

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02580

研究課題名（和文）溶液セル透過型電子顕微鏡法における過飽和度制御技術の確立とタンパク質結晶化への応用

研究課題名（英文）Establishment of technique for supersaturation control in liquid cell transmission electron microscopy and its application to protein crystallization

研究代表者

山崎 智也（Yamazaki, Tomoya）

北海道大学・低温科学研究所・特任助教

研究者番号：50735032

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 16,470,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質の結晶化過程を明らかにするには、高い時間、空間分解能での観察が必要である。この実現が期待できる溶液セル透過型電子顕微鏡法において、結晶化を効率よく生じさせるため、溶液セル内の過飽和度を制御する手法の開発を行った。その結果、放射線分解と貧溶媒を組み合わせる手法、誘電泳動現象を利用する手法、試料を冷却する手法を開発した。また、これらの手法を用いたタンパク質の結晶化への応用について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結晶化の物理・化学的メカニズムの解明は長年に渡り取り組まれている学術的に重要な課題である。また結晶化は、創薬に関わるタンパク質分子の構造解析、産業に関わる半導体などの材料開発、地球の熱収支に関わる雲の生成などの基礎であり、社会的に重要な現象である。これを調べるのに有効な溶液セル透過型電子顕微鏡法において、結晶化を能動的に生じさせる手法を開発した。これにより結晶化の瞬間を捉えることが容易になり、結晶化の理解が飛躍的に進展することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the crystallization process of protein crystals, it is necessary to observe the crystallization process with high temporal and spatial resolution. Such observation can be performed with a liquid-cell transmission electron microscopy. In order to perform efficient crystallization in the liquid cell, techniques to control supersaturation in the liquid cell were investigated. Three techniques were developed: radiolysis combined with anti-solvent, dielectrophoresis; specimen cooling. The application of these techniques to protein crystallization was investigated.

研究分野：結晶成長

キーワード：透過型電子顕微鏡 溶液セル タンパク質 過飽和度 誘電泳動 試料冷却TEMホルダー 放射線分解 結晶化

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

結晶化における最初のステップは核生成であり、その物理・化学的メカニズムの解明は重要な課題として長年に渡り取り組まれている。近年、核生成の過程は、例えばタンパク質結晶の場合、濃集液滴などの前駆物質が生成し、そこから結晶核が生成する、というように、多段階の核生成経路が提案されている。このような過程は、溶液などの環境相から安定な結晶ができるまでの過程を連続的に観察することで調べることができる。これを可視化できる手法として期待されているのが溶液セルを用いた透過型電子顕微鏡法 (LC-TEM) である。LC-TEM は、薄膜 (ここではアモルファス窒化ケイ素) で溶液と TEM の高真空環境を隔てることで溶液を TEM で観察することを可能にする。そのため、溶液中の現象を TEM の高い時間・空間分解能で観察することができる。

一方、核生成は時間・空間的にランダムに生じる現象のため、この過程を TEM で捉えることは容易ではない。高い空間分解能で結晶化を捉えるためには、観察している視野内で結晶化をおこす必要がある。しかし LC-TEM では、観察視野内の溶液条件を操作し、結晶化を促進させるといった手段に乏しい。したがって、LC-TEM において効率よく結晶化の過程を捉えるには、溶液セル内部の溶液条件を能動的に操作できる手法の開発が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、溶液セル内部の溶液条件を能動的に操作できる手法の開発を行う。その手法として、(1) 放射線分解 + 貧溶媒、(2) 誘電泳動現象、(3) 試料冷却 TEM ホルダー、を利用する手法について検討する。また、これらの手法のタンパク質の結晶化に対する応用について検討する。

3. 研究の方法

溶液セル中で結晶化を効率よく起こすためには、溶液の過飽和度を高くすることが必要である。そのため、観察中に溶液セル内部の溶液の過飽和度が高くなるように変える必要がある。過飽和度 σ は、溶液中の溶質濃度 C と溶解度 C_s で表される [$\sigma = \ln(C/C_s)$]。 C_s は温度により変化し、一般的には溶液温度を下げると C_s は小さくなる。そのため、過飽和度を高くするには、溶質濃度 C を上げるか、温度を下げる、といった操作が必要になる。

このような操作を溶液セル内部で行える方法として、(1) 放射線分解 + 貧溶媒、(2) 誘電泳動現象、(3) 溶液セル冷却ホルダー、に着目した。以下にそれぞれの手法について示す。

(1) 放射線分解 + 貧溶媒

水に電子ビームが入射されると、電子ビームのエネルギーの一部が水に付与され、水分子が放射線分解を起こす。その結果、水素ラジカルやヒドロキシラジカル、水素や酸素などが生成される。このような変化を利用して溶液組成を変え、溶液の過飽和度を高くする。一方、放射線分解による化学種の生成量が結晶を生成させるほどではない可能性がある。そのため、溶媒には溶解度が極端に小さくなる貧溶媒を用いた。ここでは塩化ナトリウムの結晶化を、塩素酸ナトリウムのアセトン溶液 (アセトンは塩化ナトリウムと塩素酸ナトリウムの貧溶媒) に電子ビームを照射することで、能動的に生じさせることに成功した。

