

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号： 11301
研究種目： 奨励研究
研究期間： 2023 ~ 2023
課題番号： 23H05219
研究課題名 クライオ電子顕微鏡による多様な材料分析を可能とする有機溶媒急速凍結法の確立

研究代表者

海原 大輔 (Unabara, Daisuke)

東北大学・多元物質科学研究所・技術一般職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000 円

研究成果の概要：有機溶媒試料の凍結において、レース状グリッドを用いることで高効率かつ再現良く凍結膜が形成出来ることが分かった。凍結膜の形成効率、有機溶媒と支持膜の親和性、支持膜上に空いた孔の大きさ・形状等に大きく左右されることが示唆された。検討に用いたいくつかの有機溶媒について、寒剤として液体エタンを用いた場合には凍結膜の形成・維持が困難であったが、液体窒素を用いることで凍結可能な条件を見出すことが出来た。金ナノ粒子を分散させたメタノールの凍結グリッドを作製し、トモグラフィー測定についても検討を行った。得られた傾斜像から、三次元再構成を行い、粒子間距離や凍結膜厚等を評価可能であることを示すことが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、有機溶媒試料の凍結に適したグリッドや寒剤、凍結条件を見出し、実際に、金ナノ粒子が分散した試料溶液のクライオ電子顕微鏡観察が可能であることを実証した。クライオ電子顕微鏡法では水溶液試料を用いることが一般的であるが、本研究成果によって、有機溶媒試料へも適用範囲が広がり、生命科学のみならず、材料科学研究への応用が可能となる。特に、従来観察困難であった樹脂、油脂、塗料・インク等、広範な液体材料のクライオ電子顕微鏡による構造観察が可能となり、材料研究の飛躍が期待される。

研究分野： 機器分析化学

キーワード： クライオ電子顕微鏡 有機溶媒 トモグラフィー

1. 研究の目的

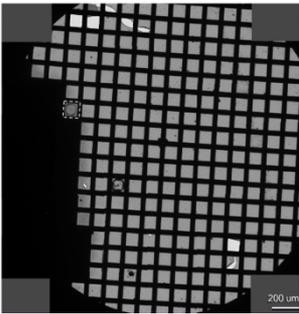
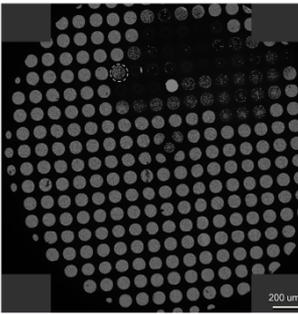
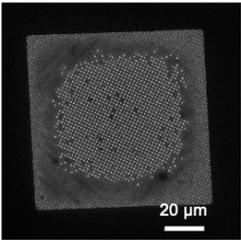
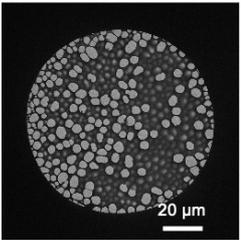
クライオ電子顕微鏡法において、タンパク質等の生体分子試料の観察には水溶液が用いられるのが一般的であり、試料急速凍結装置を使用して、試料支持膜の孔に薄い非晶質の氷を張ったグリッドを再現良く作製することができる。一方、生体分子以外の材料は非水溶性の試料も多く、その溶解・分散には有機溶媒が多用されるが、有機溶媒試料の急速凍結、観察例は限定的である。様々な有機溶媒試料の急速凍結法を確立することによって、従来観察困難であった樹脂、油脂、塗料・インク等、広範な液体材料のクライオ電子顕微鏡による観察が可能となり、材料研究の飛躍が期待される。本研究では、クライオ電子顕微鏡による多様な有機溶媒試料の観察を目的とし、凍結グリッド作製およびクライオ電子顕微鏡観察の検討を行った。

2. 研究成果

試料として、種々の有機溶媒（トルエン、メタノール、エタノール等）を用いた。カーボン支持膜上に規則的に多数の孔が空いたグリッド（Quantifoil 膜穴グリッド）、または、修飾セルロース支持膜から成るレース状グリッドに試料溶液を展開し、試料凍結装置（EM GP2, Leica）を用いて、凍結条件の検討を行った。得られた凍結グリッドは、クライオ電子顕微鏡（CRYO ARM 300 II, JEOL）へ装填し、電子直接検出カメラ（K3, AMETEK Gatan）を用いて、有機溶媒凍結膜の形成効率とその状態について観察・評価を行った。

