

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05286

研究課題名(和文) グラフェン支持膜を用いた真空下での電子顕微鏡試料作製法に関する基盤技術の開発

研究課題名(英文) R&D on in vacuo molecular deposition method for facilitating EM specimen preparation with graphene sample carrier film

研究代表者

山下 真生 (Yamashita, Masao)

大阪大学・大学院生命機能研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号：10727639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はグラフェン支持膜を利用した真空中での新規の電子顕微鏡試料作製法の確立を目的に研究を開始した。この研究における最重要課題はエレクトロスプレーイオン化法(以下ESI法)による生体高分子気相イオンの生成法を確立することであったが、この目的は新規のエレクトロスプレーエミッターを開発することで概ね達成できたと考えている。一方、本研究の最終的な目標である真空中での分子蒸着法の確立については、当初想定していなかった多数の技術的な課題の存在が研究初期に明らかとなり、結果研究期間中に十分な検討を実施することができなかった。本報告書では上記の理由から新規エミッターの技術開発の成果に絞って報告する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体高分子の高分解能一分子イメージングをSEMやTEMによる低エネルギー顕微鏡法やAFMのようなプローブ顕微鏡法によって達成するためには、目的分子と溶媒との効率的な分離を目的分子の分子構造を損なうことなく達成できることが重要である。ESI法はこの目的の達成において極めて重要な技術であるが、巨大タンパク質複合体やウイルスといった高塩濃度且つ高粘性の試料への適用はこれまで困難であった。本研究ではこの技術的課題を克服できる新規のESIエミッターキャピラリーのデザインを考案しその有効性を示した。この成果により、一分子イメージング用の試料作製法の選択肢としてのESI法の価値が大きく向上したと考えている。

研究成果の概要(英文)：This project aims to develop a new in-vacuo specimen preparation method for single biomolecular imaging by electron microscopy especially for those performed with a graphene specimen carrier film. Realization of this goal depends critically on a successful development of a versatile sample gasification technology, and we were able to achieve a good progress in this aspect through a successful development of a new electrospray ionization (ESI) system. Despite this progress, our effort on establishing the in-vacuo specimen preparation system failed to make satisfactory progress during this project period. This was due to the problem of poor ion injection efficiency into the vacuum system, which severely limited the experiment with the ions under the vacuum condition. This problem was not expected at the project planning phase but became clear at an early stage of this project. For this reason, we mostly focus on the ESI technology development work in this report.

研究分野：走査電子顕微鏡

キーワード：エレクトロスプレーイオン化 一分子イメージング 低エネルギー電子顕微鏡法 グラフェン

1. 研究開始当初の背景

(1) グラフェンは電子顕微鏡の試料支持膜として最も理想的な物性を有しているが、この物性は大気中での分子吸着による”汚染”により失われる。従って、グラフェン支持膜を使用する電子顕微鏡試料作製は真空中で行う必要がある。

(2) 真空中で試料作製を行うには、観察試料(ここでは生体高分子を想定)をガス状にして真空システムに導入しなければならない。エレクトロスプレーイオン化法(ESI法)がこの目的に利用できる可能性があるが、生体高分子溶液への適用例が極めて少ないためその可能性は未知数であった。

2. 研究の目的

(1) タンパク質複合体やDNAなどの30-200 nmサイズのナノ粒子水溶液に対するESI法の適用の可否について、特にガス化時の試料構造への影響に注目して科学的知見を収集すること。

(2) ESI法を利用した真空中での電子顕微鏡試料作製技術を確立すること。(真空装置中に十分な量のイオンを導入することができなかつたため本研究期間中での検討は断念。)

3. 研究の方法

(1) ガラスキャピラリーを加工してESIエミッターを自作し、生体高分子溶液中での使用に最適な先端径、先端形状を探索した。

(2) 図1の構成の装置を使用してESI法の試験を実施した。コレクタ電極上に電子顕微鏡グリッドを配置して生成した気相分子イオンを捕捉(この手法を本報告書ではElectroSpray Deposition (ESD)法と呼ぶことにする)し、そのグリッドをそのまま無染色で電子顕微鏡観察に供することで分子イオンの構造評価を行った。

