

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04819

研究課題名(和文) X線レーザーとナノ構造形成技術を駆使した高速電子密度マッピング

研究課題名(英文) High-throughput electron density mapping by a combination of X-ray laser and nanofabrication technology

研究代表者

鈴木 明大 (Suzuki, Akihiro)

北海道大学・電子科学研究所・助教

研究者番号：20781850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、フォトリソグラフィ技術を駆使して、X線レーザーイメージングに利用する試料環境セルの改良を試みた。その結果、孤立した試料へX線レーザーが照射される割合を制御することに成功した。さらに、X線レーザーイメージングの究極的な目標の一つである膜タンパク質のイメージングに向けて、大きい入射角で測定が可能な試料環境セルを設計・作製した。最後に、新型試料環境セルが実際にX線レーザー測定に利用できることを、X線レーザー施設SACLAにて確かめた。この成果は、2019 PCCP HOT articles (Physical Chemistry Chemical Physics 誌) に選出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

液体ジェットインジェクターを利用した試料導入方法と比較し、試料環境のコントロールが容易な試料環境セルの高度化を進めることができた。将来的に、希少試料の測定や、温度やpHに応答したダイナミクス観察に繋がる。また、放射線損傷の影響を受けずに内部構造のスナップショット画像を復元できるX線レーザーイメージングは、電子顕微鏡や原子間力顕微鏡と相補的な技術であり、触媒材料の構造解析など産業分野でも活用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, a liquid cell used for X-ray laser imaging was improved by utilizing photolithography technology. As a result, it allows us to control a single-particle hit rate, which is important for high-throughput electron density mapping. Furthermore, we designed and manufactured a newly designed liquid cell that can be measured even at high tilt angles towards three-dimensional imaging of unidirectionally-aligned particles in solution. Finally, we have demonstrated that the new liquid cell can be used for the X-ray laser measurement using SACLA. The research paper of the result was selected in the 2019 PCCP HOT articles of Physical Chemistry Chemical Physics.

研究分野：X線イメージング

キーワード：X線自由電子レーザー コヒーレントX線イメージング フォトリソグラフィ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フェムト秒 X 線レーザーによる生体分子イメージングの可能性が計算機シミュレーションによって 2000 年に示され¹、その後、世界各地で X 線レーザー施設の建設と供用が進んでいる。日本では 2012 年から硬 X 線自由電子レーザー施設 SACLA の供用がはじまり、超短パルス・高輝度・ほぼ完全な空間コヒーレンスという特徴を生かした様々な研究が進められている²。我々の研究グループでは、Pulsed Coherent X-ray Solution Scattering(PCXSS)と名付けたイメージング法の研究を進めてきた。本手法は、Micro-Liquid Enclosure Array(MLEA)³と名付けた独自開発の溶液セルに特徴をもち、真空環境であるイメージングチャンバ内に保持された溶液試料を観察対象とする。X 線レーザーパルスを溶液試料に入射して得られるシングルショットコヒーレント X 線回折(CXD)パターンを 2 次元検出器で取得し、その CXD パターンを拘束条件に位相回復計算を実行することで、溶液中の試料像を復元できる。今までに、数 100 nm 程度の大きさの生細胞⁴や自己組織化ナノ粒子⁵の無損傷イメージングに 10 nm から数 10 nm の空間分解能で成功してきた。また、研究を進める中で、これから取り組むべき開発要素も明らかになってきた。本研究では、その中でも、ナノ構造形成技術による MLEA の高度化に注力することを計画した。

2. 研究の目的

本研究では、MLEA の溶液槽の大きさを制御する要素技術を確認し、X 線レーザーパルスが孤立した試料に命中する割合(ヒット率)を制御することと、本手法の究極的な目標である生体分子の単粒子イメージングに向けた MLEA デザインの改良を目的とした。

3. 研究の方法

(1) MLEA 溶液槽の大きさ制御

図 1(a)(b)に MLEA のデジタルカメラ写真と MLEA 断面の模式図を示した。MLEA は 500 を超える X 線入射窓が集積した 2 枚の Si/SiN チップを貼り合わせた構造となっている。各溶液槽の仕切りとして、片方の Si/SiN チップにエポキシ樹脂のグリッド構造をフォトリソグラフィ技術によって形成する。仕切りが形成された Si/SiN チップのデジタルマイクロスコープ像を図 1(c)に示す。本研究では、フォトレジストの種類やスピナーの回転数などの実験条件を変えながら、仕切りの作製を繰り返し、各条件における仕切りの高さを評価した。