(2) 誘電泳動現象

誘電泳動 (DEP) は、不均一な電場に誘電体粒子がおかれたとき、粒子の誘電分極に起因して粒子が力を受けて移動していく現象である。これを利用することで、粒子を集めたり離散させたりすることができる。粒子が受ける力 (誘電泳動力) は、媒質や粒子の誘電率、電場勾配、粒子径などに依存し、電場勾配や粒子径が大きいほうが誘電泳動力は大きくなる。溶液セル中に不均一電場を作るために、電極を搭載した溶液セルを用いた。電極には交流電圧を印加することで、その周囲に不均一電場を生成した。既存の電極を搭載した溶液セルを用い、コロイド粒子を電極周りに集める実験を行った。また、誘電泳動力でタンパク質分子を集めるための電極を搭載した溶液セルをデザイン、作製し、これを用いてコロイド粒子、タンパク質分子を電極の周りに集める実験を行った。観察は TEM のほかに光学顕微鏡を用いて行った。

(3) 溶液セル冷却ホルダー

TEM 観察には専用の試料ホルダーを用いる。この試料ホルダーに様々な機構 (温度制御や電圧印加など) を持たせることで、観察中に試料の条件を変えて観察することができる。これまで試料の温度を制御できるようなホルダーは存在していたが、室温 ~ マイナス数十°C といった温度範囲を制御できるホルダーはなかった。近年、ペルチェ素子を用いて温度制御をする試料ホルダーが開発され、このような温度範囲での温度制御が可能になった。この温度範囲は水や溶液からの結晶化に最適である。溶液を冷却することで過飽和度の制御を試みるため、この試料ホルダーと溶液セルを組み合わせたシステムを作製した。このシステムを評価するため、まず水を試料

として、その結晶化実験を行った。

4. 研究成果

研究の方法で示した3つの項目についてそれぞれ記す。

(1) 放射線分解 + 貧溶媒 (T. Yamazaki & Y. Kimura, *Microsc. Microanal.* **27**, 459–465, 2021.)

塩素酸ナトリウムのアセトン溶液に電子ビームを照射すると、塩化ナトリウムの結晶が晶出した。この結晶化は、まず、塩素酸イオンが電子ビームによって放射線分解して塩化物イオンを生成し、塩化物イオンと元々溶液中に存在していたナトリウムイオンによって塩化ナトリウムがアセトン中で過飽和になった、ために生じた。アセトンよりも塩素酸ナトリウムや塩化ナトリウムの溶解度が高い溶媒(水、エタノール)を用いて同様の実験を行ったところ、結晶が出現する様子は捉えることができなかった。このことは、塩化ナトリウムを過飽和にするほど塩化物イオンが放射線分解によって生成しなかったことを示唆する。

タンパク質の結晶化においては、塩を添加することでその溶解度を制御することができる。元々初期の溶液に存在しなかったイオンを電子ビームに照射することで生成できることは、LC-TEM でその場観察しながら溶液をタンパク質が結晶化できる条件に操作できる可能性がある。一方、どのくらい電子ビームを照射するとどのくらい化学種が生成するかを評価することが必要になる。現状では、モデル計算によって評価するしかないため、実験的に評価できるような手法が望まれる。

(2) 誘電泳動現象 (T. Yamazaki *et al.*, *Microscopy* **71**, 231–237, 2022; T. Yamazaki *et al.*, *Microsc. Microanal.* **28**(S1), 1934–1936, 2022.)

既存の電極を搭載した溶液セルは、その電極間の距離が短いため、タンパク質分子を操作できるほど大きな誘電泳動力を生じさせることができない。そのため、既存の溶液セルでは、その粒子径がタンパク質分子よりも大きなコロイド粒子を用いて実験を行った。まず、光学顕微鏡用の試料ホルダーを用い、電極を搭載した溶液セルを作製した。電極に交流電圧を印加し、コロイド粒子に誘電泳動力を働かせたところ、コロイド粒子を電極の周りに捕捉することができた。また、粒子が電場から受ける力と溶液の流れを利用して、コロイド粒子を2次元結晶状に規則的に配列させることができた。また、同様の実験をLC-TEM用の試料ホルダーを用いてTEM観察したところ、光学顕微鏡と同様な事象は観察されず、電場によって数珠状になった粒子が電極の先端に捕捉される様子が観察された。これは、コロイド粒子にかかる誘電泳動力が光学顕微鏡で観察したときよりも弱いことを示す。この要因として、電極先端に十分な電圧が印加されていないことが考えられる。さらにこの要因として、クロストークによる電圧信号の減衰や電極周囲の薄膜にしわが入ることが考えられる。