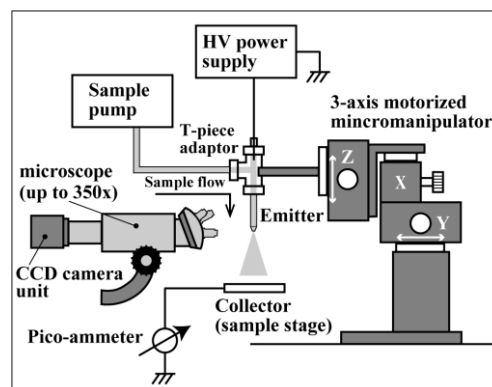


図1 本実験で使用した ESI 法の試験装置

4. 研究成果

(1) 新型ESIキャピラリーの開発

図2及び図3に従来型のESIエミッターキャピラリーの先端部のデザインを示した。本研究の初期には先端径を2 μm まで細径化した図2aのようなキャピラリーの作製法を確立し、低粘度の試料溶液から良好なスプレー結果が得られることを確認した(図2b、

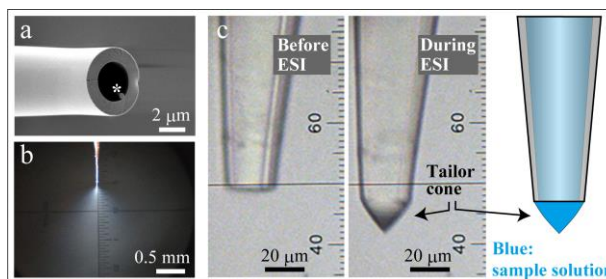


図2 ESI エミッター(従来型、自作)

試料: Auコロイド(粒子径30 nm)、溶媒: 2%(v/v) 2-プロパノール水溶液)。しかし、この細径化したキャピラリーに高粘度の生体高分子溶液を通すには非常に高い送液圧力が必要であり、また細い流路は非常に目詰まりを起こし易く不安定であったことからこのキャピラリーの使用は断念せざるを得なかった。一方、先端径を少し広げて20 μm とした図2cのようなキャピラリーや10 μm の先端径を持つ市販のキャピラリー(図3a)では上記の問題は回避できたが今度は生体高分子溶液を完全に分散させることができず、図3bに示すような不完全なスプレー結果しか得られなかった。図3bの実験ではリゾチーム溶液(濃度: 1 μM 、溶媒10 mM 酢酸アンモニウム)を使用している。これらのキャピラリーではキャピラリー先端部のTailor cone(図2c、3a参照)の体積が大きく、高粘度の試料溶液を完全分散させられるレベルまで先端部溶液中の電荷密度を高められなかったことが不完全分散の原因であったと考えられる。ESIの印加電圧を増加させてこれを補うことはある程度まで可能ではあるが、電圧が高すぎるとキャピラリー先端で図6の挿入イメージに示すようなコロナ放電が発生し試料ダメージが発生する。図3cには図3bの実験において観察されたESI電圧とイオン電流の関係を示しているが、この実験では負イオンモードで1.2 kV以上の電圧を印加するとコロナ放電が発生しイオン電流の急激な低下が観察された。図3bのイメージはこの限界電圧時のスプレーの状態を示しているが、まだ完全分散は達成できていないことが分かる。このように、既存のESIキャピラリーでは本研究の目的の達成が困難であったため、新型のキャピラリーの開発を進めることにした。図4に我々がプローブチップ型と名付けた新型のキャピラリーのデザインを示した。図4aがその先端部の電子顕微鏡イメージ、図4bは高流速設定でスプレーを顕在化させた時のその形状を示している。このキャ

