

令和元年6月24日現在

機関番号：55501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14771

研究課題名(和文)イオン液体で切り開く新たな構造生物学

研究課題名(英文) Toward establishing a new method for structural biology by using ionic liquid

研究代表者

島袋 勝弥 (shimabukuro, katsuya)

宇部工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号：70618446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、イオン液体を用いた新しいイメージング技術開発のために、2つのプロジェクトを進めた。1) 走査型電子顕微鏡や透過型電子顕微鏡のレプリカ作製のための「乾かさない」試料作製法 2) 導電性を持つ基盤を利用した、無蒸着生体試料の簡便な走査型電子顕微鏡法の開発を行った。両方プロジェクトも予定通りの成果が得られた。レプリカ作製のためには、生物試料を2%イオン液体で40、15分間処理することで、乾燥による試料の変形を抑え、電子顕微鏡の処理に利用できることを確かめた。2)については、目標にしていた細菌のべん毛観察に成功し、シルエット法が微生物の形態観察に有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命科学は、新しいイメージング技術の登場によって大きく進展してきた。本研究の特徴は、電顕による構造解析をより身近にすることであり、特殊な技能や装置を必要としない。そのため、生命科学分野に限らず、食品・製薬産業への応用も期待できる。また、本研究は、近年登場したイオン液体の新しい利用法でもあり、化学と生命科学の融合を目指した新しい挑戦でもある。

研究成果の概要(英文)：By taking advantages of ionic liquid properties such as high electron conductivity and low vapor pressure, we have aimed to develop a new sample preparation method for electron microscopy. Ionic liquid was used to dry biological samples in a place of a conventional way like critical point drying or freeze-dry method. Our results suggest that a sample preparation by ionic liquid well preserves fine structures in biological sample at nm to um order.

研究分野：生物物理学

キーワード：イオン液体 電子顕微鏡 形態観察

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

電子顕微鏡法は、原子分解能に近い分解能を持つ低温電子検出単粒子解析(2017年ノーベル化学賞の対象)が、ハードウェアとソフトウェアの機能向上を受け急速に進歩し、X線結晶解析を上回るスピードで生体高分子の構造を明らかにしている(Nogales and Scheres, Mol. Cell, 2015)。一方、細胞の形態や微細構造観察など、従来の電子顕微鏡でなければできない構造生物学がある。しかし、真空中の観察という条件のため前処理の問題がある。前処理の技術は、煩雑な操作や高額な機器が必要となり、少数の専門家だけの職人芸になってしまった(Audrey, et al., 2014)。この現状を大幅に改善し、簡単に前処理できるようにし、電子顕微鏡法をより身近な技術とする必要がある。

本研究で使うイオン液体は「塩」であるが、有機化合物であり、常温常圧で液体である。蒸気圧がほぼゼロであり、かつ導電性を持つことが、イオン液体の電子顕微鏡への応用を期待させる。実際、イオン液体自体が走査型電子顕微鏡(SEM)で直接観察できること(Kuwabata et al., Chem. Lett., 200)イオン液体を塗布した生体試料が金属蒸着なしでSEM観察できること(Arimoto et al., Electrochim. Acta, 2008)が報告されている。しかし、いずれの結果も、試料サイズが数十 μm 程度であり、生命科学が求める μm から nm に至る分解能は得られておらず、本格的な活用には至っていない。イオン液体による生体試料のSEM観察は、化学者が行っている場合が多く、生命学者が求める条件との剥離が目立つ。

2. 研究の目的

申請者の構造生物学の知見(Shimabukuro, et al., Curr. Biol. 2011)をもとに、イオン液体を主体とした画期的なイメージング技術を3つ開発する。具体的には、

- 1) 電子顕微鏡試のための「乾かさない」試料作製法
- 2) 導電性の金属コート基盤を利用した、無蒸着生体試料のSEMによるシルエット観察法
- 3) 収束イオンビーム装置により細胞を自在に整形し、その断面像から細胞の全容を知る 1細胞解剖法

を実現し、それらの技術の生命科学への実用を目的とする。

3. 研究の方法

- 1) イオン液体を活用した試料作製法(金属蒸着あり)

電子顕微鏡(電顕)の前処理にイオン液体(IL)を利用し、保存性が高く、かつ簡便な電顕試料作製法を確立する。生体試料を電顕観察するためには、まず試料に含まれる水分を取り除き、続いて表面に金属蒸着を施す。このとき重要なのが乾燥方法であり、ここで試料の変形が起きやすい(Audrey, et al., 2014)。そこで、申請者らはILを用いた、試料に優しい前処理法を開発した。この方法では、化学固定した試料をよく水洗し、IL希釈液に15分、40度で浸す。その後、試料を取り出し、余分なIL溶液をレンズペーパーで吸い取り、自然乾燥させる。ここで水分は蒸発するが、ILは試料表面を覆うように薄い膜として残る。この試料に真空蒸着装置で白金・炭素蒸着を施し、SEM観察を行う。