粒子にかかる誘電泳動力を強くし、タンパク質分子程度のサイズの粒子でも捕捉できるようにするため、電極間ギャップを短くした(～数 μm)溶液セルを作製した。これを用いてコロイド粒子、タンパク質分子に誘電泳動力を働かせて電極間に捕捉する実験を行った。まず、光学顕微鏡で観察したところ、両者において電極間に捕捉される様子が観察された。同様の実験をLC-TEMで行ったところ、まず、既存の溶液セルでは捕捉できなかったコロイド粒子において、粒子を捕捉することに成功した。一方、タンパク質分子においては捕捉される様子を観察することができなかった。この要因として、放射線によるダメージ、コントラスト不足、電極先端に十分な電圧が印加されていないことが挙げられる。これらの解決策として、ラジカル捕捉剤の利用による放射線ダメージの低減、結晶性試料にすることによるコントラストの向上、TEM試料ホルダーに同軸ケーブルを内蔵させる、などが挙げられる。

(3) 溶液セル冷却ホルダー (T. Yamazaki *et al.*, 2023, under review.)

水を試料として溶液セルに封入し、ペルチェ式冷却ホルダーを用いて溶液を冷却しながらTEM観察を行った。溶液を冷却していくと、重心位置が動かない気泡が生成した。試料の薄い箇所を選択し、そこから電子回折図形を取得、解析したところ、六方晶の氷が生成していることが分かった。また、温度を上昇させていくと、気泡が動いたり、消失したりする様子や、氷が液体になる様子が観察された。これらのことから、溶液セルを冷却することで氷を生成し、温度を上昇させることで水に戻すといった、温度変化による過飽和度の制御に成功した。また氷の表面から気泡が抜ける様子から、氷表面の状態や表面復元のメカニズムなどを解析した。

本手法は冷却によって過飽和度の操作ができる結晶化系に応用することができる。そのため、タンパク質の結晶化系はもとより、無機塩などを含めたより多くの系に応用することが可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamazaki Tomoya, Kimura Yuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Radiolysis-Induced Crystallization of Sodium Chloride in Acetone by Electron Beam Irradiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microscopy and Microanalysis	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S1431927621000179	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 Yamazaki Tomoya, Niinomi Hiromasa, Kimura Yuki	4. 巻 71
2. 論文標題 Feasibility of control of particle assembly by dielectrophoresis in liquid-cell transmission electron microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 231 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfac021	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 -

1. 著者名 Yamazaki Tomoya, Niinomi Hiromasa, Katsuno Hiroyasu, Hosseinkhannazer Hooman, Daigle Eric, Kimura Yuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Is dielectrophoresis effective for increasing local concentration of particles in liquid-cell transmission electron microscopy?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy and Microanalysis	6. 最初と最後の頁 1934 ~ 1936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S1431927622007565	査読の有無 無
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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tomoya Yamazaki, Hiromasa Niinomi, Yuki Kimura
2. 発表標題 Control of particles by AC field and its applicability in LC-TEM for observing crystallization and dissolution processes
3. 学会等名 JpGU 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎智也, 木村勇氣
2. 発表標題 溶液セルTEMにおける結晶化条件制御方法の検討
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第77回学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoya Yamazaki, Yuki Kimura
2. 発表標題 Supersaturation control for observation of crystallization in liquid-cell transmission electron microscopy
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamazaki Tomoya, Kimura Yuki
2. 発表標題 Radiolysis-induced crystallization process of salt in liquid cell transmission electron microscopy
3. 学会等名 JpGU-AGU Joint Meeting 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎智也, 新家寛正, 勝野弘康, 木村勇氣
2. 発表標題 溶液セル透過型電子顕微鏡法におけるサブミクロンサイズの粒子の誘電泳動
3. 学会等名 JpGU 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoya Yamazaki, Hiromasa Niinomi, Hiroyasu Katsuno, Hooman Hosseinkhannazer, Eric Daigle, Yuki Kimura
2. 発表標題 Is dielectrophoresis effective for increasing local concentration of particles in liquid-cell transmission electron microscopy?
3. 学会等名 M&M 2022, on-demand (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎智也, 屋嶋悠河, 宮崎裕也, 權堂貴志, 木村勇氣
2. 発表標題 ペルチェ式冷却TEMホルダーと溶液セルを用いた結晶化その場観察
3. 学会等名 JCCG-51
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎智也, 屋嶋悠河, 勝野弘康, 宮崎裕也, 權堂貴志, 木村勇氣
2. 発表標題 ペルチェ式冷却TEMホルダーと溶液セルを用いた氷結晶その場観察
3. 学会等名 JpGU 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎智也, 屋嶋悠河, 勝野弘康, 宮崎裕也, 權堂貴志, 木村勇氣
2. 発表標題 溶液セルとペルチェ式冷却TEMホルダーを用いた氷結晶のその場観察
3. 学会等名 The 79th Annual Meeting of the Japanese Society of Microscopy
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomoya Yamazaki, Yuga Yashima, Hiroyasu Katsuno, Hiroya Miyazaki, Takashi Gondo, Yuki Kimura
2. 発表標題 Liquid Cell Transmission Electron Microscopy of ice crystals and bubble behaviors in the ice
3. 学会等名 PCI-2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1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
---------	---------