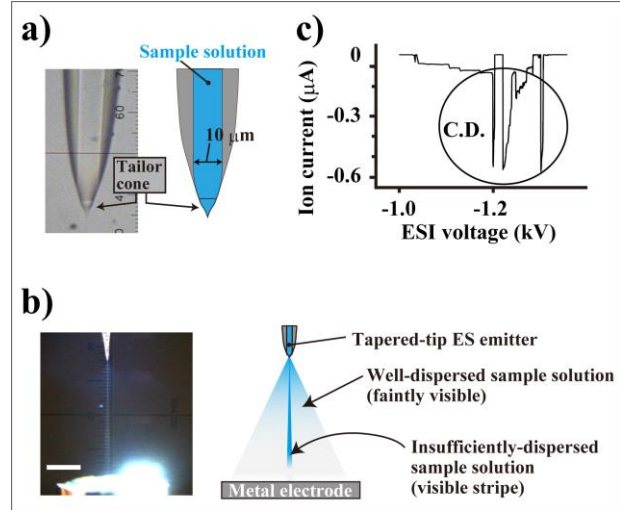


図3 ESI エミッター(従来型、市販品)

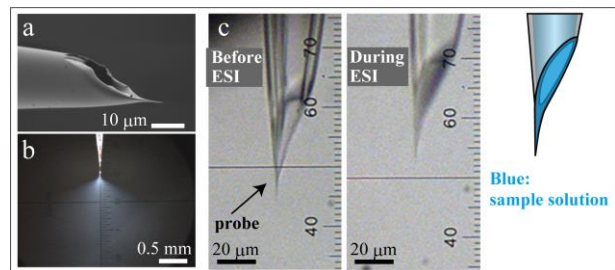


図4 Probe-tip ESI エミッター(新型、自作)

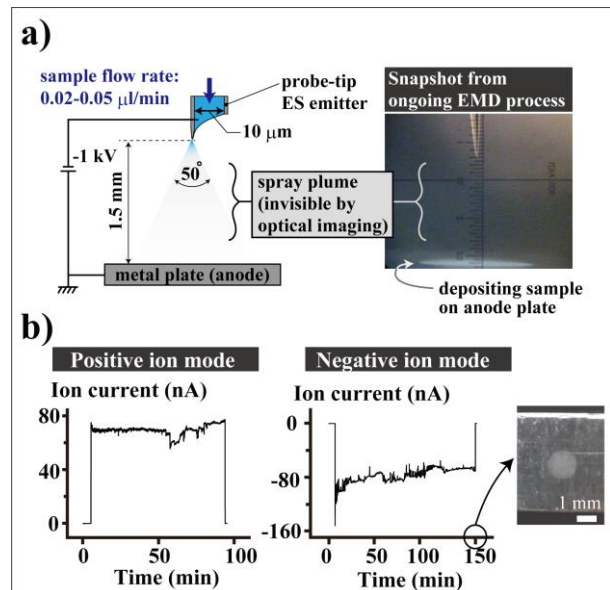


図5 Probe-tip ESI エミッターの性能

ピラリイの特徴は1)先端がベベル型の形状をしており、且つ先端径が20 μm 程度に設計されているため目詰まりが起きにくい設計であること、2)キャピラリイ先端の試料溶液が先端部のスパイクに集約されるため(図4c)Tailor coneのサイズが極めて小さくなり、結果試料溶液の電荷密度を完全分散が可能なレベルにまで高められること、の二点である。このキャピラリイを使用して図5aの条件で先ほどと同じリ

