

令和 2 年 4 月 16 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19025

研究課題名(和文) ナノキュベットを用いたタンパク質の液中・動的・高分解能電子顕微鏡イメージング

研究課題名(英文) In-situ, dynamic, high-resolution imaging of proteins using nanocuvette

研究代表者

三宮 工 (Sannomiya, Takumi)

東京工業大学・物質理工学院・准教授

研究者番号：60610152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：タンパクの観察の動的観察に必要な基礎実験、測定に必要な要素技術を確立した。本研究期間中に、抗生物質では効かない重い感染症などに有効とされる抗体である免疫グロブリンG(IgG)分子が、これまで報告されていない鎖構造を持つことを新たに見出した。現在この鎖構造の検証中である。これらは新たな免疫機能や輸送手法の開発に展開される可能性がある。さらに、電子顕微鏡内への光導入により、仕事関数よりもはるかに小さいエネルギーの光によっても、光電効果のような試料の電荷状態が変化するという全く新しい現象を発見した。本研究成果を踏まえて引き続き生体分子の光との相互作用のその場観察を展開する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クライオ電子顕微鏡による生体分子観察は2017年のノーベル化学賞に選ばれている。しかしながら氷包埋された凍結試料の計測ではなく、動的観察はできない。本研究で提案するナノキュベット法では、液中動的電顕観察が可能である。本研究において、重い感染症などに有効とされる抗体である免疫グロブリンの新たな鎖構造を発見した。また光導入による動的観察の一環として、光により電荷状態が変化するという新しい物理現象を見出した。これらの成果および本研究で確率した技術により、新たな電子顕微鏡観察手法へむけた技術開発だけでなく、生体分子や材料科学への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed a transmission electron microscopy setup for dynamic observation of samples in solution with light stimulation. Using this measurement system, a chain-like structure of immuno-globulin G antibody proteins has been discovered. In addition, by introducing light into the electron microscopy column, it was found that the charge state of the sample changes by light illumination with smaller energy than the work function of the sample. This cannot be simply explained by the photoelectric effect, and further investigation is required. To increase the interaction of the photon and the material we also developed a cuvette system with electro-magnetic field enhancement, where short-range ordered nanohole structures exhibited Anderson localization of the electromagnetic wave. These investigations will be continued and expanded to in-situ observation of various systems including biomolecules and materials.

研究分野：電子顕微鏡

キーワード：ナノ材料 表面・界面物性 その場観察

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内の細胞膜中に存在し特定のイオンや物質のみを透過させる膜貫通タンパク質は、物質輸送・代謝・機能発現のための情報伝達スイッチとして働き、生体機能を司る。膜貫通タンパクの機能は、その構造・形態変化による物質透過制御であるため、構造解析が機能発現機構を解明する直接の手がかりとなる。これまで膜タンパク質の構造は、タンパク結晶からの X 線回折による構造解析により 1 次～4 次構造が決定されている。しかし、生体中でタンパク質は結晶化しているわけではなく、サブユニットの位置関係やフォールディングは必ずしも生体内と同じとは限らない。単独のタンパク質分子形態の解析として、近年、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いたクライオ単粒子解析が行われているが、静的観察にとどまっておき、動的 (あるいは *In vitro*) TEM 観察には至っていない。その理由は、電子線に対して安定でかつ高分解能観察を可能とする水溶液セルが存在しないためである。

2. 研究目的

本研究では、申請者が開発中の TEM 用新規水溶液中その場観察プラットフォームである「ナノキュベット」をバイオ応用し、高い空間分解能でタンパク質を水中動的観察する透過型電子顕微鏡法を構築する。

3. 研究の方法

・生体分子用「ナノキュベット」の作製

電子線が透過するほど薄く、水溶液を真空から隔離することのできる「ナノキュベット」を、コロイダルリソグラフィと薄膜堆積技術を組み合わせて作製する。内部にタンパク質を含む脂質二重層を展開する。電子線ダメージを減らすため金属・カーボンの極薄膜を用いて導電性を確保し、高い空間分解能が得られるよう十分に薄い (厚さ < 50nm) キュベットの作製を行う。ナノキュベットの光学センシング機能を利用し内部状態を光学的にモニタする。

