

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 6日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～2012

課題番号：22540418

研究課題名（和文） 環境制御型透過電子顕微鏡を用いた生体高分子の直接観察法の開発

研究課題名（英文） Development of direct observation method of bio-molecules by using environmental phase plate transmission electron microscopy

研究代表者

箕田 弘喜（MINODA HIROKI）

東京農工大学 大学院工学研究院・准教授

研究者番号・20240757

研究成果の概要（和文）：

環境制御透過電子顕微鏡法（E-TEM）と位相差電子顕微鏡法（P-TEM）を記見合わせた方法を開発した。この方法は、液体中にある生体高分子の分子レベルでの構造観察を可能にしてくれる。本研究では、この方法により染色していない、液中にある生体高分子である。ミオシン分子を10nm分解能で直接観察することに成功した。試料周りの溶液層の厚みが厚くなると、電子の干渉性が低下し、像コントラストが低下することが、実験的にも計算でも確認された。

より高い分解能を実現するため、新しいwet cellを開発した。樹脂をスペーサーとして用いることで水膜厚さをある程度制御する構造となっている。像質は、ガスフロータイプのwet-cellに比べて向上し、DNA試料を2nm以下の分解能で観察することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

We have been developing a combination method for environmental TEM (E-TEM) and phase-plate TEM (P-TEM) that enables direct observations of the structure of biological molecules in aqueous solution. It is clearly demonstrated that the biological molecules in a water layer can be imaged by the combined method without any stain. The spatial resolution obtained in the present study was about 10 nm. This should be improved by using energy filtering. The image contrast of the specimen in water was reduced in comparison with that in vacuum. A model calculation that includes the effects of beam broadening, intensity decrease, and background increase caused by scattering from the water layer around the specimen shows that an increase in the thickness of the water layer reduces the contrast, intensity, and resolution of the image.

A carbon sandwich environmental cell for wet specimen was developed for environmental transmission electron microscopy. A plastic film with many holes was used to form carbon capsules. The samples and experimental solution are enclosed in the capsules made of the spacer and two carbon films. The thickness of water layer can be controlled by changing conditions to prepare the plastic spacers. The quality of the images was improved comparing with our previous environmental cell which can circulate gas around samples and 2nm resolution was obtained by using loosely condensed DNAs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,00	4,420,000

研究分野：ナノサイエンス

科研費の分科・細目：物理学・生物物理・化学物理

キーワード：環境制御 TEM,生物分子,位相差像

1. 研究開始当初の背景

生体现象の研究では、機能発現過程の構造を分子レベルの空間分解能で直接観察して調べることが重要である。しかしながら、研究開始当初において、生体高分子の構造を分子レベルの分解能で直接観察する分析手法は存在しなかった。透過電子顕微鏡法は、ナノスケールの空間分解能での構造を実時間観察することが可能な装置であるが、その嫌気性、嫌液性のため、通常の使用法では生物試料を“生きたまま”直接観察することはできず、生物試料の構造を“生きたまま”の状態直接観察できるようにするための、装置、手法上の開発が必要であった。

2. 研究の目的

上記の研究背景の中、生体高分子の構造を直接観察する顕微鏡法を開発し、この分野の研究の飛躍的に発展させるために、液体中での生体高分子の構造を無染色で直接高分解能観察可能な透過電子顕微鏡法を開発することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

“生きた状態”で生体高分子を直接観察するために、我々が所有している既存の環境制御型電子顕微鏡JEM-2000EXに位相板を取り付けることを可能にする位相板ホルダーを取り付け、位相差電子顕微鏡法を用いて、液中の生体高分子の直接観察を目指す。高分解能観察には、試料周りの環境制御が重要である。そこで、環境制御セルの隔壁とし

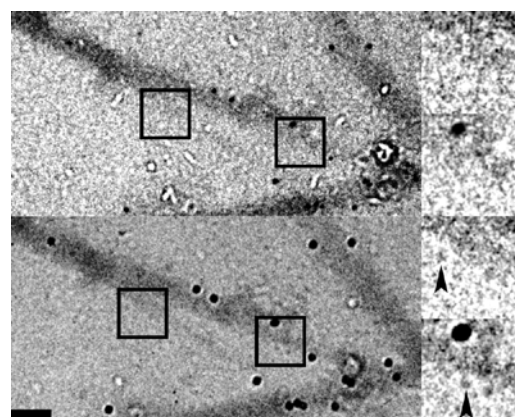


図1 上：通常像、下：位相差像  
右はそれぞれの像の右側の四角部分の拡大像。下の位相差像で、試料の像コントラストが増強されていることがわかる。

て市販の SiN グリッドを購入し、最適結像条件を検討する。必要に応じて FIB を利用して SiN グリッドを加工し、高コントラスト化、高分解能化を目指す。生体高分子は、電子線照射による損傷の影響が大きいので、DNA 分子についての観察も試みる。