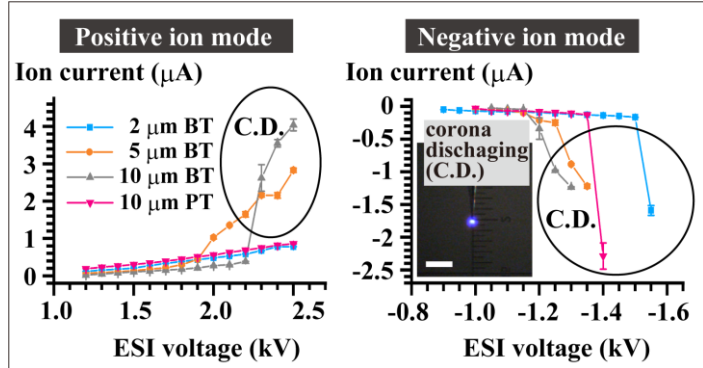


図6 ESI エミッターのコロナ放電特性

ゾチーム溶液のエレクトロスプレーを行うと図5bに示すように正負両イオンモードにおいて安定なイオン電流が確認できた。非常に流速が低く且つ試料溶液が高度に分散されているためスプレーの形状は直接確認できないが(図5a)、150分間コレクタ電極に対してスプレーを行うと、デポジションされたリゾチームがスポットとして確認できる(図5b挿入図)。更に新型キャピラリイでは上述したコロナ放電が従来型のキャピラリイと比較して起こりにくいことが確認された(図6)。図6は従来型(BluntTip(BT))と新型(ProbeTip(PT))のキャピラリイを用いて正負イオンモードにおけるESI電圧とイオン電流の関係を示したものである。図のC.D.はコロナ放電の意味で、先端径の大きいBT型のキャピラリイではコロナ放電が起きやすく、同等の先端径を持つPT型ではコロナ放電に対してより耐性があることが分かる。

(2) 新型ESIキャピラリイを用いて生成した生体高分子イオンの構造観察

図7にはミミズの血液から調製したエリスロクオリンタンパク質複合体試料での実験結果をまとめている。図7aはESD法で電子顕微鏡試料グリッドにデポジションした分子イオンの無染色透過電子顕微鏡像(挿入図:粒

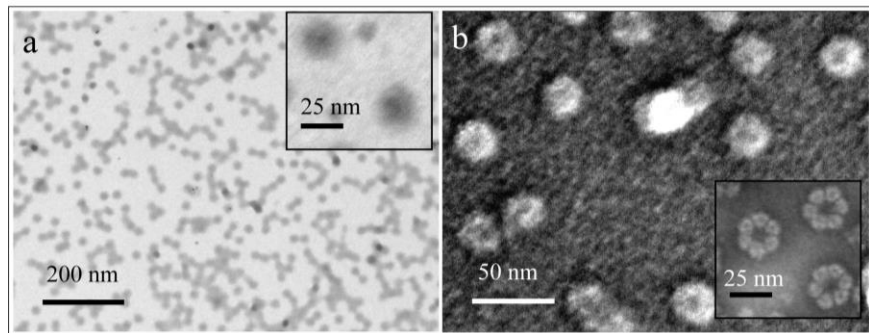


図7 蛋白質複合体(エリスロクオリン)イオンの電子顕微鏡観察結果

子の拡大図)、図7bは図7aのグリッドに白金蒸着を行った試料の走査電子顕微鏡像である(挿入図:試料の負染色透過電子顕微鏡像)。図7bからは挿入図との比較によりこの複合体の分子構造がイオン化後も少なくとも四次構造のレベルまではよく保存されていることが明確に確認できる。図7aの粒子像は明瞭性に欠けるが、これは分子表面に強く結合している溶媒分子が大気中でのデポジションではまだ完全には除けていないことが原因ではないかと考えている。

図8にはプラスミドDNA(pUC19)試料での実験結果をまとめている。図8aはこの実験で使用した

DNAの電気泳動結果(M: 分子量マーカー、1:制限酵素(HindIII)処理あり、2:制限酵素処理なし)、図8bはESD法で電子顕微鏡試料グリッドにデポジションしたDNA分子イオンの無染色透過電子顕微鏡像、図8cはESD法で酸化グラフェングリッドにデポジションしたDNA分子イオンの無染色透過電子顕微鏡像、図8dは図8cに示した赤線上のイメージ