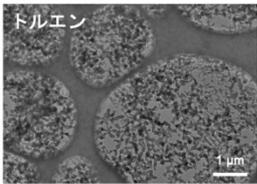
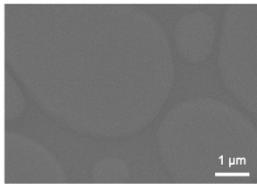
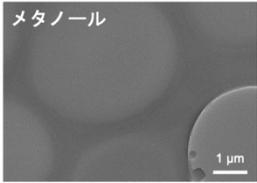
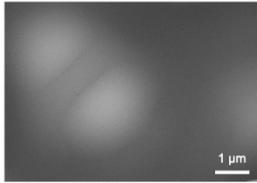
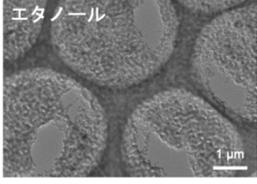
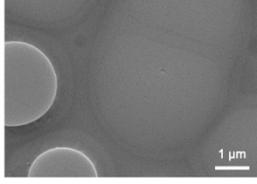
Quantifoil 膜穴グリッドを用い、試料凍結条件を検討したところ、凍結膜の形成は低効率であり、再現性も乏しかった（表1）。一方、レース状グリッドを用いると、高効率かつ再現良く凍結膜が形成されることが分かった。凍結膜の形成効率は、有機溶媒と支持膜の親和性、支持膜上に空いた孔の大きさ・形状等に大きく左右されることが示唆された。

表1. グリッド検討の結果（試料：トルエン）

倍率\グリッド	Quantifoil 膜穴グリッド (カーボン支持膜)	レース状グリッド (修飾セルロース支持膜)
50 倍		
150 倍		

液体エタンを寒剤として用いた場合、検討に用いたいくつかの有機溶媒において、凍結膜の形成・維持が困難であった（表2）。これは、凍結膜が液体エタンに溶解するためと考えられた。そこで、液体窒素を用いて試料凍結を試みたところ、凍結可能な条件を見出すことが出来た。

表 2. 寒剤検討の結果 (4,000 倍、試料：トルエン、メタノール、エタノール)

液体エタン	液体窒素
 <p>トルエン</p>	
 <p>メタノール</p>	
 <p>エタノール</p>	

金ナノ粒子を分散させたメタノールの凍結グリッドを作製し、トモグラフィー測定についても検討を行った (図 1, 2)。得られた傾斜像について、三次元再構成を行うことで、投影像からは解析出来ない粒子間距離や凍結膜厚等を評価可能であることを示すことが出来た。有機溶媒中の様々な材料への適用も可能と考えられ、産業応用も期待される。

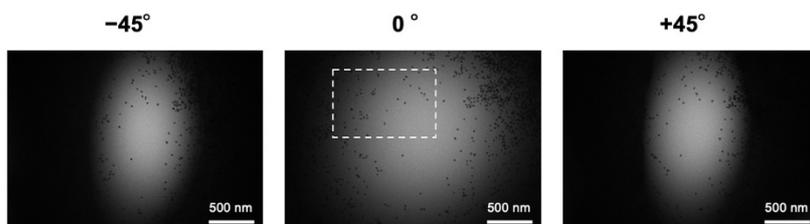


図 1. 有機溶媒試料の傾斜像 (10,000 倍、 -45° , 0° , $+45^\circ$)

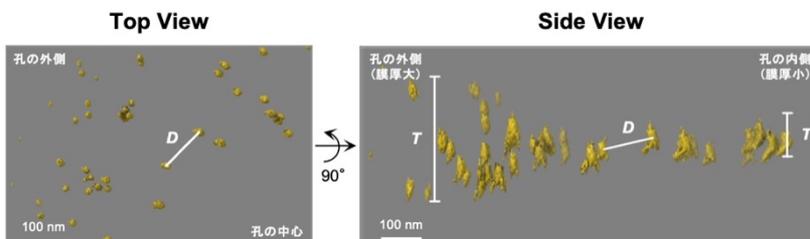


図 2. 三次元再構成の結果

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 海原大輔、瀧口祐、米倉功治
2. 発表標題 多様な液体材料観察を可能とするクライオEM試料作製法の検討とトモグラフィー解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第66回シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 海原大輔、瀧口祐、米倉功治
2. 発表標題 多様な液体材料観察を可能とするクライオEM試料作製法の検討とトモグラフィー解析
3. 学会等名 第23回東北大学多元物質科学研究所研究発表会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
瀧口 祐	(Hamaguchi Tasuku)
米倉 功治	(Yonekura Koji)