

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370070

研究課題名(和文)高分解能3次元組成分析システムの開発と生物試料の解析

研究課題名(英文)Development of a 3D high-resolution component analysis system and observation of biological specimens

研究代表者

小椋 俊彦(Ogura, Toshihiko)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・上級主任研究員

研究者番号：70371028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大気圧下や水溶液中の生物サンプル及び有機材料を高分解能で観察する、走査電子線を用いた新規の顕微鏡システムの開発を行う。このシステムでは、従来の装置では困難であった、溶液中の生物試料の非染色・非固定観察でナノメートルオーダーの分解能での観察を可能とする。さらに、サンプルの3次元構造と組成情報を同時に解析することを目標とする。本研究成果では、電子線を直接照射せず一旦薄膜へと吸収させ、ここから生じる2次的な物理線量をサンプルに照射する方法を開発し、電子線ダメージを防ぐとともに高コントラスト・高分解能での撮像を可能とした。このシステムは、バイオ試料のみならず材料系への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：To understand various biological functions, observation of the nanometre structures of bacteria and viruses is essential. Scanning electron microscopy (SEM) is an important tool for such observations. However, samples of SEM are usually prepared by staining to enhance image contrast. Staining preparation is often not recommended to observe detail of the biological structures. Moreover, biological samples are prone to radiation damage and unstained samples give very poor contrast. Here, we report new methods for the unstained biological specimens in water of bacteria and virus, proteins. The obtained images show very high-contrast, and the samples incur low-electron radiation damage. Our method can be used for diverse liquid specimens across a broad range, such as nanoparticles and catalytic materials.

研究分野：ナノバイオテクノロジー

キーワード：電子顕微鏡 非染色生物試料 液中観察 薄膜 誘電率 3次元構造解析 画像情報処理

1. 研究開始当初の背景

細胞内のタンパク質やその複合体の構造を生きたまま直接観測することは、生物学における長年の夢である。特に生きた細胞内のタンパク質をダメージ無くクリアに観察できれば、ガン化やその転移といった病気のメカニズムを分子の3次元構造レベルで解析することが可能となる。これは、様々な病気の治療に結びつくだけでなく、発生や分化、神経伸張等の生物学における基礎的研究をも大きく進展させる。

これまでの生物サンプルの観察方法としては、光学顕微鏡に代表される細胞レベルでの観測法とX線結晶構造解析等のタンパク質レベルの方法が用いられてきた。光学顕微鏡による観測では、生物サンプルを水溶液中で生きたまま観測することが可能であるが、この分解能は、光の波長による制約を受けるため0.2 μ m程度である。この分解能では、タンパク質やその複合体あるいはウイルスを直接観察することはできない。一方、X線結晶構造解析法では、分解能が数 \AA と極めて高いが、観測しているサンプルは、あくまでも細胞から抽出・精製された後に結晶化されたサンプルであるため、実際の細胞内とは構造が異なる可能性がある。さらに、細胞内では様々なタンパク質が複雑に相互作用することで機能を発現しているため、こうした相互作用を解析することは極めて困難である。

2. 研究の目的

本研究では、大気圧下や水溶液中の生物サンプル及び有機材料を高分解能で観察するための、走査電子線を用いた新規の顕微鏡システムの開発を行う。このシステムでは、従来の装置では困難であった、溶液中の生物試料の非染色・非固定観察でナノメートルオーダーの分解能での観察を可能とする。さらに、サンプルの3次元構造と組成情報を同時に解析することを目指す。加えて、本提案により開発した顕微鏡システムを用いて、細胞やバクテリア等の生物試料を高分解能で、その3次元構造の観察を行う。これにより、生きた細胞内のタンパク質やその複合体の構造的な挙動の解明に繋げたい。こうした技術は、生体内の生理機能や生化学反応、さらには病理の解明や薬理特性の解析等の生物学全般にわたる研究を飛躍的に進展させるものと期待される。

