

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02440

研究課題名(和文)パルス電子顕微鏡による生体分子動態の直接観察

研究課題名(英文)Direct observation of biomolecular dynamics by a pulsed electron microscope

研究代表者

成田 哲博(Narita, Akihiro)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：30360613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：パルス電子顕微鏡による非凍結溶液構造動態の高分解能観察を行うための溶液セルの改良と、それを用いた通常電子顕微鏡による観察を行った。いままで開発してきた溶液セルに金の60 nm厚のスペーサー、中央部に液だめを導入。これらにより、溶液観察の安定性が格段に向上した。また、観察窓に従来使われてきた窒化ケイ素の代わりに窒化炭素を用いたものも作製。窒化ケイ素で見られた非特異的な吸着を大幅に抑えることに成功した。これらの溶液セルを用いて、エマルジョン内の脂質液滴の融合や高速でブラウン運動する金コロイドを撮影することに成功した。安定した温度コントロールの方法も開発できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究期間では、残念ながら新世代パルス電子顕微鏡の立ち上げは間に合わなかったが、溶液セルの開発、観察条件の検討としては十分な成果が得られた。新世代のパルス電子銃の開発は終わっており、私たちのグループも加わって透過型電子顕微鏡への搭載を加速している。本研究の成果と新世代パルス電子顕微鏡を組み合わせることで、nmオーダーの分解能で溶液中の分子、リボソーム、エマルジョンなどの溶液構造をリアルタイムで捉えることができる。これは医学、薬学、農学、生物学、食品、化粧品など広い分野にまったく新しい知見をもたらすだろう。

研究成果の概要(英文)：Improvements were made to the liquid cell for high-resolution observation of solution structure dynamics using pulse electron microscopy, and observations were conducted with a conventional electron microscope using this cell. A 60 nm thick gold spacer and a liquid reservoir in the center were introduced into the liquid cell. These modifications significantly enhanced the stability of solution observations. Additionally, a new liquid cell using carbon nitride instead of the traditionally used silicon nitride for the observation window was developed. This change greatly reduced non-specific adsorption observed with silicon nitride. Using these liquid cells, we successfully captured the fusion of lipid droplets in emulsions and the rapid Brownian motion of gold colloids. We also developed a method for stable temperature control.

研究分野：生物物理学

キーワード：電子顕微鏡 その場観察 溶液動態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

透過型電子顕微鏡(TEM)はその分解能の高さから広く重要な役割を果たしているが、溶液中の分子やリポソーム、エマルジョンなどの溶液構造を非凍結で高分解能動態観察した例はほとんどない。溶液中の分子はブラウン運動で動いており、たとえば、直径 100 nm のリポソームは純水中では 1μ 秒でブラウン運動によって約 3 nm 動く。3 nm のぶれであれば、厚さ 6-8 nm の脂質二重膜構造を十分観察できるが、そのためには露光時間を 1μ 秒に抑えなければならない。これを可能にする高速カメラはまだ存在しない。

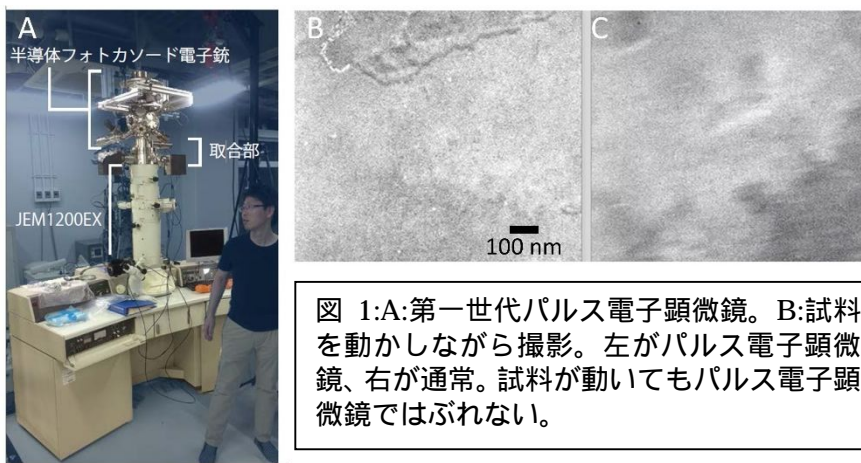


図 1:A:第一世代パルス電子顕微鏡。B:試料を動かしながら撮影。左がパルス電子顕微鏡、右が通常。試料が動いてもパルス電子顕微鏡ではぶれない。

また、溶液はダメージに弱く、もし露光時間 1μ 秒の高速カメラがあっても、 1μ 秒で像を結ぶような強い電子線を当て続けられれば溶液はすぐに沸騰してしまう。ごく短い間だけ強い電子線をパルス状に出すことが出来れば、ストロボ撮影のようにこのような溶液構造を電子顕微鏡分解能で捉えることができる。パルスの間隔を空けることで、ダメージも任意に抑えることができる。半導体フォトカソードは光を当てると電子が放出される半導体であり、これとパルスレーザーを組み合わせることで、パルス電子銃を作ることができる。私たちはこのパルス電子顕微鏡を Photo electron soul 社と共同研究している。第一世代のフォトカソード電子銃を搭載した電子顕微鏡によって、実際に半導体フォトカソード電子銃で像を結ぶこと、パルスレーザーを用いた励起でパルス電子を出せること、それによって、動いている物体をぶれなく撮影できることを実証した(図 1)。実用的な加速電圧と電子線量を持つ第二世代パルス電子顕微鏡は photo electron soul 社にて現在開発中である。

