

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22384

研究課題名(和文)パルス電子顕微鏡のための液体試料観察法の開発

研究課題名(英文)Development of liquid chamber for pulsed electron microscopy

研究代表者

成田 哲博(Narita, Akihiro)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：30360613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、パルス電子顕微鏡で蛋白質動態を観察するための溶液チャンバーの開発を行った。穴の開いたシリコンの上に40nmのSiN(窒化シリコン)膜を貼り付けたチップを作成、このチップを二枚貼り合わせることで、溶液ホルダを自作した。試行錯誤の結果、最終的には直径20 nmの金コロイドの溶液中の動きを、(パルス電子顕微鏡ではない)通常の熱電子放出型電子顕微鏡でコンスタントに観察できるほどのコントラストを得ることができた。市販の溶液チャンバーとの比較から、溶液薄さは100 nmを割っているようで、溶液観察の成功率も50%を越え、ほぼ実用レベルに達している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パルス電子顕微鏡による溶液状態の観察が可能になれば、蛋白質動態だけでなく、リポソームやミセル、エマルジョンのような溶液構造についての微細動態観察も可能になり、生物学だけでなく、医薬、食品、化粧品、塗料など応用分野は広い。本研究はまだ完成にまでは至っていないが、必要条件を満たす溶液チャンバーの作成にほぼ成功しており、重要な一步を刻むことができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a liquid chamber for observing protein dynamics with a pulsed electron microscope. We made a chip with a 40 nm SiN (silicon nitride) film stuck on silicon with holes, and made a liquid holder by sticking two of these chips together. As a result of trial and error, it was finally possible to obtain a contrast in which the movement of colloidal gold with a diameter of 20 nm in a solution could be constantly observed with a normal electron microscope (not a pulsed electron microscope). From the comparison with the commercially available solution chamber, the solution thickness seems to be less than 100 nm, and the success rate of solution observation exceeds 50%, almost reaching the practical level.

研究分野：生物物理

キーワード：電子顕微鏡 蛋白質動態 パルス電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

電子顕微鏡は原子を直接観察することができる非常に強力な方法であり、近年では生体分子においてもクライオ電子顕微鏡法により近原子分解能が比較的容易に得られるようになってきている。しかし、一方でタンパク質や脂質膜などの生体分子は元来動的なものである。この動態を電子顕微鏡分解能レベルで理解するのはいままでも不可能であった。水中の分子には分子内の動態に加えてブラウン運動もあり、分子の動態を追うには1 μ 秒から1ミリ秒で電子顕微鏡写真を撮影しないとぶれてしまう。試料へのダメージを抑えつつ、分子の動きによるぶれを抑え、実用的な時間観察するには、パルス状に強い電子を放出するパルス電子銃を用いれば良い。たとえば、100枚の写真撮影で試料が壊れるなら、1ミリ秒の電子パルスを1秒ごとに出して撮影すれば100秒の観察が可能である。私達はすでに第一世代型パルス電子顕微鏡を、半導体フォトカソードを用いて開発していて、実際にパルス電子顕微鏡で動いている物体をぶれなく捉えられることを実証していた(図1)。蛋白質動態を観察するためには現在開発中の、より輝度の高い第二世代パルス電子顕微鏡が必要だが、電子顕微鏡だけではなく真空の電子顕微鏡コラム中で非凍結溶液を保持できる溶液チャンバーも必要である。しかし、当時実用化されているものは、窓厚が厚すぎてコントラストが出なかったり、高価すぎたりして適切なものがなかった。

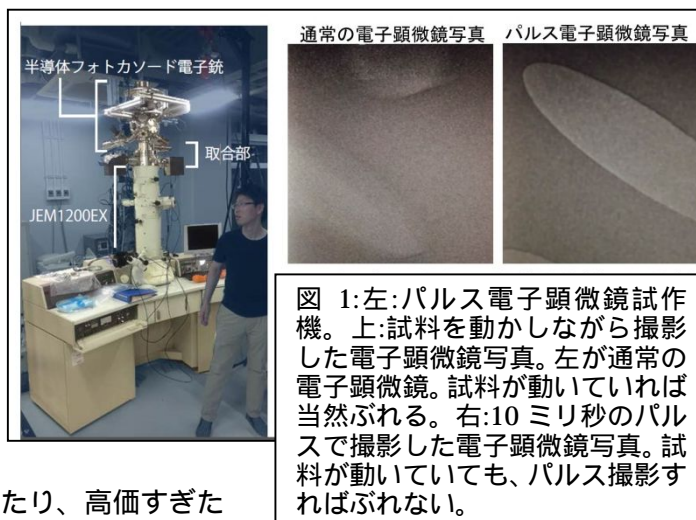


図1:左:パルス電子顕微鏡試作機。上:試料を動かしながら撮影した電子顕微鏡写真。左が通常の電子顕微鏡。試料が動いていれば当然ぶれる。右:10ミリ秒のパルスで撮影した電子顕微鏡写真。試料が動いていても、パルス撮影すればぶれない。

2. 研究の目的

溶液の動態観察を電子顕微鏡で行うための溶液チャンバーの開発を行う。また、実際の観察における各種条件検討を行う。溶液チャンバーに必要な条件として設定したのは、1: 溶液を真空中に保持できること。2: 溶液の厚さ+窓材の厚さが電子線が透過できる200nm以下に収まり、十分なコントラストが得られること。3: 高価すぎず、条件検討を容易に行うことができること。の3つである。