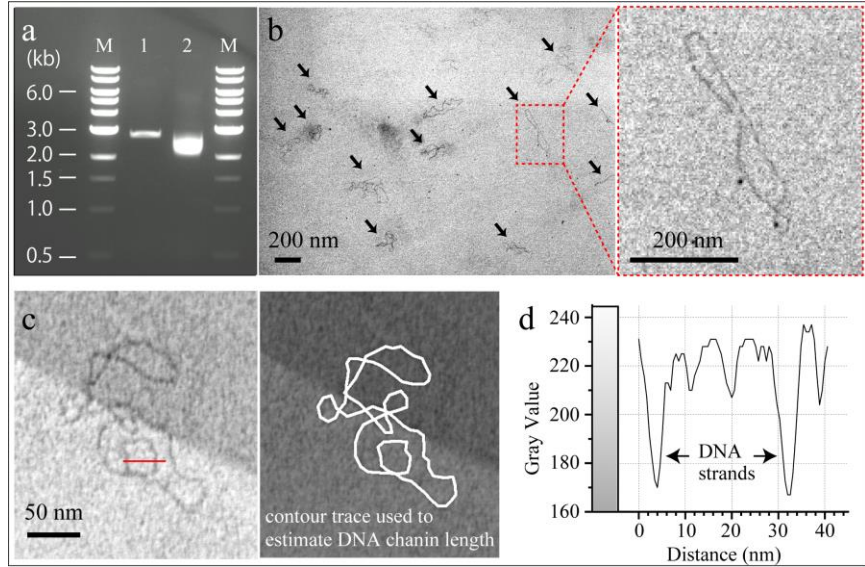


図8 DNA イオンの電子顕微鏡観察結果

ピクセルの値をプロットしDNA鎖の幅を調べたものである。図8cのDNAの鎖長を同図右に示したトレースに基づいて測定した結果は964 nmであったが、これは(トレースの誤差を考慮すると)理論値である913 nmとよく一致していた。また図8dから決定したDNAイオンの鎖の幅は3 nmであったがこれも理論値である2 nmとよく一致していた。これらの結果からDNA分子は断片化を起こすことなくイオン化可能であることが確認された。

最後に生体膜断片を用いた実験結果を図9に示す。図9a及び図9bはESD法で電子顕微鏡試料グリッドにデポジションした生体膜断片の分子イオンの無染色走査電子顕微鏡像を示している。図9aは低倍率像、図9bは高倍率像である。生体膜の表面は多数の膜タンパク質に覆われているが、図9bではそれに良く合致する顕微鏡像が得られている。

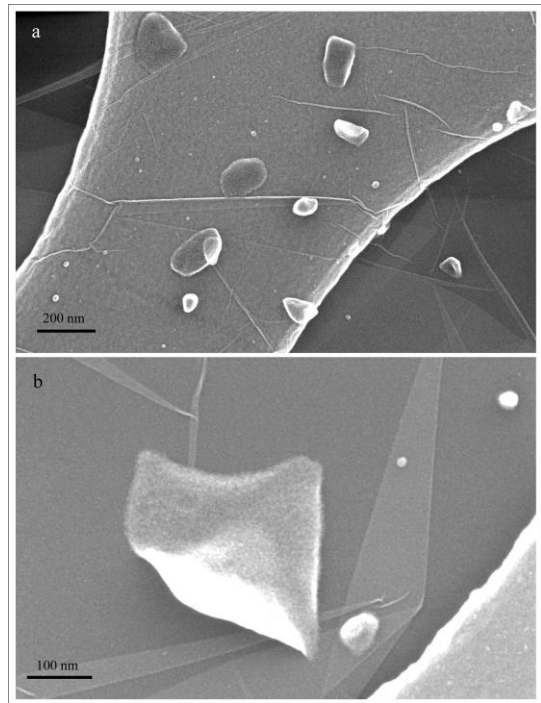


図9 生体膜断片での実験結果

以上の結果から、新型エミッターキャピラリーを用いたESI法は様々な生体高分子に対して適用可能であることが本実験において確認できた。生成した気相分子イオンのナノ構造は無染色の状態でも電子顕微鏡でかなり明瞭に確認できたことから、大気中のESDで作製した顕微鏡試料であっても研究計画調書の”研究目的”の項で述べた理想の試料形状にかなり近づけることができたのではないかと感じている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hidehito Adaniya, Martin Cheung, Masao Yamashita, Seita Taba, Cathal Cassidy, Tsumoru Shintake	4. 巻 dfac056
2. 論文標題 Low-energy scanning transmission electron microscopy applied to ice-embedded biological macromolecules	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 1 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfac056	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masao Yamashita
2. 発表標題 Scanning electron microscopy on electrospray-generated biomolecular ions
3. 学会等名 The 77th Annual Meeting of The Japanese Society of Microscopy
4. 発表年 2021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
研究分担者	安谷屋 秀仁 (Adaniya Hidehito) (00868721)	沖縄科学技術大学院大学・量子波光学顕微鏡ユニット・技術員 (38005)	
研究分担者	CHEUNG Martin (Cheung Martin) (90832163)	沖縄科学技術大学院大学・量子波光学顕微鏡ユニット・技術員 (38005)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------