

2023 年度年次報告書

加齢による生体変容の基盤的な理解

2022 年度採択研究代表者

松本 翔太

東京大学 定量生命科学研究所

助教

次世代電子顕微鏡による早老症発症の分子基盤の解明

研究成果の概要

1. クライオ-蛍光統合電子顕微鏡システム(iFLM)を用いた細胞核内の可視化

本研究の最終目標は紫外線損傷部位周辺のタンパク質をマッピングし、早老症発症の原因の一つであるヌクレオチド除去修復(NER)の全容を解明することである。この手法を実現するため、任意の位置の細胞核内を観察するための条件検討を行った。

I タンパク質の可視化に必要な細胞薄切片の作製

細胞を観察用グリッド上で培養する手法は昨年度で確立しているため、適切な細胞密度で細胞をグリッド上で培養した。このグリッドを同じく昨年度で検討が完了した最適条件で瞬間凍結することにより、観察用グリッドに乗った凍結細胞を得た。このグリッドを iFLM に挿入し、iFLM に内蔵されている走査型顕微鏡(SEM)および蛍光顕微鏡(LM)により相関撮影を行った。ここで得られた蛍光を標的として細胞切片の作製を試みた。得られた切片のクオリティを元に、条件を細かく調整することを繰り返した。切片のクオリティの確認にはクライオ電子顕微鏡(Cryo-EM)を用いて撮影を行うため、一度 iFLM からグリッドを取り出し、Cryo-EM へと移送する必要がある。この移送の際に切片が破損することもわかったため、切片は極力薄くする必要がある一方、ある程度の強度を確保する必要があった。これらの条件検討により複数枚の薄切片を自動で取得することに成功した。この切片を SEM と LM で相関撮影すると切片の位置が蛍光部位と一致していたため、蛍光タンパク質を標的として切片作製に成功したと思われる。

II 薄切片の Cryo-EM によるトモグラフィー撮影と三次元マッピング

上記の I で作製した薄切片に対して Cryo-EM を用いた高分解能撮影を行った。Cryo-EM は透過型電子顕微鏡であるため、観察対象は十分に薄くないと電子線を透過せず、有効な画像を取得することが困難となる。本研究で標的とするタンパク質を観察するためにはより薄い切片が求められた。そこでさらに薄い切片の作製に現在取り組んでおり、一部の粒子については Cryo-EM により標的と思われるタンパク質を捉えることに成功した。