4. 研究成果

(1) 液中にある生体高分子の位相差法による直接可視化に成功

溶液中にある生体高分子、具体的には、骨格筋の構成分子であるミオシン分子を使って合成したミオシンのフィラメントを位相差電子顕微鏡法で、位相増強を行い直接可視化することに成功した。図1にその例を示す。上は、通常法による像であり、下は、位相差像による像である。図には2か所四角で囲んだ領域があるが、その左側を見比べると、上

では、ほとんどコントラストが得られていないのに対し、下では、フィラメント状の構造が暗く見えており、コントラストの増強効果が明瞭に見て取れる。さらに、右側の四角の領域を見比べると、黒く見える金粒子にそばに、右側の拡大像で、矢頭により指し示したようにミオシン分子の頭部の楕円状の構造が位相差像では明瞭に見えている。ミオシンの頭部は、20nm×10nm程度の大きさの座円形であることから、下の位相差像は10nm程度の分解能は明らかに得られていることがわかる。

この結果から、10nm程度の分解能で液中にある生体高分子の構造の直接可視化を10nm程度の分解能で観察できることが示された。液中にある生体高分子の位相差法による直接可視化に成功したのは、我々が、世界で初めてである。

(2)モデル計算により、環境制御位相差電子顕微鏡法による生体高分子の直接可視化に対する分解能の見積もりを行った。

液中にある生体高分子を電子顕微鏡により可視化しようとする際に、試料周りには水などの環境分子により、電子波は弾性散乱を受ける。位相差電子顕微鏡法は可干渉性のある電子の干渉を使った結像法であることから、電子の非弾性散乱により、得られる分解能やコントラストが低減することが予想される。

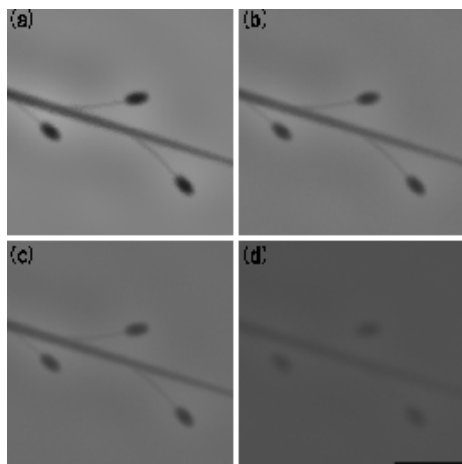


図2 モデル計算。水膜の厚さは(a)0nm、(b)100nm、(c)200nm、(d)500nmで、スケールバーは50nm

(1)で述べたように、この方法で10nm程度の分解能での生体高分子の直接可視化に成功したものの、理論上、この方法でどの程度までの分解能が得られるのかについての検

討が十分になされているとは言えない。さらには、その見積もり方法についても確立した方法は存在しない。そこで、本研究課題で、得られる分解能について、モデル計算により検討を行った。図2に示すように水の膜の厚さを変えてミオシン分子をモデル化した簡単な連続体モデルについて計算を行った。

図に見られるように、水膜厚さ200nmにおいても、ミオシン分子の頭部を支えている長い枝(厚さ2nm)がバックグラウンドからは分離して位相コントラストが得られている。すなわち、水の厚さが200nm程度の場合でも、2nm程度の分解能は得られるという計算結果が得られた。

(3)より高分解能、高コントラスト観察のための封じ切りタイプのwet-cell開発

(1)に記述したように実験的に得られた分解能は、10nmを切る程度と、実験と計算で得られた結果の隔たりは大きい。計算結果の間で、分解能についての隔たりは大きい。また、実験的に得られた分解能では、分子レベルでの試料の構造観察には不十分である。この隔たりの要因の1つは、使用しているwet-cellが、ガスフロータイプのセルであり、0.2mm以上の厚さで約1気圧の空気分子の層が存在するため、その空気分子による非弾性散乱、差には、1気圧の耐圧を維持するために、構造上厚めのwindow膜を使用する必要があり、このwindow材料も非弾性散乱の原因になることが挙げられる。そこで、水以外の分子による非弾性散乱の効果を極力抑制するために、水膜を完全に封じ込める、いわゆるcloseタイプのwet-cellを開発することとした。