・光導入によるダイナミック測定

動的観察の一例として、光応答する受容タンパクの観察を目指し、光導入機構を電子顕微鏡に設置する。電子顕微鏡に光導入することにより、光照射によるダイナミックな形態変化の観察が可能となる。

4. 研究成果

1) IgG オリゴマー

最適化されたカーボンナノキュベットを用い、タンパク質の観察を行った。重度の感染症治療に用いられる抗体分子である免疫グロブリン G (IgG) の観察において、これまでにない明瞭なコントラストでの構造観察に成功した。加えて、IgG 分子が鎖のようにつながったオリゴマー状態が観察された。IgM でのこのようなオリゴマー形成は報告されているが IgG では報告例がない。[論文投稿準備中] 今後、このオリゴマーの形成過程・機能性の解明、熱安定性の調査などが必要と考えられ、今後計測を継続する。

2) 吸着分子の超高感度センシング (論文化済み)

試料作製および測定の実現性を確保するために、光測定によりキュベットに閉じ込められた液体の状態や、シーリング膜の密着性を見積もる手法を開発した。電子顕微鏡観察前に、光測定により簡単にサンプル状態確認ができれば、スループットの向上にもつながる。基板上に作製したナノホール内に液体を閉じ込め、マクロ測定からキュベット内部及び周辺の温度・真空度依存性を測定したところ、超高感度の分子測定が可能であることが明らかになった。電子顕微鏡観察で重要となるコンタミとなる分子の吸着ダイナミクスをその場測定することに成功している。[文献 1] この実験結果を解析することで、定量的な分子吸着測定の可能性を見出している。

3) キュベット内の光場のアンダーソン局在

本研究で用いているナノキュベットは貴金属材料を導入することで光増幅可能で、限られた数のフォトン効率よく物質と相互作用することが可能である。光応答タンパク観察においては重要な機能となる。これまでのナノキュベットでは、短範囲規則配列した孔を用いていたが、本研究の過程で、アンダーソン局在に相当する極めて不均一に局在した光場の分布が実験的に観測された。(図 1) [文献 2] 不均一な電磁場分布の中でも、特に集団から孤立したようなエッジにおいて極端に大きな状態密度が観測されている。

これは現象としては興味深い一方で、本研究で目的としていた光場増強の利用には不向きであるため、ヘキサゴナル構造で均一なナノキュベットの作製を検討した。[文献 3] ヘキサゴナルナノキュベットの安価な大量作製方法のプロトコルはほぼ確立できており、今後の計測においては主にヘキサゴナルナノキュベットを作製・使用していく予定である。

