P-44

生命科学

# 電子線誘起クリック反応を用いた新規光電子相関観察法の開発



## ■ はじめに

光電子相関観察法とは、主に生物試料の同一箇所を光学顕微鏡と電子顕微鏡にて観察することにより、単一の顕微鏡では見ることのできない多面的な情報を得る技術である。しかしながら、その一般的な手法は複雑であり、また技術的な慣れを要するものである。

そこで、私たちはタンパク質を標的としたエキシマー蛍光ラベル分子を設計し、電子線により誘起されるチオールエンクリック反応を用いることで、新たな光電子相関観察法の簡便な一手法を開発した。

## ■ 活動内容

1. 分子設計・合成

末端にアルケニル基およびピレニル基を有するエキシマー蛍光前駆体(EFP)を設計し、有機合成した(図1)。本手法では、EFPのアルケニル基と生体試料中のタンパク質のシステイン残基をチオールエンクリック反応により化学結合させることで、タンパク質を蛍光ラベルする(図2)。さらにチオールエンクリック反応はラジカルにより反応が進行するため、電子顕微鏡の電子線照射に伴うラジカル発生を起因としたタンパク質のラベル化が可能である。

またEFPをジチオトレイトール(DTT)と反応させると、ピレニル基の二量化の確率が上昇し、エキシマー蛍光を観測することに成功した。

2. 培養細胞の光電子相関観察法

COS-7培養細胞をEFP溶液中にて、大気圧走査電子顕微鏡(ASEM)を用いて観察した。ASEMは倒立型の走査電子顕微鏡であり、下方からの電子線を窒化シリコン薄膜を透過させることで、大気圧下・溶液中のサンプルの表面観察が可能である(図3)。さらに上方のオープンスペースに光学顕微鏡を搭載可能である。そして同一サンプルを蛍光顕微鏡にて観察すると、電子顕微鏡観察を行った部位のみに、ピレンのエキシマー蛍光が観測された(図4)。

3. マウス脳組織切片の光電子相関観察法

マウスの脳組織(海馬)の切片を切り出し、EFP溶液中にてASEMによる電子顕微鏡観察を行った。さらに蛍光顕微鏡観察を行ったところ、電子顕微鏡にて観察した部位のみにエキシマー蛍光が認められた。さらに電子顕微鏡にて低倍率に観察した部位よりも高倍率に観察した部位において、蛍光強度の強い像を得ることができた。このことから、電子顕微鏡の解像度がEFPのクリック反応の率を反映していることが示唆された。

## ■ 関連情報等

本研究成果は、下記の論文にて公開された。

"Pyrene Excimer-Based Fluorescent Labeling of Cysteines Brought into Close Proximity by Protein Dynamics: ASEM-Induced Thiol-Ene Click Reaction for High Spatial Resolution CLEM", Naya, M.; Sato, C. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *21*, 7550.

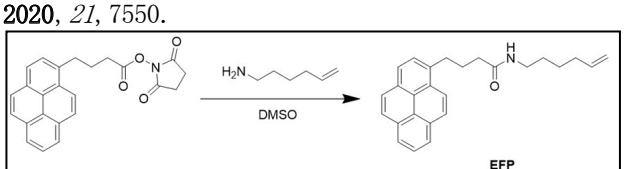


図 1. エキシマー蛍光前駆体（EFP）の合成

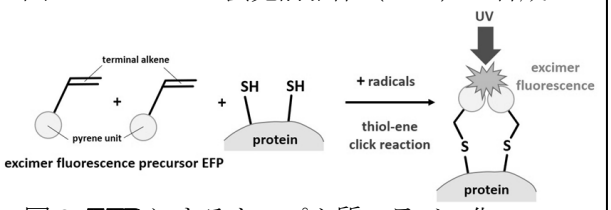


図 2. EFP によるタンパク質のラベル化

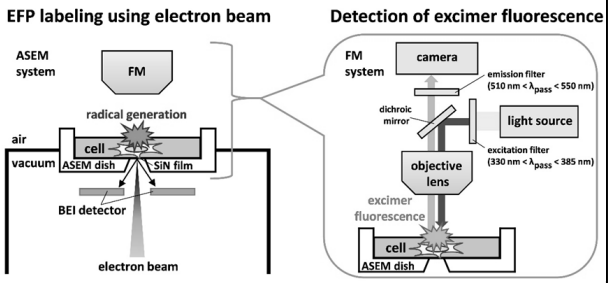


図 3. 電子顕微鏡と蛍光顕微鏡を兼ね備えた大気圧走査電子顕微鏡（ASEM）の装置図

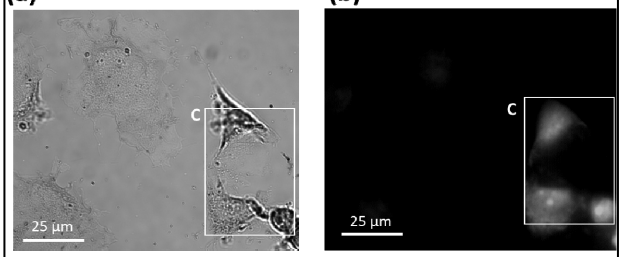


図 4. 培養細胞の光電子相関観察法 (a)位相差像 (b)蛍光像 (C が電子顕微鏡観察をした部位)

代表発表者　納谷　昌実(なや　まさみ)
所　　属　産業技術総合研究所・健康医工学研究部門
博士研究員(イノベーションスクール生)
問合せ先　〒305-8566　茨城県つくば市東 1-1-1
TEL:029-861-6476
Email:m.naya@aist.go.jp