3. 研究の方法

電子線を液中の有機材料や生物試料に照射すると、電子線損傷が生じてしまう。これを避けるためには、電子線を直接生物試料に照射しないことが要求される。これまで我々は、電子線を一旦薄膜に吸収させ、そこから生じる2次的な物理線を試料へ間接的に照射することで、電子線を直接当てずに観察する方法の開発を進めて来た。大気圧観察ホルダーとしては、2枚の薄膜を隙間を設けて固

定し、この間に大気圧あるいは水溶液中の生物試料を封入する方式とした。この薄膜の上部には電子線を吸収し、2次的な物理線を放射する変換膜を設ける構造としている。電子線変換膜を改良することで、様々な観察用途に使用することが出来る。

本研究提案による装置では、電子線検出素子とリニアアレイ状のX線検出素子をサンプル下面に設置する。電子線及び電位検出素子は、水溶液中の生物試料を透過した電子線や電位信号を検出する。これにより、水溶液中の生物試料を非染色・非固定で高コントラストでの撮像を可能とする。また、リニアアレイ検出素子では、各検出素子の位置(視野角)に依存した複数の傾斜画像を同時に得ることができる。これにより1回の電子線走査でサンプルの3次元構造を解析することが可能となる。さらに、X線のエネルギーを測定可能なSi-PINダイオードやSi-アバランシェフォトダイオード(Si-APD)等のX線検出アレイを用いることで3次元的なX線組成分析を可能とする。これに加えて、電子線を検出するリニアアレイ素子を平行に設置することで、電子線による極めて高分解能の3次元構造も同時に得ることが可能となる。従来、X線顕微鏡や電子顕微鏡において、サンプルの3次元構造解析を行う場合は、サンプルを様々な角度で傾斜・回転させ、多数の画像撮影を行う必要があった。これに対して本方法では、1回の撮影で、X線の3次元組成分析と電子線による3次元構造を得ることが可能となる。また、本方式の空間分解能は、薄膜内に入射した電子の拡散範囲により規定される。従って、2nm径の電子線を用いて拡散範囲を5nm程度に抑えることができれば、およそ同程度の分解能を達成することが可能となる。これは、従来の軟X線顕微鏡の理論的な最高分解能である10nmを超える可能性を示唆している。もし、10nmを切る分解が達成されれば、水溶液中での細胞内のタンパク質やその複合体の構造を捉えることが可能となる。さらに重要な点として、本提案装置は、汎用走査電顕(SEM)をベースとして使用するため、価格が比較的安く、個々の研究室レベルで誰もが簡便に使用することが可能となり、様々なサンプルへの応用が期待される

4. 研究成果

(1) 大気圧ホルダー上部の窒化シリコン膜にチタン薄膜を形成し、走査電子線を入射することで、軟X線を放出させ、これが膜直下の生物試料に照射されることで、観察を行うシステムの高分解能化と3次元撮像化を進めた。生物試料による実験を行ったところ、軟X線によるダメージは比較的大きいことが判明した。これは、同じ酵母を数回撮像し、形状の変化と細胞内液のダメージによる流出により確認された。また、チタンの軟X線への変換効率は極めて低く、電子線の電流を数nA以上流す必要があるため、電子線プロ

ーブ径の増大と熱損傷が生じ、分解能が低下する。これに加えて、X線はあらゆる方向に放射されるため、薄膜から離れた試料の分解能は低下する。以上のように、軟X線による観察では、電子線損傷を防ぐことは出来るが、X線や熱損傷が生じ、分解能の向上が難しいことが判明した。