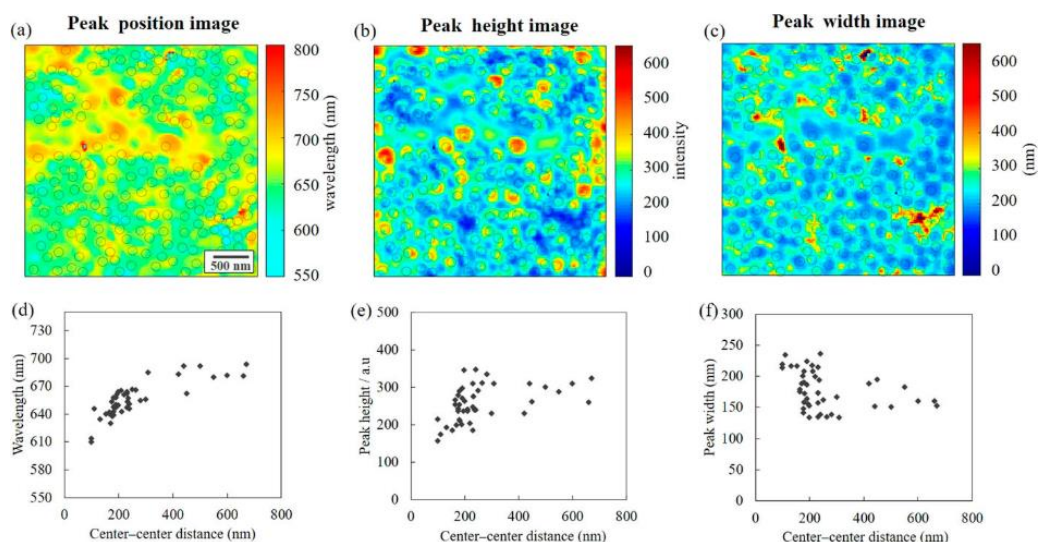


図1 短範囲規則をもつ貴金属キューベット内の電磁場のアンダーソン局在の実験的計測。
[文献2より抜粋]

4) 光と電子線と物質の相互作用

上述のように光と物質の相互作用観察のためには電磁場の状態密度を向上させること、あるいはフォトンエネルギーを効率よく物質に転送することが重要である。相互作用を高めるためのシステム構築として、粒子を用いた光場増強も検討した。[文献4、5、6]

また、実際の光導入その場測定のため、電子顕微鏡内への光導入し、その光と電子線の位置あわせ精度を1 μ m程度まで向上することに成功した。その結果、これまで全く報告されていない新しい現象が確認された。電子線照射中のサンプルの状態が光でその場観察したところ、チャージした数百nmサイズのサンプルが、はるかに小さい質量の電子の照射により、数百nmオーダーで動くことが示された。さらにこのチャージ状態が光の照射により変化することも示された。[論文投稿準備中] 引き続き、光導入によるその場測定を継続していく。