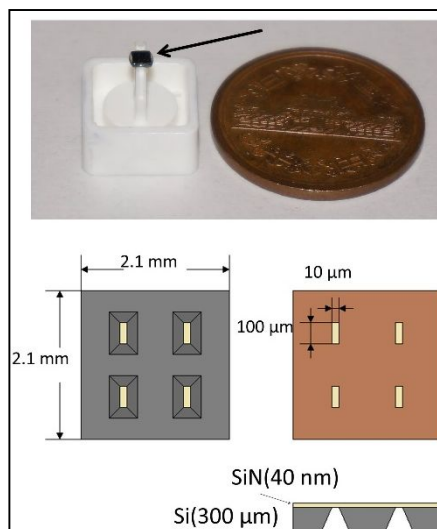


図 2:上:私達が以前開発した溶液ホルダ(矢印)。下:材料となるチップ。これを二枚貼り合わせて作製する。

一方で、電子顕微鏡で溶液構造を観察するには、溶液を薄いセルの中に閉じ込めなくてはならない(溶液セル)。このセルは電子顕微鏡鏡筒の真空中にさらす必要があり、様々な要件を満たさなくてはならない。私たちは

第二世代パルス電子顕微鏡で溶液構造を高分解能観察するための溶液セルを開発してきたのだが(図 2)、蛋白質の非特異的な貼り付きや、気泡の発生による観察窓の割れ、変形などの問題が生じていた。また溶液の厚さが一定せず、作製の歩留まりが悪かった。本研究ではこれを改良し、実際に溶液構造を観察することを目的とした。

2. 研究の目的

溶液セルの改良とそれを用いた溶液構造の観察。実用的な第二世代パルス電子顕微鏡が立ち上がれば、それを用いて溶液内分子動態の高分解能開発を行う。

3. 研究の方法

本研究では以下のことを行った。1:溶液セルへのスペーサーと液だめの導入。2:窒化シリコンに代えて、窒化炭素窓を使用した溶液セルの開発。3:エマルジョンや金コロイド、蛋白質などの観察。4:溶液温度コントロール手法の開発。本研究は開発内容と結果

が強く関連しているため、研究成果の項で結果とあわせてそれぞれを説明する。

4. 研究成果

まず、溶液セルにいくつかの改良を施した(図3)。金の蒸着による厚さ60nmスペーサーを導入、これにより、溶液の厚さが安定した。また、中央部に液だめを作り、これによりビームのダメージによる気泡の発生や圧力の変化を抑えられた。これはおそらくビームダメージによる温度の急速な上昇が抑えられるようになったからである。一方で観察窓への蛋白質の非特異的な吸着が観察された。観察窓は窒化シリコン(SiN)であり、先行研究の溶液セルは全てこれを用いていた。この吸着は溶液のイオン強度を高くすることによって抑えられることがわかり、おそらく電子照射にともなうSiNのチャージアップによるものだと思われる。そこで、電気伝導度が高い窒化炭素を代わりに観察窓に使うことでチャージアップを抑えることを試みた。窒化炭素の溶液セルはいままで例がないが、実際に吸着が大幅に抑えられた。これにより、自由な三次元運動の観察が可能になる。

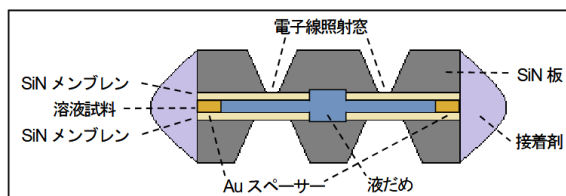


図3: 現行の溶液セル。液だめとスペーサーにより、観察の安定性が向上した。SiNの代わりにSiCを用いたものも作製している。

これらの溶液セルと、通常の熱電子型電子顕微鏡を用いて、エマルジョン内の脂質液滴が融合する様子や、金コロイドが高速でブラウン運動する様子などを捉えることができた(図4)。製作の歩留まりも8

