチャージアップし易い。照射電子線はチャージアップした電子によって反発力を受けて減速し、ナノ蛍光体の奥まで侵入できない。結果として、励起体積が減少し、発光強度の減少に繋がる。我々はZnを添加することによりナノ蛍光体の導電性を上昇させ、チャージアップの影響を軽減することによりCL発光強度の増加を行なった。

図5にCL発光強度、照射電子線の電流量とZnの添加量との関係を示す（Znの濃度はモル%で表わしている。30%のとき（ $Y_{0.95-x}Eu_{0.05}$

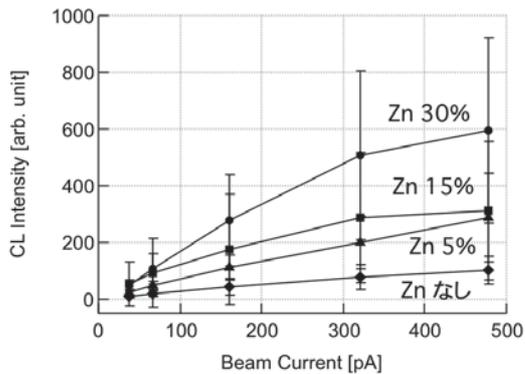


図5 Zn添加濃度を変化させた際の、電流値と発光強度の関係 Euの濃度は全て5%。縦軸はCL発光強度。横軸はビーム電流。

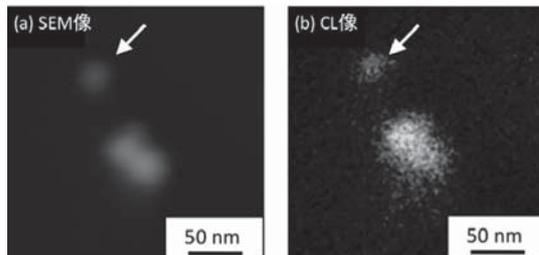


図6 ナノ蛍光体 ( $Y_2O_3:Eu/Zn$ ) のSEM像(左)及びCL像(右) 矢印は直径約20 nmのナノ蛍光体を示す

$Zn_x)_2O_3$ ,  $X=0.30$ である。)。粒径200 nm程度のナノ蛍光体を選択し計測を行なった。Zn濃度を上昇させることによりCL光強度が上昇していることが分かる。またZnの濃度が30%のとき、添加しない場合に比べて10倍程度のCL光増強が確認された。

さらに、Znの濃度が15% ( $X=0.15$ ) のナノ蛍光体のCLイメージングを行なったところ、粒径約20 nmの微小ナノ蛍光体のイメージングに成功した(図6)。この結果により、CL顕微鏡を用いた高空間分解能イメージングへ向けてその端緒を得ることができた。

## 6. 細胞中ナノ蛍光体の蛍光イメージング

本研究で用いた希土類添加  $Y_2O_3$  蛍光体は光励起によって蛍光を発する。CL顕微鏡観察のための試料作成には時間を要するが、その前に蛍光顕微鏡で試料の状態を確認することが可能である。また、近年、蛍光顕微鏡像と電子顕微鏡像両方から生体試料の情報を得る光・電子相関顕微鏡法(CLEM: Correlative Light and Electron Microscopy)について報告がなされているが、本ナノ蛍光体粒子はCLEMへの応用が可能と考える。

図7はレーザーアブレーション後の  $Y_2O_3:Eu$  ナノ蛍光体を取り込んだHeLa細胞の蛍光像及び透過像である。ナノ蛍光体は培養液に入れ、エンドサイトーシスによってHeLa細胞に