<文献>

- [1] Highly sensitive pressure and temperature induced SPP resonance shift at gold nanohole arrays
H. Ohnishi, E. Sabatani, D. Vu Thi, S. Yanagimoto, T. Sannomiya
Journal of Chemical Physics, 152, 024705, 2020.
- [2] Field localization of hexagonal and short-range ordered plasmonic nanoholes investigated by cathodoluminescence
D. Vu Thi, T. Ohno, N. Yamamoto, T. Sannomiya
Journal of Chemical Physics, 152, 074707, 2020.
- [3] Optical properties of plasmonic nanopore arrays prepared by electron beam and colloidal lithography
B. Malekian, K. Xiong, E. S. H. Kang, J. Andersson, G. Emilsson, M. Rommel, T. Sannomiya, M. P. Jonsson, A. Dahlin
Nanoscale Advances, 1, 4282-4289, 2019.
- [4] Asymmetric Light Absorption and Radiation of Ag-Cu Hybrid Nanoparticles
C. Wadell, A. Yasuhara, T. Sannomiya
Journal of Physical Chemistry C, 121 (48), 27029–27035, 2017.
- [5] Three-Dimensional Multipole Rotation in Spherical Silver Nanoparticles Observed by Cathodoluminescence
Z. Thollar, C. Wadell, T. Matsukata, N. Yamamoto, T. Sannomiya
ACS Photonics, 5 (7), 2555–2560, 2018.
- [6] Selected Mode Mixing and Interference Visualized within a Single Optical Nanoantenna
T. Matsukata, C. Wadell, N. Matthaiakakis, N. Yamamoto, T. Sannomiya
ACS Photonics, 5 (12), 4986–4992, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Vu Thi Dung, Ohno Takazumi, Yamamoto Naoki, Sannomiya Takumi	4. 巻 152
2. 論文標題 Field localization of hexagonal and short-range ordered plasmonic nanoholes investigated by cathodoluminescence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 074707 ~ 074707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1063/1.5131698	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohnishi Hiroki, Sabatani Eyal, Vu Thi Dung, Yanagimoto Sotatsu, Sannomiya Takumi	4. 巻 152
2. 論文標題 Highly sensitive pressure and temperature induced SPP resonance shift at gold nanohole arrays	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 024705 ~ 024705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1063/1.5131206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsukata Taeko, Matthaiakakis Nikolaos, Yano Taka-aki, Hada Masaki, Tanaka Takuo, Yamamoto Naoki, Sannomiya Takumi	4. 巻 6
2. 論文標題 Selection and Visualization of Degenerate Magnetic and Electric Multipoles up to Radial Higher Orders by Cathodoluminescence	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Photonics	6. 最初と最後の頁 2320 ~ 2326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1021/acsp Photonics.9b00833	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Malekian Bita, Xiong Kunli, Kang Evan S. H., Andersson John, Emilsson Gustav, Rommel Marcus, Sannomiya Takumi, Jonsson Magnus P., Dahlin Andreas	4. 巻 1
2. 論文標題 Optical properties of plasmonic nanopore arrays prepared by electron beam and colloidal lithography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nanoscale Advances	6. 最初と最後の頁 4282 ~ 4289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1039/C9NA00585D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Taeko Matsukata, Carl WadeII, Nikolaos Matthaiakakis, Naoki Yamamoto, Takumi Sannomiya	4. 巻 5
2. 論文標題 Selected Mode Mixing and Interference Visualized within a Single Optical Nanoantenna	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Photonics	6. 最初と最後の頁 4986-4992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsp Photonics.8b01231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 WadeII Carl, Yasuhara Akira, Sannomiya Takumi	4. 巻 121
2. 論文標題 Asymmetric Light Absorption and Radiation of Ag-Cu Hybrid Nanoparticles	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Physical Chemistry C	6. 最初と最後の頁 27029 ~ 27035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.7b09926	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Thollar Zac, WadeII Carl, Matsukata Taeko, Yamamoto Naoki, Sannomiya Takumi	4. 巻 7b01293
2. 論文標題 Three-Dimensional Multipole Rotation in Spherical Silver Nanoparticles Observed by Cathodoluminescence	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ACS Photonics	6. 最初と最後の頁 7b01293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsp Photonics.7b01293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計30件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 松方 妙子、三宮 工
2. 発表標題 角度・エネルギー同時分解カソードルミネセンスによる球状ナノ粒子からのキラル放射と相対位相マッピング
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ゼメワ佳路瑠、三宮 工
2. 発表標題 ハイパースペクトルカメラによるナノ構造の不均一性の観測 (ポスター)
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丹下貴志、松方 妙子、三宮 工
2. 発表標題 赤色発光 InGaN/GaN SQWにおけるトレンチ欠陥の構造および発光評価 (ポスター)
