

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656038

研究課題名(和文) グラフェン薄膜を利用した走査型電子顕微鏡用の大気圧環境観察用セルの開発

研究課題名(英文) Development of environmental cell with graphene thin film for scanning electron microscope.

研究代表者

小川 直樹 (OGAWA, Naoki)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：50415113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は炭素薄膜、グラフェンを用い、走査電子顕微鏡の大気圧環境観察用セルを開発し、1分子計測技術(DET)に応用することを目的とした。DETはタンパク質等、生体高分子の生の状態での運動を1分子単位で計測する方法で、今後、創薬を始めとした様々な分野で応用が期待される。本研究により、グラフェンをエッチングにより単離し、観察用セルの窓に貼り付ける技術を確立した。これは薄膜を壊さず扱う上で大きな技術進歩である。また、研究期間中DET技術を大幅に向上させることに成功し、好熱性古細菌由来のシャペロニンタンパク質の運動を1分子レベルで、3次元的に計測することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop the environmental cell using graphene thin film. The environmental cell is for use in a scanning electron microscope and adapted for the diffracted electron trafficking (DET), one of the single molecular observing methods. DET can apply for biological molecule in physiological condition, and it will be used for drug development and a lot of other scientific fields. In this project, we established the techniques of isolation of the graphene thin film by etching and attached the window of the environmental cell. These techniques are a progress of treating thin film with intact. We succeeded to advance of DET and observed rotated motion of chaperonin protein from thermophilic archaea with single molecular level.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎・薄膜・表面界面物性

キーワード：炭素薄膜 1分子計測 走査電子顕微鏡 電子線後方散乱回折法 3次元運動計測 シャペロニン

1. 研究開始当初の背景

生物における生命反応を理解する上で究極的となる計測は、個々の分子の挙動を逐一、追跡、観察し、他の分子との相互作用、自身の変化、それに伴う生理的な影響を理解することと考えられる。現在これらすべてを適える計測法は存在しないが、一つの分子の運動を計測することのできる技術は蛍光、小角散乱、NMR 等、開発が進められている。我々は X 線を用いた 1 分子計測法である (Diffracted X-ray Tracking) DXT を開発してきた。ただ、DXT では高輝度の X 線源が必要であり、大型放射光施設の利用が必要であった。そこで、我々はコンパクトな装置での計測をめざし、X 線源の代わりに市販の走査電子顕微鏡の電子線を利用した (Diffracted Electron Tracking) DET を開発している。本研究は DET に用いる炭素薄膜を高品質のグラフェン薄膜に置き換えることで、電子線のエネルギー損失を大幅低減し、タンパク質を始めとする 1 分子に応用できる方法を確立することを目指した。

2. 研究の目的

本研究はわずか数原子の厚さの極薄カーボンシートである高品質のグラフェンを利用し、電界放出形走査電子顕微鏡用の大気圧環境観察用試料セルを開発し、当研究室で開発された DET に応用することを目的とした。これにより電子線のエネルギー損失が 70% から 5% と大幅低減しサンプルへのダメージの少ない小照射電流でより高精度の電子後方散乱回折 (EBSP) を得ることができるようになる。また、タンパク質等の生体高分子に金ナノ結晶をラベルし、金ナノ結晶由来の EBSP を計測することで、水溶液中でのタンパク質の運動を 1 分子レベルで 3 次元的に計測することが可能な画期的な計測法の開発が可能になると期待した。

3. 研究の方法

(1) グラフェンを用いた大気圧観察セルの作成

グラフェン薄膜は (独) 産業技術総合研究所の長谷川雅考チーム長より提供された、30 ミクロンの銅箔上にプラズマ CVD により成膜したものをを用いた。2mm 角程度のグラフェンのみを単離しなければならないが、切り出し、銅のエッチング、大気圧環境観察用試料セルの観察窓への貼り付けの工程が考えられた。その過程で膜状の構造を維持できるように、工程の順番、方法等を検討した。作成後、電子顕微鏡内部の高真空下とセル内の気圧差である 1 気圧以上に耐性があるか耐圧試験機を用いて調べた。セルに貼られたグラフェンの状態は走査電子顕微鏡を用いて行った。

(2) DET を用いたタンパク質の 1 分子計測

DET では従来の真空蒸着法を用いたアモルファス炭素薄膜を用いた大気圧観察セルを

用いて、電子線の条件、EBSP データからの 3 次元運動の算出、ラベルに用いる金粒子の検討などを行った。サンプルとしては、無機高分子に吸着させた金粒子の水中での運動計測を行い、必要最低限の電流値を求めた。また、MSD を用いた 3 次元運動の検出を行った。金粒子は DXT でも用いられている金ナノ結晶だけでなくより入手が容易な市販の金コロイド、金ナノロッドを用いて、EBSP 取得効率を検討した。また、タンパク質サンプルとして東京農工大学の養王田正文教授より提供された好熱性古細菌 *Picrophilus torridus* 由来のシャペロニンを用い、ATP 存在、非存在下で計測を行い、ATP 依存の回転運動の検出を目指した。