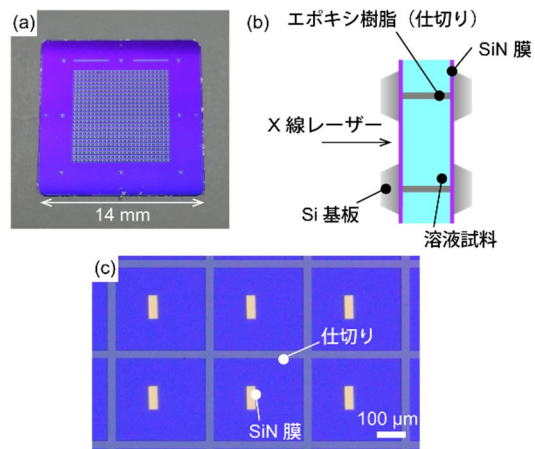


図 1. (a) MLEA のデジタルカメラ写真 (b)MLEA 断面の模式図 (c) エポキシ樹脂の仕切りを作製した Si/SiN チップのデジタルマイクロスコープ像

(2) 膜タンパク質観察に向けた新規 MLEA の設計と作製

X 線レーザーイメージングの究極的な目標の一つは、生体膜に埋め込まれた膜タンパク質の 3 次元観察である。溶液中にランダムに存在するのではなく、生体膜中の膜タンパク質のように、一方向に配向した粒子の 3 次元観察を PCXSS で実現するためには、試料保持機構である MLEA を入射 X 線に対して回転させる必要がある。しかしながら、現状のデザインでは MLEA を回転させると、入射 X 線と MLEA の Si 基板が干渉してしまい、試料の下流に配置した 2 次元検出器によって CXD パターンを取得することができない。そこで、最大 70°回転させても CXD パターンの測定が可能な新規 MLEA を設計・作製し、SACLA にて実証実験を行った。

4. 研究成果

(1) MLEA 溶液槽の大きさ制御

14 mm のチップ上で、仕切りの高さを 500 nm から数 10 μm まで制御できるフォトリソグラフィ作業工程を確立した。つまり、試料粒子濃度の調整が難しい場合であっても、仕切り高さを最適化した MLEA を作製・利用することで孤立粒子への高いヒット率が期待できる。Au ナノ粒子を利用した実証実験では、理論的な上限に近い 31% のヒット率を達成した³。本研究により、X 線レーザーイメージングにおいて一般的な試料導入法である液体ジェット方式⁶と比較して、MLEA は試料環境の柔軟性が高いことが示された。

(2) 膜タンパク質観察に向けた新規 MLEA の設計と作製

図 1 に示した標準型の MLEA では、それぞれの Si/SiN チップがもつ 20 μm×80 μm の SiN 膜をクロス型に貼り合わせるため、最終的な X 線入射窓

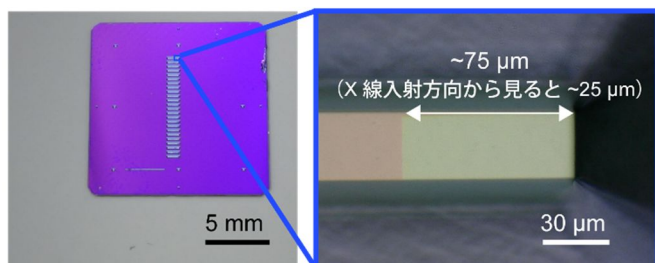


図 2. 斜入射用 MLEA のデジタルカメラ写真とデジタルマイクロスコープによる拡大像

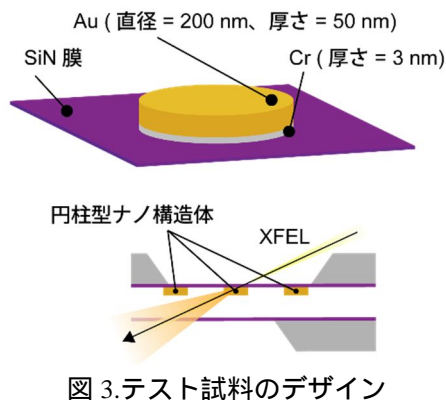


図 3.テスト試料のデザイン

改良することにより、図 2 に示すような斜入射用の MLEA を安定的に作製することに成功した。

次に、作製した斜入射用 MLEA を利用することで、実際に 70° の入射角で CXD パターンを取得できるか確かめるため、SACLA で PCXSS 測定を実施した。実証実験のため、図 3 に示すように、SiN 膜に電子線リソグラフィとスパッタ装置によって、Au の円柱型ナノ構造体を作製した。SiN 膜とナノ構造体の接着性向上のため、3 nm の Cr 層を SiN 膜にスパッタ蒸着した。ナノ構造体の直径は 200 nm、高さは 50 nm とした。MAXIC⁷ と呼ばれるイメージングチャンバ内には回転ステージがないため、今回は試料を 70° 傾けた状態で CXD 測定が可能な MLEA ホルダを利用した(図 4)。斜入射型 MLEA に作製されたナノ構造体に X 線レーザーを入射して得られた CXD パターンを図 5 に示す。Si 基板との干渉の影響は見られず、優れた S/N 比で試料由来の信号を取得できていることが分かる。位相回復計算を実行した結果、シミュレーションによって予想された観察像に良く一致する再構成像が得られた。さらに、Phase retrieval transfer function⁸ によって空間分解能を評価したところ、20 nm の空間分解能を有することが示された。この研究成果は、国際ワークショップ Coherence2018 にてアジア地域唯一の招待講演者として発表するとともに、2019PCCP HOT articles(王立化学会 Physical Chemistry Chemical Physics 誌) に選出された⁹。

のサイズは $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ となっている。この X 線入出射窓は、寄生散乱を除去するガードスリットとしての役目もあるため、X 線レーザーの入射方向から見た大きさは維持する必要がある。また、復元される試料像の空間分解能を 2 nm、MLEA の最大回転角を 70° とすると、SiN 膜の幅は、上流側の Si/SiN チップで $350\ \mu\text{m}$ 、下流側のそれで $880\ \mu\text{m}$ 程度必要であると見積もられた。このように、およそ一桁 SiN 膜を大きくする必要があるので、フォトリソグラフィによって、SiN 膜や仕切りを作製する工程で SiN 膜が破損する懸念があった。しかしながら、フォトリソグラフィ中のウェットプロセスにおける手技を

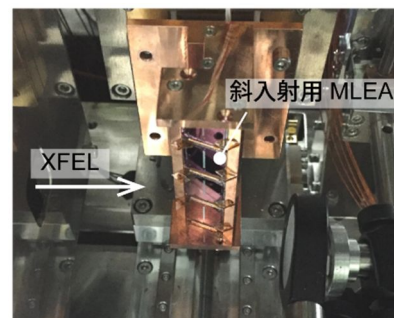


図 4.イメージングチャンバ内の様子

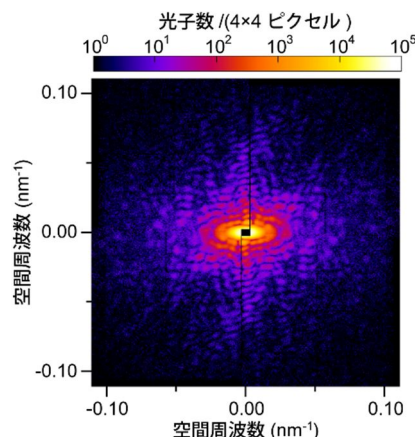


図 5.テスト試料からの CXD パターン (入射角 70°)