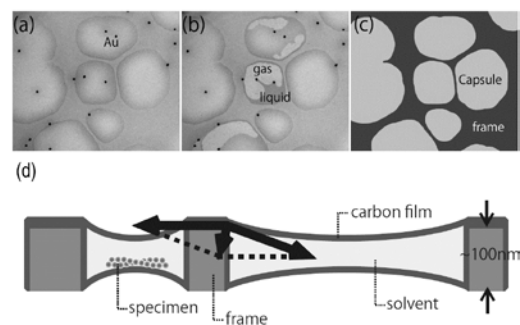


図3 (a)、(b)封じ切りタイプのwet-cellを使用して観察した溶液中の金粒子のTEM像と(c)、(d)その模式図。

その結果、上下2枚のアモルファス炭素膜によって試料を溶液ごと封じ込めることに成功した。図3は、溶液中にある金粒子を封じ

込めた時の電顕像を示したものである。図にはいくつもの円形の穴があり、これらは、孤立した小さな部屋になっている。電子線照射前後の(a)と(b)の像を比べると、(b)では、一部の部屋(カプセル)に穴が開き、像が変化していることから、水の封じ込めができていくことがわかる。

この wet-cell を使って、DNA の像取得を行った。結果を図 4 に示す。

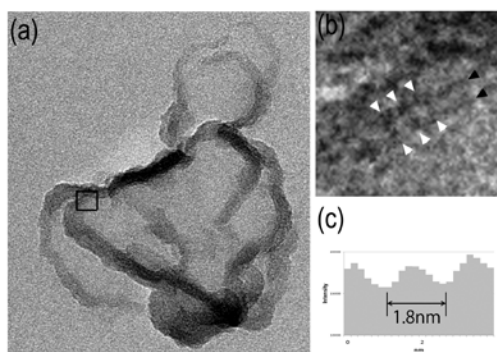


図 4 (a)不完全に凝集した DNA の TEM 像と、(b)一部の拡大像と (c)その強度プロファイル

DNA の 2 重らせん構造が 2 本分裂して見えていることがわかり、1.8nm の分解能で、2 本の DNA がはっきりと分離されて見える。この像から、新しく開発したサンドイッチタイプの wet-cell で 2nm 以下の分解能で分子の直接観察が可能となった。

ここで述べたように、新しく開発した wet-cell と位相差法を組み合わせることで、1nm 程度の分解能で、溶液中にある生体高分子の直接観察を実現する観察手法が開発に成功した。この研究成果は、今後“生きた”状態の生体高分子の構造評価に大きな進展をもたらすと考えられる。

## 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 2 件)

(1) A carbon sandwich environmental cell for wet specimens

Y.Inayoshi and H.Minoda, Microscopy (2013) in press doi:10.1093/jmicro/dft027 (査読あり)

(2) Direct observation of biological molecules in

liquid by environmental phase contrast transmission electron microscopy

Y. Inayoshi, H. Minoda, Y. Arai and K. Nagayama, Micron **43** (2012) 1092-98.

doi:10.1016/j.micron.2012.02.001 (査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

(1)環境制御型電子顕微鏡の生体応用

箕田弘喜

日本顕微鏡学会研究部会「環境制御型電子顕微鏡」第 3 回研究会. (invited)、名城大学, 2012 年 11 月 16 日.

(2)環境制御型電子顕微鏡法と位相差顕微鏡法の統合によるバイオイメージング

箕田弘喜

平成 24 年度生理科学研究所研究会.(invited), 生理研, 2012 年 10 月 25 日.

(3)環境制御・位相差電子顕微鏡による生体高分子の観察

稲吉悠里, 箕田弘喜

日本電子顕微鏡学会第 28 回分析電子顕微鏡討論会(invited)、幕張メッセ、2012 年.. 9 月 4 日

(4) Bio-imaging of Specimen in liquid by using environmental phase plate transmission electron microscopy

Y.Inayoshi and H.Minoda et al. Microscopy and Microanalysis 12 (USA, Phoenix) (2012/8/1)

(5)First Direct Observation of Biological Molecules in Liquid by Environmental Phase Contrast Transmission Electron Microscopy

Y.Inayoshi and H.Minoda et al. Microscopy and Microanalysis 11 (USA, Nashville) (2011.8.9)

(6) 環境制御・位相差電子顕微鏡による生体高分子の観察

稲吉悠里、箕田弘喜、日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会、福岡国際会議場(2011/5/18) ..

(7) 環境制御型電子顕微鏡の生体高分子への応用

箕田弘喜、科学技術交流財団研究会.. (invited)、名古屋大学, (2011/3/2)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

箕田 弘喜 (MINODA HIROKI)

東京農工大学 大学院工学研究院・准教授  
研究者番号：20240757

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし