細胞膜機能の可視化に向けた電子線照射による膜損傷評価

Evaluation of the damage of biological membrane by electron-beam irradiation for visualization of a membrane function

静岡大 [1]，豊橋技科大 [2]　伊藤 銀河 [1]，手老 龍吾 [2]，○居波 渉 [1]，川田 善正 [1]

Shizuoka Univ. [1], Toyohashi Univ. of Tech. [2]

Ginga Ito[1], Ryugo Tero[2], °Wataru Inami[1], Yoshimasa Kawata[1]

E-mail: inami@eng.shizuoka.ac.jp

本研究の目的は，高分解能顕微鏡を用いてナノスケールの細胞膜ダイナミクスを可視化することである．そこで，平面膜構造の人工細胞膜を作製し，我々が開発している D-EXA 顕微鏡を用いて観察を行う．D-EXA 顕微鏡は光の回折限界を超えた高空間分解能を有する顕微鏡である[1]．しかしながら生体試料観察においては，細胞内は様々な構造や物質が混在しているため，膜タンパク質のような 1 分子の形状を識別することは困難である．従って，膜タンパク質が組み込まれた人工細胞膜を観察対象とすることにより，膜タンパク質からの蛍光のみを検出し，そのダイナミクスを直接可視化することが狙いである．

Fig.1 に，D-EXA 顕微鏡の原理図を示す．電子線が薄膜を通過し試料内で収束する．収束した電子線のスポットサイズは数十 nm である．このとき励起されたカソードルミネッセンスを検出することにより，高空間分解能画像を取得することができる．

本研究ではまず，人工細胞膜と光退色後蛍光回復法(FRAP)を応用して，電子線照射に対する細胞膜の損傷評価を行った．Fig.2 に，電子線照射による膜損傷の蛍光観察結果を示す．人工細胞膜の作製時に蛍光標識脂質を混ぜ込み，蛍光顕微鏡観察によって人工細胞膜を評価した．Fig.2(A) 電子線量 18 electrons/nm^2 の場合，一定時間経過後に照射領域の蛍光が回復したため，膜構造が保たれていることが分かる．Fig.2(B) 電子線量 184 electrons/nm^2 の場合，一定時間経過後においても照射領域が褪色したままであるため，膜が損傷していると考えられる．本手法を用いることにより，細胞膜ダイナミクスの可視化に向けた，最適な電子線照射条件を導き出すことができた．

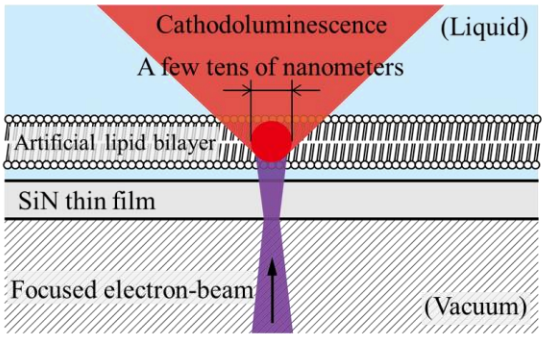

Fig. 1: Principle of the D-EXA microscope.
The focused electron-beam is irradiated to sample through a thin film, and directly excites cathodoluminescence. Excites spot size is a few tens of nanometers.

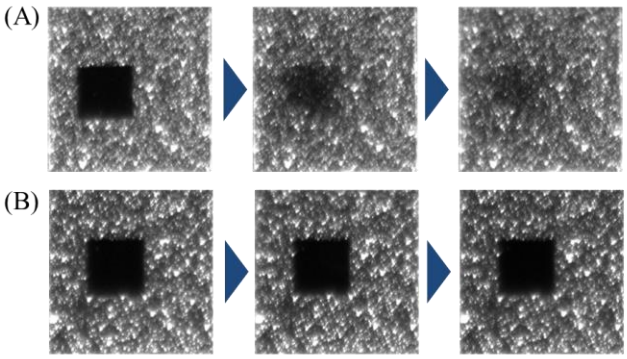

Fig. 2: Evaluation of the membrane damage by electron-beam irradiation.
(A) Electron dose: 18 [electrons/nm^2], (B) Electron dose: 184 [electrons/nm^2]

[1] Yasunori Nawa, et al., BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS 5(2), 378-386, (2014)