<引用文献>

1. R. Neutze, R. Wouts, D. van der Spoel, E. Weckert, and J. Hajdu, Nature, **406**, 752 (2000).
2. SACLA 利用研究成果 <http://xfel.riken.jp/research/indexnn.html>
3. T. Kimura, A. Suzuki *et al.*, Submitted.
4. T. Kimura, *et al.*, Nat. Commun., **5**, 3052 (2014).
5. J. Wei *et al.*, J. Am. Chem. Soc. **138**, 3274 (2016).
6. H. N. Chapman, Annu. Rev. Biochem. **88**, 35 (2019).
7. C. Song *et al.*, J. Appl. Crystallogr. **47**, 188 (2014).
8. H. N. Chapman *et al.*, J. Opt. Soc. Am. A **23**, 1179 (2006).
9. A. Suzuki *et al.*, Phys. Chem. Chem. Phys. **22**, 2622 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 西野吉則、木村隆志、鈴木明大、城地保昌、別所義隆	4. 巻 45
2. 論文標題 SACLAを用いた環境制御ナノイメージング	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 レーザー研究	6. 最初と最後の頁 508～512
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 西野吉則、鈴木明大、木村隆志、城地保昌、別所義隆	4. 巻 47
2. 論文標題 X線自由電子レーザーによる溶液試料のナノ観察	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 光学	6. 最初と最後の頁 413～417
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Koyama Takahisa, Yumoto Hirokatsu, Kimura Takashi, Suzuki Akihiro, Kameshima Takashi, Joti Yasumasa, Tono Kensuke, Tani Naoya, Tachibana Tatsuro, Konishi Yusuke, Bessho Yoshitaka, Nishino Yoshinori, Yabashi Makina, Ohashi Haruhiko	4. 巻 24
2. 論文標題 Development of Multilayer Focusing Mirror System for XFEL CDI Experiments of Biological Particles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microscopy and Microanalysis	6. 最初と最後の頁 294～295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/S1431927618013818	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Suzuki Akihiro, Kimura Takashi, Yang Ying, Niida Yoshiya, Nishioka Akiko, Tachibana Tatsuro, Takei Masashi, Tono Kensuke, Yabashi Makina, Ishikawa Tetsuya, Oshima Tairo, Bessho Yoshitaka, Joti Yasumasa, Nishino Yoshinori	4. 巻 22
2. 論文標題 Design of a liquid cell toward three-dimensional imaging of unidirectionally-aligned particles in solution using X-ray free-electron lasers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 2622～2628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C9CP03658J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Huang Chi-Feng, Chang Wei-Hau, Lee Ting-Kuo, Joti Yasumasa, Nishino Yoshinori, Kimura Takashi, Suzuki Akihiro, Bessho Yoshitaka, Liang Keng S. et al	4. 巻 10
2. 論文標題 XFEL coherent diffraction imaging for weakly scattering particles using heterodyne interference	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AIP Advances	6. 最初と最後の頁 055219 ~ 055219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5129406	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 西野 吉則, 鈴木 明大, 折笠 有基, 山重 寿夫	4. 巻 4
2. 論文標題 X線自由電子レーザーを用いた自動車用ナノマテリアルの無損傷イメージング	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊オプトロニクス	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Akihiro Suzuki, Tatsuro Tachibana, Naoya Tani, Yasumasa Joti, Yoshitaka Bessho, Takashi Kimura, Yoshinori Nishino
2. 発表標題 New design of environmental cells as a first step toward 3D imaging in solution by X-ray laser diffraction
3. 学会等名 International Conference on X-ray Optics and Applications (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木明大
2. 発表標題 X線レーザー回折による温度応答性ナノ粒子の溶液中イメージング
3. 学会等名 第五回アライアンス若手研究交流会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木明大
2. 発表標題 外部刺激応答性ナノ粒子のX線レーザーイメージング
3. 学会等名 第14回X線結像光学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木明大, 木村隆志, 飯田良, 三友秀之, 城地保昌, 別所義隆, 新倉謙一, 居城邦治, 西野吉則
2. 発表標題 X線レーザー回折による温度応答性金ナノ粒子の溶液中イメージング
3. 学会等名 第31回日本放射光学会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihiro Suzuki, Takashi Kimura, Ryo Iida, Hideyuki Mitomo, Yasumasa Joti, Yoshitaka Bessho, Ken-ichi Niikura, Kuniharu Ijiro, Yoshinori Nishino
2. 発表標題 Imaging thermoresponsive gold nanoparticles in solution by X-ray laser diffraction
3. 学会等名 International Conference on X-ray Optics and Applications 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihiro Suzuki, Takashi Kimura, Yoshimasa Joti, Yoshitaka Bessho, Yoshinori Nishino
2. 発表標題 Recent Advances in XFEL-Based Coherent Diffractive Imaging at SACLA
3. 学会等名 Coherence 2018: International Workshop on Phase Retrieval and Coherent Scattering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihiro SUZUKI
2. 発表標題 Higher-Resolution XFEL-Based Coherent Diffractive Imaging with Multilayer Focusing Mirror System
3. 学会等名 SACLA Users' Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木明大
2. 発表標題 X線レーザー回折による溶液中試料イメージング -高度化に向けた最新の取り組み-
3. 学会等名 レーザー学会「レーザーバイオ医療」技術専門委員会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木明大, 城地保昌, 別所義隆, 西野吉則
2. 発表標題 X線レーザー回折による溶液試料のナノ構造分析
3. 学会等名 日本放射光学会 第11回若手研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiro SUZUKI
2. 発表標題 Feasibility study on solution sample holding technique for XFEL based single-particle imaging
3. 学会等名 SACLA Users' Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木明大, 湯本博勝, 小山貴久, 城地保昌, 別所義隆, 登野健介, 矢橋牧名, 石川哲也, 大橋治彦, 西野吉則
2. 発表標題 1粒子XFELイメージングのための超低バックグラウンド溶液試料セル開発に向けて
3. 学会等名 第33回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木明大, 城地保昌, 別所義隆, 西野吉則
2. 発表標題 パルス状コヒーレントX線溶液散乱法の現状と高度化に向けた取り組み
3. 学会等名 第33回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----