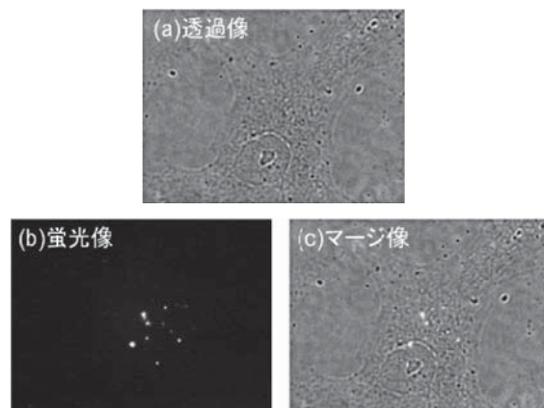


図7  $Y_2O_3:Eu$  ナノ蛍光体を導入したHeLa細胞の (a) 透過像 (b) 蛍光像 (c) マージ像

取り込ませた。励起光には水銀ランプの輝線（波長 254 nm）を用い、画像取得には EM-CCD（Andor, LUCA）を用いた。また、 $Y_2O_3:Eu$  ナノ蛍光体の蛍光波長は 614 nm 辺にあり、CL 光と同様である。結果、エンドサイトーシス小胞に存在するナノ蛍光体が輝点として蛍光観測された。

#### [今後の研究の方向, 課題]

今後は、より高い空間分解能の実現を目指し、より小さく形状の揃ったナノ蛍光体作製を行なう。また、蛋白質をナノ蛍光体修飾で染色するために、ナノ蛍光体粒子の表面を有機分子でコーティングして単分散状態のナノ蛍光体粒子を作製した後、免疫抗体分子を取り付ける。

本研究では SEM-CL 顕微鏡を用いたが、将来的には TEM-CL や大気圧 SEM を用いたイメージングへの応用を考えている。TEM-CL では、細胞内小器官の情報を同時に得ることができ、大気圧 SEM を用いると液中細胞の CL イメージングが可能となり、より生きた状態に近い試料の観察ができる。

#### [成果の発表, 論文等]

##### 原著論文 (1 報)

- 1) H. Niioka, T. Furukawa, M. Ichimiya, M. Ashida, T. Araki, and M. Hashimoto, "Multicolor cathodoluminescence microscopy for biological imaging with nanophosphors", APEX, **4**, 11, 112402-112404 (2011).

##### 国際学会発表 (3 件)

- 1) T. Furukawa, H. Niioka, M. Ichimiya, S. Ichikawa, T. Nagata, J. Miyake, M. Ashida, T. Araki and M. Hashimoto, "Synthesis of Rare-earth Doped Nano Phosphors for Biological Cathodoluminescence Imaging", Focus on Microscopy 2013 (Maastricht, The Netherlands, March, 2013). (ポスター)
- 2) H. Niioka, T. Furukawa, M. Ichimiya, M. Ashida, T. Araki, M. Hashimoto, "Multicolor cathodoluminescence imaging for biological cells with using nanophosphors", Focus on Microscopy 2012

(Singapore, April, 2012).

- 3) T. Furukawa, H. Niioka, M. Ichimiya, T. Nagata, M. Ashida, T. Araki and M. Hashimoto, "Well-dispersed nanophosphors for cathodoluminescence microscopy produced by using laser ablation method", Focus on Microscopy 2012 (Singapore, April, 2012). (ポスター)

##### 国内学会発表

(招待講演 3 件, その他口頭発表 9 件, ポスター発表 4 件)