- 2) 導電性基盤を用いた生体試料の無蒸着観察

SEMでは電子線照射に伴い、試料表面から発生する2次電子を検出する。生体試料は元素番号が小さい原子(C, N, O, H)からなるため、2次電子が発生しにくい。そのため、通常は試料表面を10 nm程度の重金属膜(Au, Ptなど)で覆い、2次電子発生を増強する。また金属蒸着により導電性が得られ、SEM観察の妨げとなる帯電を抑えることができる。

実験はまず、厚さ8 nmの金薄膜を蒸着したカバーガラスを作製し、その表面に生体試料を化学固定する。手法1)と同様にILで前処理を行い、今度は金属蒸着をせずに、直接SEM観察する。このとき、試料表面から生じる2次電子はバックグランドよりも少ない。この結果、明るい背景の中に、試料の姿が影絵のように浮かび上がる。しかも、金蒸着膜が導電性を持つために帯電も起きず、IL処理のおかげで真空中でも試料の形が保たれる。

今回は、この手法の分解能の限界に挑戦する。カバーガラス表面に蒸着する金属の種類と厚さ、電子線の加速電圧、電流値を調整し、真正細菌のべん毛観察を目標とする。

- 3) 集束イオンビーム装置による1細胞解剖法

収束イオンビーム装置(FIB)は、試料の微細加工と観察の両方ができ、無機材料研究でよく利用されている。FIBはガリウムイオンビームで試料を削るように加工する。ビーム照射により、試料から2次電子が生じるため、FIBでもSEMと同様(正確にはSIM)にイメージングができる。

実験の概要として、まず、IL処理した細胞をFIB観察する。このとき、IL処理により帯電が抑えられ、2次電子観察が可能になる。続いて、強いガリウムイオンビームを照射し、細胞を

削る。このとき、試料ステージを傾けることで、細胞断面を自在に見ることができる。加工後、ステージを傾け、切断面の2次電子像を得る。酵母や培養細胞で実験を行い、この方法で観察可能な細胞小器官を明らかにする。また、微細加工により断面の連続像を取り、細胞構造の3次元構築も試みる。

4. 研究成果

計画1は当初の目的を達成した。植物プランクトンのクロロゴニウムを材料に、2%ILで良好な結果が得られた。3種類のILを試したが、ILによる見え方の差はほとんどなかった。30000倍の条件での帯電は起きず、クロロゴニウムの鞭毛を明瞭に観察することができた。鞭毛の太さも約250nmであり、ILが薄膜として試料を覆っていることが明らかになった。

計画2も順調に進み、最終目標に掲げていた、真正細菌のべん毛観察に成功した。蒸着カバールガラス上に固定化された枯草菌から伸びる複数のべん毛を反射電子計測で明瞭に確認できた。現在、計画1、2についての論文を執筆中である。

一方、計画3についてはクライオFIBなど、我々の研究計画よりも秀でた技術が報告されたため、開発を中断した。しかし、我々の手法でも細胞内小器官の構造を観察することができ、クライオFIBよりは、汎用的な方法になる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Okimura, C., Sakumura, Y., Shimabukuro, K., Iwate, Y. Sensing of substratum rigidity and directional migration by fast-crawling cells. *Physical Review E* 2018 97: 052401

〔学会発表〕(計 3 件)

1. ジャニサ、吉村翠、江本光、沖村千夏、岩楯好昭、島袋勝弥 アメーバ運動する線虫精子の牽引力測定 生体運動合同班会議、2019年1月5日、福岡大学
2. 沖村千夏、作村諭一、島袋勝弥、岩楯好昭 速いアメーバ細胞の Rigidity Sensing 生体運動合同班会議、2019年1月5日
3. Chika Okimura, Yuichi Sakumura, Katsuya Shimabukuro, Yoshiaki Iwate Rigidity sensing of fast-moving cell types 第55回生物物理学年会 岡山大学津島キャンパス

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.ube-k.ac.jp/topics/20180915-0917/>

受賞等

2018年9月 日本生物物理学会 Biophysics and Physicobiology Editors' Choice Award

2019年2月 isee! "Working Awards" MIP (Most Inclusive Player) 賞

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。