



蛍光シグナルに潜む超微形態を捉える

～高精度 In-resin CLEM～

順天堂大学 大学院医学研究科
谷田以誠, 山口隼司, 角田宗一郎, 内山安男

1. はじめに

超解像顕微鏡の発達により～蛍光顕微鏡像の分解能は数十 nm レベルになってきた。また、セミインレンズ型の走査型顕微鏡により、透過型電子顕微鏡にせまる分解能で、蛍光顕微鏡で観察可能な広範囲を観察できるようになってきた。これらの技術革新により、光線-電子相関顕微鏡法 (Correlative Light and Electron Microscopy; CLEM) についても、より高精度・高感度化が求められる状況となりつつある。In-resin CLEM は同一の樹脂包埋超薄切片を、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡を用いて同時観察し、より相関精度を高める手法で、理論上は電子線と蛍光波長の差による違い以外は相関性が担保される。また、蛍光シグナルの Z 軸分解能の向上が期待できる。In-resin CLEM においても、超微形態の保持性が高いエポキシ樹脂を用いるのが理想的であるが、エポキシ樹脂の自家蛍光及び樹脂包埋の過程において多くの蛍光タンパク質が蛍光を消失してしまうため、これまであまり行われてこなかった。われわれはエポキシ包埋樹脂生物試料の In-resin CLEM に適用できる緑色蛍光タンパク質および遠赤色蛍光タンパク質を見出し、最近、近接依存性標識法を用いた高感度 In-resin CLEM にも成功した。本稿では、蛍光タンパク質および近接依存性標識法を用いたエポキシ包埋樹脂生物試料の In-resin CLEM について概説する。

2. CLEM における避けられない歪み～高精度化へ

CLEM は、同一試料を蛍光顕微鏡および電子顕微鏡で観察し、蛍光顕微鏡による標的タンパク質の細胞内局在情報と電子顕微鏡による超微形態情報を相関・解析する方法である¹⁾。通常 CLEM では、まず、生物試料をパラホルムアルデヒドなどの固定液で固定した後、蛍光顕微鏡観察をおこなう。その後、電子顕微鏡観察のために後固定、四酸化オスmium染色、エタノール脱水、エポキシ樹脂重合反応により、エポキシ樹脂包埋試料を作製する。この樹脂包埋試料から、50-100nm 厚の超薄切片を作製し、電子顕微鏡による形態観察を行い、得られた蛍光顕微鏡像と電子顕微鏡像の局在一致を図る。このように通常 CLEM では蛍光顕微鏡像取得後に化学処理と物理処理をおこなうため、蛍光顕微鏡像と電子顕微鏡像の間には、避けられない歪みが生じる。また蛍光シグナルは厚みのある細胞 (数～十数 μm 厚) から得られる蛍光情報であるのに対し、相関できる電子顕微鏡像はその数十分の一以下の厚みの形態情報である。このように大きく異なる Z 軸分解能から得られた画像情報を相関させるので、解析領域は非常に限定されてしまう。しかしながら、近年、超解像顕微鏡の発達により、蛍光画像の分解能が数十 nm となり、走査型顕微鏡の発達により透過型顕微鏡にせまる分解能で、広い領域を観察できるようになってきたため、より高精度の CLEM, In-resin CLEM, の開発が待たれていた。

3. 蛍光タンパク質を用いた In-resin CLEM

In-resin CLEM とは、樹脂包埋試料から電子顕微鏡用に用いる超薄切片 (50-100 nm 厚) を作成し、同一切片を用いて蛍光顕微鏡および電子顕微鏡観察を行い、相関させる方法である。In-resin CLEM