(2) 入射電子をX線に変換し、観察する方法では、X線による損傷が生じてしまう。そこで、よりダメージの少ない観察方法を検討した。前項で示した軟X線観察ホルダーを開発する過程で、低エネルギーの電子線が極めて高い透過性を示すことが確認された。この実験では、窒化シリコン薄膜上部に110nm厚の金の薄膜層を形成し、ここに加速電圧が8kVの電子線を入射した。金は、極めて重い原子のため電子線を良く遮蔽する。入射した電子の金薄膜層内の散乱・吸収状況をモンテカルロ・シミュレーションにより計算したところ、ほぼ全ての入射電子が金薄膜層内で吸収されていることが確認された。一方、実際の実験では、電子線が大気圧ホルダー内の細胞を透過し、これによる透過像が観察された。この透過電子のエネルギーを調べたところ、多くが20eV以下の極低エネルギーであることが判明した。この結果は、何らかの要因により極低エネルギーの電子が細胞を透過し、これが観察されていることを示唆している。この方法による電子線損傷は、非常に弱く、複数回の観察を行っても細胞の形状が変性しない。さらにウェットな状態での牛乳やセラミックナノ粒子の観察が可能であった。しかしながら、低エネルギー電子の透過性は低く、完全に水溶液中に存在する有機材料やナノ粒子、生物試料を観察することは困難であった。従って、水溶液中の試料を電子線ダメージが無く、高コントラストで観察するためには、より透過性の高いさらなる方法の検討が必要とされた。

(3) 今回我々は、電子線照射に伴う電位変化を用いることで、水溶液中の非染色・非固定の生物試料を高コントラストで観察する技術を開発した。この技術は、電子線を重金属の薄膜に照射し吸収させることで局所的な電位変化を発生させ、この電位信号を透過させることで、水溶液中の試料を観察する方法である。電子線は、全て薄膜層内で吸収されるため、原理的には電子線ダメージは生じない。図1は、本観察方法(変動電位透過観察法)の概要を示している。水溶液中の生物試料は、耐圧性が高く極めて薄い2枚の窒化シリコン薄膜で挟み込み封入する。これにより、SEM内の高真空でも水溶液の状態を保持する。上部の窒化シリコン薄膜には、重金属であるタングステンの薄膜層を形成し、この層に低加速度(3~4kV)の電子線を照射する。入射

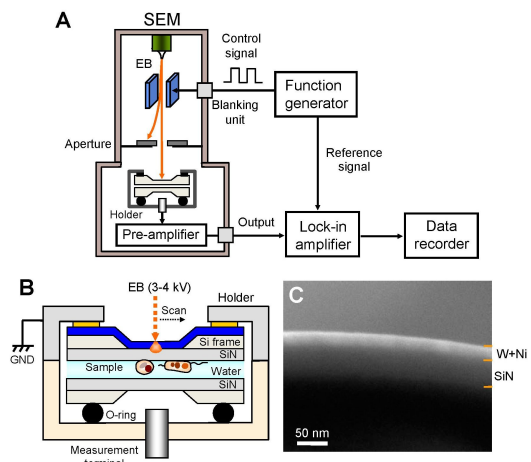


図1 変動電位透過観察法の概要 (Ogura, PLOS ONE, 2014)

された電子の多くは、タングステン層で散乱・吸収され、この部分に負の電位を生じる(図1)。この電子線は、偏向板により30kHz以上の周波数でオン・オフを繰り返しており、電子線がオンの場合には負の電位が形成され、オフの場合には0V電位となる。こうした電位変化は、水溶液サンプルを透過し、下部の測定端子により検出される。水は比誘電率が80と高いため電位変化を良く透過する。一方、生物試料を構成するタンパク質は2~3程度と低いため透過が阻害される。こうした誘電率の差は画像のコントラストの差となるため、染色処理を施すことなく高コントラストで水溶液中の生物試料を観察することが可能となる。さらに、入射電子は、ほぼ全てタングステン層で散乱・吸収されるため、生物試料には照射されず、電子線ダメージを完全に防ぐことができる。れるため、生物試料には照射されず、電子線ダメージを完全に防ぐことができる。

図2は、本方法で観察した水溶液中の非染色・非固定の酵母とバクテリアの画像である。酵母の直径は約5μmのため、水の層の厚さは5μm以上となる。すなわち本方法では、5μm以上の水の層を透過し、観察することが可能となる。これは、超高压電顕を用いても透過観察が困難な厚さである。さらに、複数回の撮像に対しても生物試料の変性や損傷は殆ど見られず、電子線ダメージが極めて小さいことが確認された。しかしながら、分解能は、200nm程度とそれほど高くない。