4. 研究成果

(1) グラフェンを用いた大気圧観察セルの作成

グラフェン薄膜は膜状の形が崩れやすく、作成過程で膜状構造を維持させたまま、銅箔を溶解させるのが難しいため、まず板ガラス上にトリアセチルセルロース (TAC) をコートし、その上にグラフェン+銅箔をグラフェン側を下にして乗せたのち、ガラスから TAC を剥離させることで、グラフェン層を TAC 保護しながら、銅箔をエッチングすることを目指した。ただ、この方法だと、TAC とグラフェンの接着が弱く、エッチング工程に持つていくことが困難であった。そこで、直接グラフェン+銅箔のグラフェン上のみ TAC をコートすることにした。板ガラスへの TAC コートは引上げ法によるもので、両面をコートしていたが、片面にのみコートをするのは困難であった。方法としては、まず、引上げ法で両面をコートして銅箔面のみアセトンにより融解させる、またはグラフェン面にのみ、TAC 溶液を滴下してコートする方法を考えたが、TAC を取り除くのが難しい、また均一にコートするのが困難といった問題が発生した。その後も、種々の見直し、改良を行うことで、以下の方法で 2mm 角のグラフェン膜を得ることに成功した。

まず、グラフェン+銅箔をあらかじめ 2mm 角に切断し、小さ目のシャーレに 5ml 程度のエッチング液を満たし、液面に銅箔層を下にして表面張力を利用して浮かばせる。1 晩程度放置すると銅箔がエッチングにより取り除かれる。その 2mm 角のグラフェン薄膜を直径 5mm 程度のリングで掬い取り、水に移し、エッチング液を取り除く、大気圧環境観察用試料セルを構成する金属製グリッドにあらかじめ TAC を貼っておき、その上にグラフェン薄膜を貼る。乾燥後、25%、50%、75%、100% アセトンで順次、TAC を溶解する。以上の工程により、グラフェン薄膜を用いた大気圧環境観察用試料セルを作成した。

作成後、耐圧試験を行ったが、1 気圧の気圧差に耐えられるものは作成できなかった。これは走査電子顕微鏡像からも観察された、

グラフェンの構造欠陥部位によるものと考えられる(図1)。

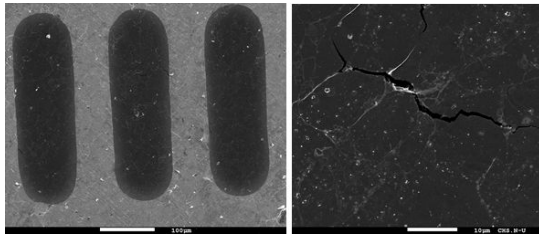


図1 セルの観察窓に貼られたグラフェン薄膜 スケールバーは左 100 ミクロン, 右 10 ミクロン
所々に構造欠陥と考えられる亀裂が観察される。

このため、DET 用の比較的観察窓の大きな大気圧環境観察用試料セル(観察窓: 100 ミクロン×300 ミクロン)で用いるのは、現在のところ難しいと考えられる。観察窓がより、小さなセルを用いることも今後、解決してゆく手段として考えられる。また今後、良質のグラフェンを用いることで、解決されると期待される。

また、グラフェン薄膜を電子顕微鏡に用いた結果として、アモルファス状の蒸着カーボン薄膜とは異なり、10nm 以下の膜厚でも、チャージアップが極めて起こりにくい特徴が見られた。これはグラフェンの性質として知られている導電性の良さが寄与していると考えられる。また、その薄さから電子線の透過が極めてよく、低加速電圧でも薄膜を通じた部分の構造が鮮明に観察された。このことから、グラフェン薄膜は電子顕微鏡用の大気圧環境観察用試料セルを構成する観察窓として非常に優れた性質を持つと結論付けられる。

この研究を通し確立した比較的大きなグラフェン薄膜の単離法は、今後大気圧セルだけでなく他分野にも応用ができると期待される。

(2)DET の各種、条件検討

DET ではタンパク質を始めとする生体高分子の1分子レベルでの運動を計測することを目標としている。一般的に電子線は照射対象との相互作用が大きく、対象を損傷しやすいことが知られている。DET ではタンパク質に金微粒子をラベルし、その粒子のみに電子線を照射し EBSP を取得することで、タンパク質へのダメージを回避することを考えている。また、EBSP 取得をより低電流で取得可能とするため、EBSP カメラにイメージインテンシファイヤーを組み込んだ。その上で、水を満たした環境下での金粒子の運動を計測できる最低限の電流値を求めた。サンプルとして、カーボン薄膜上にチオール基を持つシランカップリング剤をコートし、金ナノ結晶を結合させたものを用いた。その結果、電圧

