

氏 名 LOUKANOV, Alexandre Roumenov

学位 (専攻分野) 博士 (理学)

学位記番号 総研大甲第 1260 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Development of High-Resolution Labeling Techniques
for Biological Electron Microscope

論文審査委員 主 査 教授 川口 泰雄
教授 永山 國昭
教授 重本 隆一
教授 臼倉 治郎 (名古屋大学)

論文内容の要旨

Multiple-labeling immuno-electron microscopy is a powerful tool for localizing and co-localizing different antigens simultaneously in cell and tissues at high spatial resolution. Commonly used labels for this purpose are differently sized gold spheres. A comparison of results obtained with differently sized markers is difficult, because the diameter of markers influence their labeling efficiency. He is developing a methodology for multiple immunolabeling of biological specimens using equally sized markers made from different elements. The advantage over conventional technique is the possibility of using very small markers with same size for (i) correlative light and electron microscopy, (ii) achieving of higher labeling efficiency and (iii) reduced steric hindrance between labels at closely spaced sites. In *Chapter I* are presented the newly developed makers as candidates for correlative light and electron microscope. They represent semiconductor quantum dots of ZnS, CdS, CdSe/ZnS, colloidal gold, platinum, V_2S_3 and Cr_2S_3 nanoparticles of 3 – 5 nm in diameter. The synthesis of semiconductor nanocrystals is done by the microemulsion method in sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate surfactant reverse micelles containing water. The quantum dot size and properties are controlled by variation of the precursor concentration at given water content. After synthesis the nanocrystal particles are modified with (\pm)-dihydrolipoic acid polymer shell contains carboxyl groups and conjugated with streptavidin (or avidin). Thus their organic shell may be decorated with any kind antibody by streptavidin – biotin interaction. Colloidal gold and platinum spheres were prepared by reduction in aqueous solution of their salts with sodium borohydride. Then the antibody was adsorbed on the metal surface by hydrophobic interaction.

If the semiconductor quantum dots are irradiated with UV they emit light with color depending of their bandgap energy. For example ZnS emit blue, CdS – orange and CdSe/ZnS core-shell nanocrystal emit light in all visible spectrum depended of the core's size. The colloidal metal gold and platinum nanoparticles do not possess any fluorescent properties. Nevertheless, they are conjugated with an antibody which itself is modified with fluorescent dye. Thus the markers can be distinguished (i) in the fluorescent microscope by different emitted color; and (ii) in the analytical microscope by the characteristic X-ray emission from their different elemental composition.

In *Chapter II* is presented the benefit of use this methodology as high-resolution technique for distinguishing of membrane proteins. It was tested on sodium dodecyl sulfate-digested replica of rat hippocampus, where AMPA- and NMDA- type glutamate receptors were co-localized and distinguished by equally sized CdSe/ZnS semiconductor quantum dots and colloidal gold particles. To improve nanoparticle's visibility and detectability the replica film was made only with carbon to avoid the background usually seen in the conventional platinum/carbon replica. Then the extracellular face (E-face) of hippocampal pyramidal cells was discriminated from the protoplasmic (P-face) by observation of the specimen in high-angle annular detector dark-field STEM mode. The intramembranous proteins were recognized as bright spots at postsynaptic membranes. Mixed clusters of immunolabeled quantum dots and colloidal gold particles were localized on the E-face, where the membrane proteins were defined as AMPA and NMDA receptors. The quantum dots

(labeled AMPA receptors) were distinguished from the gold nanoparticles (labeled NMDA receptors) by combining: (i) contrast difference (in most cases Qdots are lowering contrasted than the gold particles) and (ii) Spectroscopic analysis of the characteristic X-ray emission from their elemental composition in HAADF STEM mode. This approach enables to examine the number, density and ratio of the glutamate receptors on the image. The sensitivity of EDX-detector allows the identification of even 1 nm gold particle on 20 nm in thickness carbon freeze-fractured replica. This advantage opens a great potential for developing of advanced techniques for high-resolution labeling of epitopes or subunit components of biological macromolecules.

The presented methodology is not limited by the necessity of using labels of different size and therefore could apply in whole range of new biological applications requiring small labels. Only labels with different chemical composition are required, which can be resolved by EDX-spectrophotometer. The number labels depends on the nanoparticles number with sufficient different X-ray spectra that can be produced. Therefore it should be possible to go far beyond the limitations of the conventional multiple labeling techniques.

論文の審査結果の要旨

電子顕微鏡法は、生物学における基本的計測法の一つである。かつては、形態学の最先端機器として医学・生物学を先導したが、現在では発見的手法としての地位を分子生物学的手法と相性の良い蛍光顕微鏡やX線構造生物学法に譲っている。しかし、電子顕微鏡法はその高分解能性故に分子レベルでの定量的研究には幅広い応用可能性が残っている。本論文の研究動機も電子顕微鏡法の定量化の確立という大きな流れの中にある。

具体的には、i) 新規な光顕・電顕相関イメージングのための共通ラベル剤（標識薬）の開発、ii) 新規ラベル法に適した電子顕微鏡手法の開発、iii) それらを用いた神経細胞表面の受容体タイプ選択的標識法の開発である。特に一般に用いられている金コロイドなどのラベル剤の大きさからくる分解能低減やラベル効率化の低下に注目し、定性的、定量的にも従来の電顕ラベル法を凌駕する手法の開発を目指して、以下の新規の手法の開発とその応用を行った。

i) 新規光顕・電顕共通ラベル剤開発

無機蛍光剤、Q-dotの新規合成法を開発し、硫黄 (S) やセレン (Se) と各種金属との合成ラベル剤Q-dotを作製した。金属種の選択とQ-dot径の制御合成（逆ミセル法）により多彩な発色が可能である。特にZnS、CdSeにつき、3~5nm径のQ-dotを合成し七色の発色を確かめている。光顕との相関イメージングをとる電顕用ラベル剤として、このQ-dotを応用するため、有機物表面修飾により抗体やアビジン等の吸着サイトを導入した。

ii) Q-dotラベル法に適した電子顕微鏡法の開発

ZnS、CdSe等は、従来の金コロイドに比べ原子量が低く、電顕的に低コントラストである。そのため重金属を用いる電子染色試料や炭素レプリカ法への適用は不可能とされてきた（背景のほうQ-dotより高コントラストのため）。そのため、電子染色なしでコントラスト回復である位相差法とQ-dotの相性は良い。一方本論文では神経終末の受容体観察に広く使われているレプリカ法にQ-dotの適用を試みている。そのため、白金という重金属を排する新しい低元素レプリカ手法、炭素レプリカ法を開発した。炭素膜にレプリカされた受容体への抗体Q-dotラベル観察を可能とするため、本論文では走査透過電顕 (STEM) と元素弁別イメージング法 (EDX) の組み合わせという新規手法を開発した。そのことにより、ZnS Q-dotでは5nm、CdSe Q-dotでは3nm、金コロイドでは1.4nmまでの微小ナノ粒子のラベル剤適用を可能とした。

iii) シナプス凍結切断レプリカ上の受容体の観察

受容体の種類 (NMDAとAMDA) の弁別的ラベルがこの研究でのターゲットである。特に同一サイズのQ-dotまたは金コロイドをEDXに用いることで定量的に元素弁別でき、従来法のサイズ分布に伴う曖昧さを完全に払拭した。さらに小さなラベル体が高効率の抗体ラベルとなることを発見し、電顕観察の定量性の向上に大きな寄与をした。

こうした一連の研究において、新しさおよび有用性につき大きな進歩が認められた。