- 1) 古川太一, 新岡宏彦, 一宮正義, 市川 聡, 永田智啓, 三宅 淳, 芦田昌明, 荒木 勉, 橋本 守, "カソードルミネッセンス生体イメージングのための微小希土類添加ナノ蛍光体作製", 第 60 回応用物理学会学術講演会 (2013/3/27-30, 神奈川工科大学).
- 2) H. Niioka, T. Furukawa, M. Ichimiya, T. Nagata, M. Ashida, T. Araki, and M. Hashimoto, "Rare-earth Doped  $Y_2O_3$  Nanophosphors Synthesized for Bio-imaging with Using CL and Fluorescence Microscopy", 第 8 回阪大ナノサイエンス・ナノテクノロジー国際シンポジウム (2012/12/10-11, 大阪大学) (ポスター).
- 3) 新岡宏彦, 古川太一, 一宮正義, 永田智啓, 芦田昌明, 荒木 勉, 橋本 守, "希土類添加  $Y_2O_3$  ナノ蛍光体を用いたマルチモーダル蛍光・CL 細胞イメージング (Multimodal fluorescence and CL imaging for biological cells with using rare-earth doped  $Y_2O_3$  nanophosphors)", 平成 24 年度 日本分光学会年次講演会 (2012/11/27-29, 東京工業大学百年記念館).
- 4) 新岡宏彦, 古川太一, 一宮正義, 永田智啓, 芦田昌明, 荒木 勉, 橋本 守, "希土類添加ナノ蛍光体粒子を用いた蛍光・CL 細胞イメージング", 生理研研究会 (2012/10/24-25, 生理学研究所) (招待講演)
- 5) 新岡宏彦, 古川太一, 一宮正義, 永田智啓, 芦田昌明, 荒木 勉, 橋本 守, "光学顕微鏡とカソードルミネッセンス顕微鏡を用いたマルチモーダル細胞イメージング", 50 回日本生物物理学会年会 (2012/9/22-24, 名古屋大学).
- 6) 新岡宏彦, 古川太一, 一宮正義, 永田智啓, 芦田昌明, 荒木 勉, 橋本 守, "高輝度ナノ蛍光体粒子を用いたカソードルミネッセンス細胞イメージング", ナノ学会第 10 回大会 (2012/6/14-16, 大阪大学) (ポスター).
- 7) 新岡宏彦, 古川太一, 一宮正義, 芦田昌明, 荒木 勉, 橋本 守, "ナノ蛍光体粒子とカソードルミネッセンス顕微鏡を用いたマルチカラー生体イメージング", 日本顕微鏡学会 (つくば国際会議場, 2012/5/14-16) (指定講演)
- 8) 古川太一, 新岡宏彦, 一宮正義, 永田智啓, 芦田

- 昌明, 荒木 勉, 橋本 守, “希土類ナノ蛍光体を用いた生体カソードルミネッセンスイメージングの高輝度化”, 第 59 回応用物理学関係連合講演会 (2012/3/15-18, 早稲田大学).
- 9) 新岡宏彦, 古川太一, 一宮正義, 芦田昌明, 荒木 勉, 橋本 守, “ナノ蛍光体を用いた多色カソードルミネッセンス細胞イメージング”, 顕微鏡学会分科会バイオメディカルニューマイクروسコープ (2012/3/5, 帝京大学医学部) (招待講演)
- 10) H. Niioka, T. Furukawa, M. Ichimiya, M. Ashida, T. Araki, M. Hashimoto, “ナノ蛍光体粒子を用いたカソードルミネッセンス生体イメージング”, 第 3 回デザインバイオニクス講演会 (2012/2/21-22, 大阪大学)
- 11) H. Niioka, T. Furukawa, M. Ichimiya, M. Ashida, T. Araki, M. Hashimoto, “Super-resolution imaging of nano phosphors via cathodoluminescence microscopy for biological imaging” 平成 23 年度日本分光学会年次講演会 (2011/11/30-12/2, 東京工業大学)
- 12) 古川太一, 新岡宏彦, 一宮正義, 芦田昌明, 荒木 勉, 橋本 守 “ナノ蛍光体粒子を用いたマルチカラー 生体カソードルミネッセンスイメージング”, Optics & Photonics Japan 2011, (2011/11/28-30, 大阪大学)
- 13) 新岡宏彦, 古川太一, 一宮正義, 芦田昌明, 荒木 勉, 橋本 守 “分散化ナノ蛍光体粒子を用いたカソードルミネッセンス生体イメージング”, Optics & Photonics Japan 2011, (2011/11/28-30 大阪大学) (ポスター)
- 14) H. Niioka, T. Furukawa, M. Ichimiya, M. Ashida, T. Araki, M. Hashimoto “Multi-color Cathodoluminescence Imaging for Biological Cells With Using Nanophosphors”, 第 7 回阪大ナノサイエンス・ナノテクノロジー国際シンポジウム (2011/11/10, 大阪大学) (ポスター)
- 15) 古川太一, 新岡宏彦, 一宮正義, 芦田昌明, 荒木 勉, 橋本 守, “カソードルミネッセンスを用いた細胞の超解像イメージング” 第 72 回応用物理学学会学術講演会予稿集, 2a-B-8 (2011/8/29-9/2 山形大学)
- 16) T. Furukawa, H. Niioka, M. Ichimiya, M. Ashida, T. Araki, M. Hashimoto “カソードルミネッセンスを利用した生体細胞の超解像イメージング手法”, 第 37 回レーザー顕微鏡研究会 (2011/7/6, 理研)