30kV, 照射電流 0.094nA を最適値として設定した。この条件を用いて、セル内の環境を真空、アルゴンガス、水に変え、金ナノ結晶の運動に与える影響を計測した(図2)。

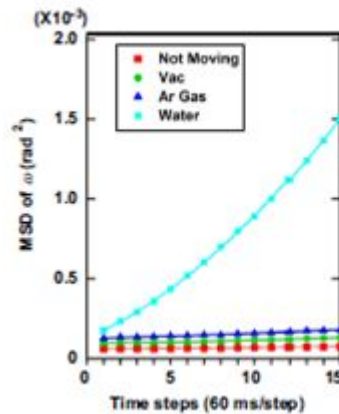


図2 真空、アルゴンガス、水中での金ナノ結晶の運動 (Not Moving は金平板結晶)。

その結果、水中で最も大きな運動が計測され、アルゴンガス、真空の順番で計測された。これらは環境中の分子が金ナノ結晶に衝突して励起された運動と考えられる。また、非常に微小ではあるが、真空中での運動は電子線の照射圧が影響していると考えられる(論文 参照)。

また、DET の正当性を証明する実験として、平板ナノ結晶を用いて、走査電子顕微鏡の試料台に貼り付け、試料台を回転、または角度を変化させ、それに応じた EBSP のパターン変化をとらえた(図3)。

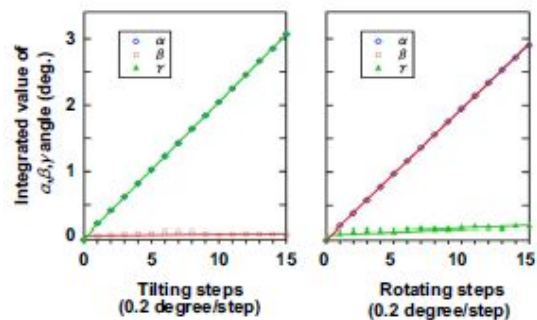


図3 計測から得られた金平板結晶の移動 移動に対し軸となる角度の変化は無い。このことから3次元で運動が捉えられているが証明された。

これの実験により、DET が金の結晶方位の変化をとらえていること、つまり、DET の正当性が証明された(論文 参照)。

さらに、DXT で用いている金ナノ結晶は、計測毎に作成しなければならず、また、作成に熟練した技術が必要といった点で利便性が悪い。そこで、DXT では回折点が得られない市販の金コロイドや金ナノロッドを用い

ても EBSP が得られるか、これらをシランカップリング剤に固定して DET を行った。その結果、明瞭な EBSP が得られることが判明した。こちらに関しても真空中、水中、で DET 計測を行い金コロイドの運動を計測した(図 4)。

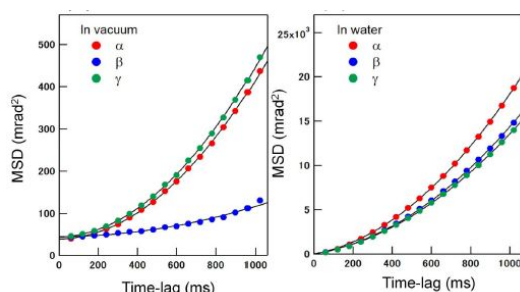


図 4 金コロイドを用いた DET 計測。真空において を軸とする運動が見られる。

また、金ナノ結晶では得られなかった 3 次元の異方性を持つ運動が真空中で計測された。これは、金コロイドは粒径がそろい、かつ、球状に近いことから、金ナノ結晶より計測感度が高くなり、その結果、電子線照射の位置に対応した運動が計測されたと予想される。このことから、金コロイドは、計測の利便性、データの再現性、計測感度のすべてにおいて優位であり、ラベルを行う物として非常に有望であると考えられる(論文 参照)。

(3) DET を用いたタンパク質の 1 分子計測

タンパク質の 1 分子計測として、好熱性古細菌 *Picrophilus torridus* 由来のシャペロニンを用いた。これは、シャペロニンが元来熱に強く、変性しにくい、即ち構造的にしっかりとしたタンパク質であり、ATP 依存的に回転運動をされると考えられていたことによる。シャペロニンはリコンビナントで作成されたもので、2 箇所アミノ酸置換による変異を入れられていて、下部、上部、2 箇所にシステイン残基を持っている。サンプルの調製法は、まずカーボン薄膜に金を薄く蒸着し、この金に対しシャペロニンを結合させた。次に金コロイドを反対側に当たる未反応のチオール基に対し反応させた。このサンプルに対し ATP 存在、非存在下で、1 分子計測を行った(図 5)。