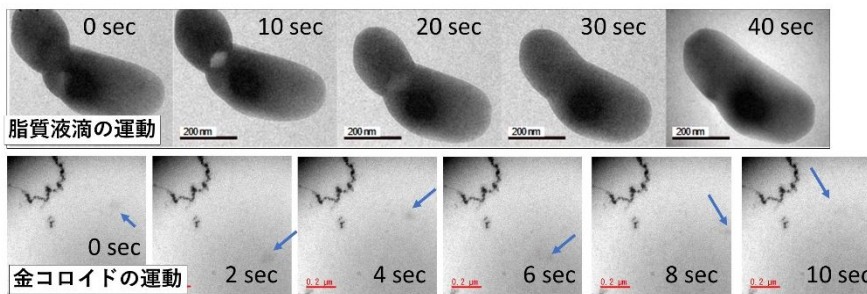


図4: 通常電子顕微鏡による溶液セル観察例。上:エマルジョン内の脂質液滴の融合。下:20nm径の金コロイドのブラウン運動。激しく動いているためぶれている。動かない黒いパターンは窓に吸着した汚れ。100 msec/frame。スケールバー200 nm。

割を達成し、十分実用的である。また、将来のパルス電子顕微鏡による観察に備え、クライオ観察用のサイドエントリーホルダとドライアイス粉末(通常は液体窒素を用いる)、ヒーターを組み合わせることによって、0度から40度まで自由に温度をコントロールすることにも成功。温度のコントロールによって反応や動態を制御できるようになった。

溶液セルはほぼ完成したと考えているが、残念ながら photo electron soul 社によるパルス電子顕微鏡の立ち上げは諸般の事情により遅れており、研究期間内には間に合わなかった。現在私たちのグループの学生も立ち上げに加わり、これを加速している。パルス電子顕微鏡に搭載する電子銃は完成しており、0.2マイクロ秒のパルス一回で電子顕微鏡写真を撮影するのに十分な電子線パルスを実際に放出した(図5)。本研究で完成した溶液セルと組み合わせることで、近いうちに必ず実際に高分解能溶液観察をすることができると考えている。

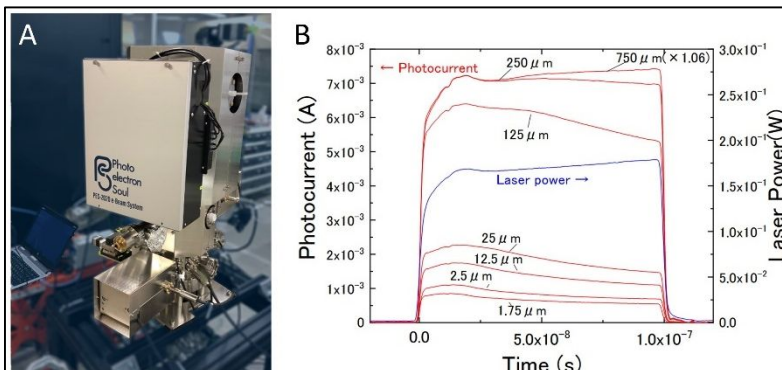


図5:A:第二世代フォトカソード電子銃。B: 0.1μ秒パルスで放出される電子量。2.5μm径の励起で、1mA以上を達成。これは0.1μ秒で0.1nC以上の電子を放出しているという意味である(Sato et al., J. Vac. Sci Technol, B, 064204)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 片山稜也, 山崎岳, 松本友治, 成田哲博
2. 発表標題 パルス電子顕微鏡のための液中試料観察法の開発
3. 学会等名 2023年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 成田哲博
2. 発表標題 タンパク質を見る方法 - クライオ法、負染法からの情報抽出 -
3. 学会等名 2021年度日本顕微鏡学会ソフトマテリアル研究会講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎岳, 松本友治, 成田哲博
2. 発表標題 パルス電子顕微鏡による蛋白質の液中観察に向けて
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 成田哲博
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡による細胞骨格構造解析
3. 学会等名 第6回TRSシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 成田哲博
2. 発表標題 パルス電子顕微鏡がもたらす生物学の革命
3. 学会等名 次世代真空エレクトロニクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 成田哲博
2. 発表標題 アクチン線維において顕在化する時空アロステリー
3. 学会等名 日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 成田哲博
2. 発表標題 細胞骨格構造解析と時空アロステリー
3. 学会等名 細胞生理学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片山稜也、山崎岳、松本友治、成田哲博
2. 発表標題 パルス電子顕微鏡のための液中試料観察法の開発
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 片山稜也、山崎岳、松本友治、成田哲博
2. 発表標題 パルス電子顕微鏡のための液中試料観察法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 片山稜也、山崎岳、松本友治、成田哲博
2. 発表標題 Development of the Liquid Sample Observation Method for Pulse Electron Microscopy
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 片山稜也、山崎岳、松本友治、成田哲博
2. 発表標題 パルス電子顕微鏡のための液中試料観察法の開発
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 片山稜也、山崎岳、松本友治、成田哲博
2. 発表標題 パルス電子顕微鏡のための液中試料観察法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本薬学会第143年会学生優秀発表賞（ポスター発表の部）

--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------