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳本 宗達、山本 直紀、三宮 工、秋葉 圭一郎
2. 発表標題 カソードルミネセンスにおけるフォトンバンチング
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 斉藤 光、松方 妙子、木村 勇一郎、松崎 健太郎、渡邊 厚介、稲田 幹、三宮 工
2. 発表標題 プラズモン増強ルミネセンスの電子線ナノ分光マッピング
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三宮 工、Konecna Andrea、松方 妙子、ソーラ ザック、岡本 隆之、Garcia de Abajo F. Javier、山本 直紀
2. 発表標題 SPPと結合した銀粒子のカソードルミネセンス位相マッピング
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三宮工
2. 発表標題 電子顕微鏡によるナノスケールでの光電場の可視化
3. 学会等名 日本光学会ナノオプティクス研究グループ第26回研究討論会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松方 妙子, 三宮工
2. 発表標題 角度・エネルギー同時計測可能な四次元カソードルミネセンス(ポスター)
3. 学会等名 日本光学会ナノオプティクス研究グループ第26回研究討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Matsukata, T. Sannomiya
2. 発表標題 4D STEM-CL : Nanoscopic field mapping with simultaneous angle- and energy-resolved cathodoluminescence (Poster)
3. 学会等名 iSPN 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Sannomiya
2. 発表標題 Interfering multipole modes visualized by cathodoluminescence
3. 学会等名 iSPN 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Dung Vu Thi, T. Sannomiya
2. 発表標題 Fabrication and optical characterization of SRO plasmonic nanopore by cathodoluminescence
3. 学会等名 iSPN 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宮工
2. 発表標題 角度分解カソードルミネセンスSTEMによる表面プラズモンモードの抽出と干渉
3. 学会等名 第35回分析電子顕微鏡討論会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宮 工, 松方 妙子, 小林 隼也, 山本 直紀
2. 発表標題 日本顕微鏡学会
3. 学会等名 カソードルミネセンス走査型透過電子顕微鏡装置への光導入
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Matsukata, T. Yano, N. Matthaiakakis, M. Hada, T. Tanaka, N. Yamamoto, T. Sannomiya
2. 発表標題 Higher-order Electric and Magnetic Multipole Modes Visualized by STEM-Cathodoluminescence
3. 学会等名 SPP9 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宮工
2. 発表標題 透過型電子顕微鏡によるその場観察
3. 学会等名 電磁波励起反応場ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Sannomiya
2. 発表標題 Plasmonic nanoholes analyzed by STEM cathodoluminescence
3. 学会等名 第9回電磁メタマテリアル講演会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Sannomiya
2. 発表標題 Plasmonic nanoholes analyzed by STEM cathodoluminescence
3. 学会等名 第9回電磁メタマテリアル講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Dung Thi Vu, Takumi Sannomiya
2. 発表標題 Electron microscopy observation of biomolecules in nanocuvette
3. 学会等名 日本顕微鏡学会関東支部講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Sannomiya, T. Matsukata, T. Okamoto, N. Yamamoto
2. 発表標題 Cathodoluminescence observation of single Ag nanoparticles coupled to silver substrates
3. 学会等名 応用物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Dung Thi VU, N. Yamamoto, T. Sannomiya
2. 発表標題 Optical coupling of short-range ordered nanopores through surface plasmons
3. 学会等名 応用物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Sannomiya, T. Matsukata, Z. Thollar, C. Wadell, N. Yamamoto
2. 発表標題 Interference of light emission in cathodoluminescence STEM
3. 学会等名 IMC19, (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Sannomiya
2. 発表標題 Nanoscale imaging of optical field by electron microscopy
3. 学会等名 SPIE Optics+Photonics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Matsukata, C. Wadell, N. Yamamoto, T. Sannomiya
2. 発表標題 Plasmonic modes in Ag nanodisks observed by scanning transmission electron microscopy with cathodoluminescence
3. 学会等名 SPIE Optics+Photonics
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤 克哉, 三宮 工
2. 発表標題 光応答材料を用いたプラズモニック光スイッチング素子の開発
3. 学会等名 用物理学会秋季講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 J. Kobayashi, T. Ohno, C. Wadell, N. Yamamoto, T. Sannomiya
2. 発表標題 Optical properties of hexagonal plasmonic nanoholes and nanopores
3. 学会等名 ISSS-8 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Matsukata, C. Wadell, N. Yamamoto, T. Sannomiya
2. 発表標題 Phase Mapping of Plasmonic Nanodisks by STEM Cathodoluminescence
3. 学会等名 ISSS-8, (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松方妙子, Carl Wadell, 山本 直紀, 三宮 工
2. 発表標題 走査型透過電子顕微鏡カソードルミネッセンスによる銀ナノディスクにおける多極子モード干渉のイメージング
3. 学会等名 日本顕微鏡学会関東支部講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三宮 工
2. 発表標題 Visualization of local field distribution by cathodoluminescence electron microscopy
3. 学会等名 第8回電磁メタマテリアル講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林隼也, 大野 峻澄, Carl Wadell, 山本 直紀, 三宮 工
2. 発表標題 六方晶金属ナノホール・ナノポアの光学およびカソードルミネッセンス測定
3. 学会等名 応用物理学会春季講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松方妙子, Carl Wadell, 山本 直紀, 三宮 工
2. 発表標題 走査型透過電子顕微鏡カソードルミネッセンスによるプラズモニック銀ナノディスクの位相測定
3. 学会等名 応用物理学会春季講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www.sannomiya.iem.titech.ac.jp

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