そこで、分解能を向上させるため、検出信号の高感度化を進めた。様々な検討を行った結果、薄膜上部のタングステン層にバイアス電圧を加えることで、検出信号が100倍程向上させることが見いだされた。これにより、電子線の電流量を抑え、電子線の直径をより絞ることが出来、分解能が40nmまで向上している。

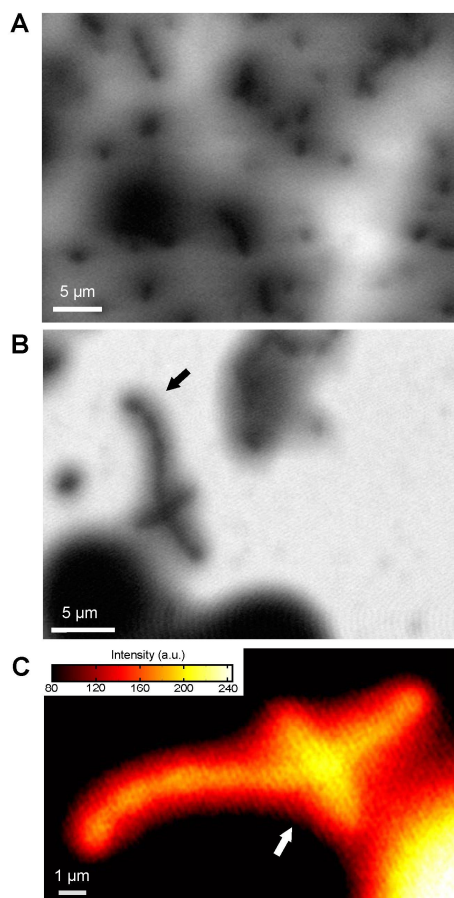


図2 変動電位透過観察法による液中の酵母とバクテリアの観察結果 (Ogura, PLOS ONE, 2014)

さらに、より高分解能の電界放射型 SEM 内に本システムを組み込むことで、分解能の向上を進めた。図3は、本システムで観察した水溶液中の非染色・非固定のバクテリアの観察画像を示す。この画像からは、バクテリア内部の核様体や液胞などの内部構造が確認できる。本観察法の分解能は8 nmであった。この方法は、非染色の生物試料をダメージ無く高コントラストで観察することが可能であり、今後はバイオ分野に広く使用されるインパクトの高い技術となると予想される。さらに、バイオ分野だけでなく、溶液中のナノ粒子の構造観察や変化等の材料分野への応用も可能である。

(4)精製したタンパク質を薄い氷の層に封入し、電子顕微鏡により撮像を行い、この画像を処理することで3次元構造を解析する方法の新たなアルゴリズムを開発した。このアルゴリズムでは、Simulated Annealing アルゴリズムを応用することで、自動的に3次元構造を得ることが可能となり、その構造変化をも捉えることができた。今後は、この方法を応用することで、3次元構造の変化を自動的に捉える方法の開発も可能となる。こうした技術は、薬分子のタンパク質への結合やこ

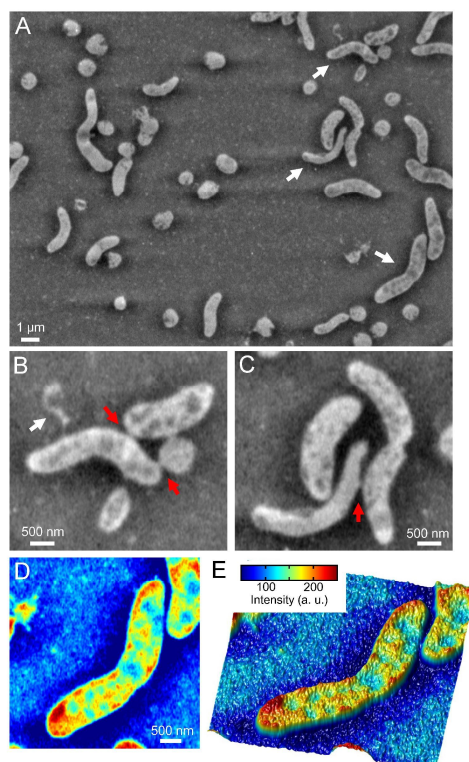


図3 高分解能変動電位透過観察法による液中バクテリアの観察結果 (Ogura, BBRC, 2015)