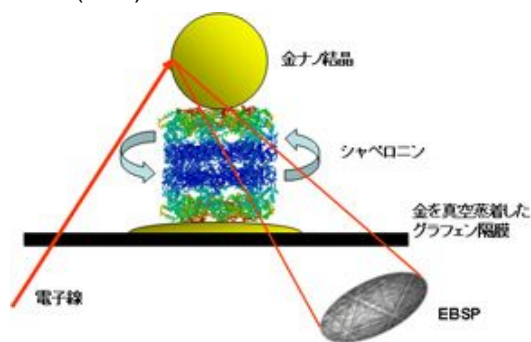


図 5 シャペロニン 1 分子計測の模式図

その結果、ATP 存在下でのみ回転運動が優位に計測された(図 6)。

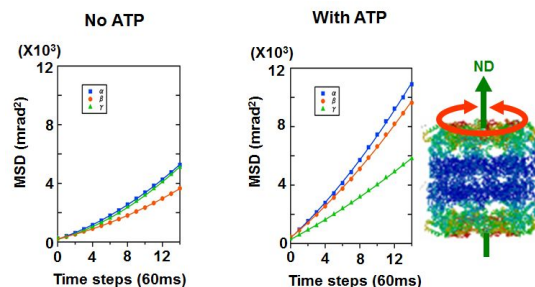


図 6 シャペロニンの DET による 1 分子計測 ATP 存在下で を軸とする運動が優位に計測された。これは分子の回転方向の運動を示している。

これにより、DET を用いてタンパク質運動が計測できることを示した。

今後、DET を用いてタンパク質だけでなく、有機分子、糖鎖、脂質といった分子の 1 分子レベルでの運動計測を予定している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Ogawa, N., Hirohata Y., Sasaki, Y. C. & Ishikawa, A., Time-resolved measurement of the three-dimensional motion of gold nanocrystals in water using diffracted electron tracking, *Ultramicroscopy*, 査読あり, 140, 2014, 1-8, DOI: 10.1016/j.ultramic.2014.01.012

Ogawa, N., Hoshisashi, K., Sekiguchi, H., Ichianagi, K., Yufuku, M., Hirohata, Y., Suzuki, S., Ishikawa, A. & Sasaki, Y. C., Tracking 3D Picometer-Scale Motions of Single Nanoparticles with High-Energy Electron Probes, *SCIENTIFIC REPORTS*, 査読あり, 3, 2013, 1-7, DOI: 10.1038/srep02201

Ogawa, N., Yamamoto, Y., Arita, M., Tsuchida, K., Hoshisashi, K., Sekiguchi, H., Hirohata, Y., Ishikawa, A., Yohda, M. & Sasaki Y. C., Three-Dimensional Picometer-Scale Motions in Aqueous Solution Visualized by Diffracted Electron Tracking, 査読なし, 104, 2013, 526, DOI: 10.1016/j.bpj.2012.11.2910

[学会発表](計 5 件)

Ishikawa A., Ogawa N., Hirohata Y., Yohda M., Sekiguchi H., Sasaki Y. C. Time-resolved Observations of Single Protein's Motions Using Diffracted Electron Tracking (DET) with Wet Cell SEM, 18th International Microscopy Congress, 2014/9/7-12, Prague,

Czech Republic

小川 直樹, 土田 佳那子, 山本 陽平, 石川 晃, 佐々木 裕次, 養王田 正文, 電子線 1 分子計測法 (DET) を用いたグループ II 型 シャペロニンの回転運動の検出, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014/6/26, 横浜

佐々木 裕次, 小川 直樹, 松下 祐福, 広畑 泰久, 鈴木 清一, 石川 晃, 電子線 1 分子追跡法による 3 次元ピコメートル 精度水中動画観察, 日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会, 2014/5/12, 東京

小川 直樹, 土田 佳那子, 山本 陽平, 石川 晃, 佐々木 裕次, 養王田 正文, 電子線 1 分子計測法 (DET) を用いたグループ II 型 シャペロニンの構造変化の検出, 第 86 回日本生化学会大会, 2013/9/11, 横浜

小川 直樹, 石川 晃, 広畑 泰久, 養王田 正文, 佐々木 裕次, DET による水中のタンパク質の運動計測における試料損傷を低減する試料支持方式, 日本顕微鏡学会第 69 回記念学術講演, 2013/5/21, 大阪

〔その他〕

ホームページ等

「3 次元ピコメートル精度でナノ粒子の水中動画観察に成功」

http://www.k.u-tokyo.ac.jp/info/entry/22_entry240/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 直樹 (OGAWA, Naoki)

東京農工大学・大学院工学府・特任助教

研究者番号: 5 0 4 1 5 1 1 3