3. 研究の方法

まず、市販の溶液チャンバーK-kit(マーテック)の評価から始めた。K-kitはもともと溶液厚さ200nmのものしかなく、電子線透過窓であるシリコンナイトライドの厚さは1枚100nmであるため、電子線透過距離が合計400nmにもなってしまい、選択肢

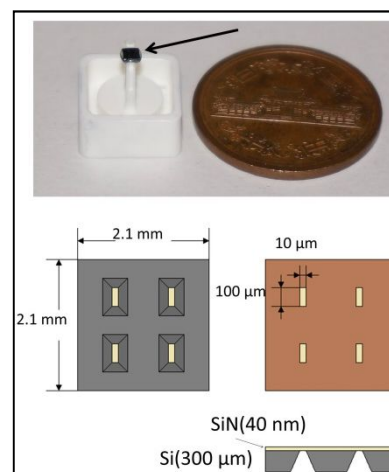


図2:上:私達が開発した溶液ホルダ(矢印)。下:主な材料となるチップ

に入らなかった。私達は以前から溶液厚さ 100 nm の K-kit を作成してほしいと要望を出しており、それも受けて、溶液厚さ 100 nm のものを試作してくれた。しかし、上下合わせて 200 nm の窓の厚さはやはり厚く、十分なコントラストが得られなかったので、1 から自作することにした。

NTT-AT に穴の開いたシリコンの上に 40 nm の SiN(窒化シリコン)膜を貼り付けたチップの作成を依頼。このチップを二枚貼り合わせること(図 2)で、溶液ホルダを製作し、接着材のスクリーニング、溶液厚さを貼り合わせ時の重りの重さでコントロールする、中に導入する溶液の条件検討など様々な調整を行った。

4. 研究成果

最終的には、シリコンナイトライド膜間の水溶液層を十分薄くすることに成功。溶液中の直径 20 nm の金コロイドの運動が、通常のパルスではない電子顕微鏡においてコンスタントに観察

できるほどのコントラストを得ることができた(図 3)。通常の電子顕微鏡では動いているものはぼけて見えるので、コントラストが落ちる。このレベルであれば、パルス電子顕微鏡を用いればほぼ確実に蛋白質の動態を捉えることができるだろう。溶液観察の成功率も 50%を越え、ほぼ実用レベルに達している。蛋白質に金コロイドをラベルした試料の観察も開始している。一方で、金コロイドと窒化シリコン膜の間に吸着が観察され、安定した動きの観察には 500mM 以上の高イオン強度が必要であることは問題である。この研究は他の研究予算を用いて継続され、今後は、吸着を抑えるために窓材の変更、表面処理の変更を試す。さらに、これを用いて、実用的な第二世代パルス電子顕微鏡立ち上げ終了次第、蛋白質の動態を直接観察する予定である。

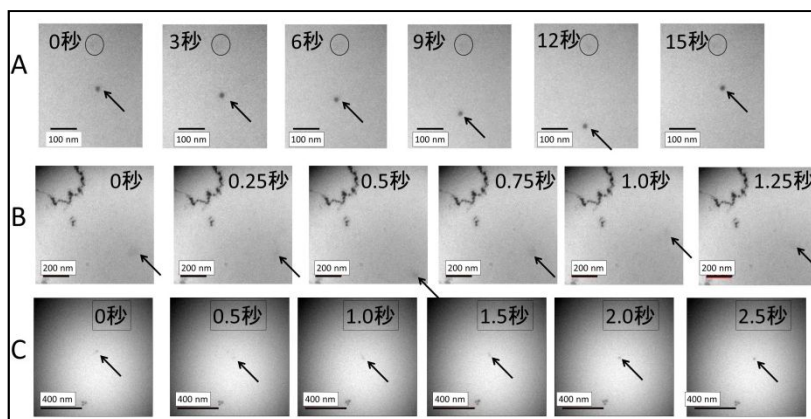


図 3:直径 20nm の金コロイド(矢印)の様々な動き。通常の熱電子放出型電子顕微鏡 H7650(80kV)を用いて、1 フレーム 0.25 秒露光で撮影。A:ホルダ内溶液層が薄いときには金コロイドはゆっくり運動する。丸内は窓の汚れで不動点である。B:溶液層が厚いとブラウン運動は速くなり、金コロイドはぶれてぼやけて写っている。C:アクチン線維存在化では、動きは速くぶれてはいるが一定の領域に留まる(線維そのものは小さいコントラストと運動によるぶれで、パルス電子顕微鏡でないと観察できない)。パルス電子銃を用いれば、このようなぶれは一切なくなる。パルス電子銃の可干渉性が十分あるので、原理的にはクライオ電子顕微鏡写真と同レベルの画質で動画が撮影出来る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akihiro Narita
2. 発表標題 High resolution structural analysis of the actin filaments and actin related proteins
3. 学会等名 Frontiers in Cellular, Viral and Molecular Microscopy with Cryo-specimen Preparation Techniques, 英国ブリストル大学（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiro Narita
2. 発表標題 Cofilin functions and regulation from a structural view point,
3. 学会等名 The 11th Toyota Riken International Workshop “Actin Filament: beyond the atomic resolution structures”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 成田哲博
2. 発表標題 フォトカソード電子顕微鏡に生物分野から期待できること
3. 学会等名 第238回有機エレクトロニクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成田哲博
2. 発表標題 アクチン線維構造と運動マシナリー
3. 学会等名 第43回分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成田哲博
2. 発表標題 細胞運動のしくみ解明に挑戦する構造生物学 ~アクチン線維の精密解析
3. 学会等名 未来に挑戦する構造生物科学 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------