れによる構造変化を解析することが可能となるため、創薬分野への応用が考えられる。

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7件)

Toshihiko Ogura, Nanoscale analysis of unstained biological specimens in water without radiation damage using high-resolution frequency transmission electric-field system based on FE-SEM” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol.459, pp.521-528 (2015) (査読有り)
DOI:10.1016/j.bbrc.2015.02.140

Manatsu Morikawa, Hiroaki Yajima, Ryo Nitta, Shigeyuki Inoue, Toshihiko Ogura, Chikara Sato, Nobutaka Hirokawa “X-ray and Cryo-EM structures reveal mutual conformational changes of Kinesin and GTP-state microtubules upon binding” *The EMBO Journal*, Vol.34, pp.1270-1286 (2015) (査読有り)

Toshihiko Ogura, Hiroaki Yajima, Ryo Nitta, Nobutaka Hirokawa, Chikara

Sato, "New simulated annealing approach considering helix bending applied to determine the 8.8 structure of 15-protofilament microtubules" J. Struct. Biol., Vol. 188 pp.165-176 (2014) (査読有り)
DOI: 10.1016/j.jsb.2014.08.009

Toshihiko Ogura, "Non-destructive observation of intact bacteria and viruses in water by the highly sensitive frequency transmission electric-field method based on SEM" Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.450, pp.1684-1689 (2014) (査読有り)
DOI:10.1016/j.bbrc.2014.07.062

Toshihiko Ogura, "Direct observation of unstained biological specimens in water by the frequency transmission electric-field method using SEM" PLoS ONE, Vol.9 e92780 (6 pages) (2014) (査読有り)
DOI:10.1371/journal.pone.0092780

Noriya Izu, Toshihiko Ogura, Takafumi Akamatsu, Toshi Itoh, Woosuck Shin, "Direct scanning electron microscopy based observation of dispersed core-shell-type nanoparticles in a wet state", Ceramic International, Vol.40, pp.16361-16364 (2014) (査読有り)
DOI: 10.1016/j.ceramint.2014.07.075

Toshihiko Ogura, "High-contrast observation of unstained proteins and viruses by scanning electron microscopy" PLoS ONE, Vol.7 e46904 (7 pages) (2012) (査読有り)
DOI:10.1371/journal.pone.0046904

[学会発表](計6件)

小椋 俊彦, "変動電位透過観察法による水溶液中の非染色・非固定ウイルスの直接観察方法" 日本ウイルス学会、2014年11月11日(横浜)

小椋 俊彦, "走査電子顕微鏡による大気圧下の非染色バクテリアの高コントラスト観察方法" 極限環境生物学会、2012年12月2日(東京 日本大学)

小椋 俊彦, "走査電顕による非染色ウイルス試料の高コントラスト・低ダメージ観察方法" 日本ウイルス学会、2012年11月14日(大阪)

小椋 俊彦, "走査電顕による非染色バ

クテリアサンプルの高コントラスト・低ダメージ観察方法" 日本食品微生物学会、2012年10月25日(福岡市)

小椋 俊彦, "A high-contrast and low-damage observation method of the unstained biological samples by scanning-electron microscope" 日本生物物理学会2012年9月24日(名古屋大学)

小椋 俊彦, "走査電子線を用いた非染色生物試料の高コントラスト・低ダメージ観察方法" 日本顕微鏡学会(招待講演)2012年5月16日(つくば)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小椋 俊彦 (Ogura Toshihiko)
国立研究開発法人 産業技術総合研究所・上級主任研究員
研究者番号: 70371028