

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012 ～ 2012

課題番号：24657075

研究課題名（和文）クライオトモグラフィ法に適したクライオホルダーの開発に向けての試験的研究

研究課題名（英文） Experimental development a new cryo-holder suitable to electron cryo-tomography

研究代表者 安永 卓生 (YASUNAGA TAKUO)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

研究者番号：60251394

研究成果の概要（和文）：

クライオ電子顕微鏡法のために、低振動クライオポンプを用いた試料ステージを設計し、試験的開発を開始した。また、従来のクライオホルダーの液体窒素を真空引きすることにより、ステージの低温化が可能であることを示し、かつ、真空ホース等の工夫により、振動を抑え、観察可能であることも明らかとした。今後、両者の技術を総合し、ホルダーの本格的な開発を開始する。

研究成果の概要（英文）：

The new cryo-holder suited to electron cryo-tomography was planned by using low-vibration cryo-pump and has been developed. Furthermore, conventional liquid-nitrogen-type cryo-holder was tested and successfully achieved a lower-temperature stage than conventional one by drawing vacuum with vacuum pumps. Hoses for vacuum drawing were important for less vibration of the stage and better hoses give the stable stage to obtain electro micrographs. Currently we are planning to develop a new holder by combining both techniques.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学、構造生物化学

キーワード：クライオ電子顕微鏡、構造生物学、電子顕微鏡法、試料ホルダー、蛋白質構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

本研究課題は、生命構造研究において重要な手法の一つであるクライオ電子顕微鏡法のコントラスト改善と利便性の改善を目的とした、新たな無冷媒、低振動、極低温観察ステージ・ホルダーの作成を目標とする研究開発である。現在に到っても、国内外での本格的な開発は報告されておらず、全く斬新なものである。

また、電子顕微鏡用低温ホルダーの開発は、世界的には、ほぼ一社の独占状態にあり、こ

こ10年新たな低温ホルダーの開発がストップしている。特に、極低温ホルダーに関しては、その持続時間から、実用可能な水準の極低温ホルダーは開発されていない。そのため、主として、電子顕微鏡本体への組み込まれた特殊な極低温ステージとして商品化されているに過ぎない。

以上の点から、クライオ電子顕微鏡の実現には、特殊な高価な電子顕微鏡の購入が必須となってきた。また、昨今、クライオ電子線トモグラフィなど、長時間の自動撮影が必

要な観察方法により、細胞の三次元構造を始めとして新しい生物学的知見が電子顕微鏡法によりもたらされている。しかし、この場合、長時間の観察が必須であり、かつ、傾斜時にも液体窒素等の冷媒の漏れが問題となっていた。

そこで、無冷媒であれば、観察時間及び傾斜角度の制限が無くなり、クライオ電子線トモグラフィ法に適したホルダー等の新たな開発に繋がると考えられた。

## 2. 研究の目的

生命の分子から細胞までの構造を、生の状態で観察できる強力な手法のひとつが「クライオ電子顕微鏡法」である。これまで、電子顕微鏡法は、重原子染色等を用いて観察されたが、現在では、氷包埋法などに加え、極低温電子顕微鏡が開発され、無染色でタンパク質や細胞の生きた構造を観察できる。液体窒素を用いた低温ステージから、液体ヘリウム温度の極低温ステージが開発され、電子線からのダメージを避け、原子分解の構造解析が可能となった。昨今、極低温では、耳解決の理由でコントラストを失うことがわかり、50K程度の温度が使われている。しかし最適は未定である。本研究では、低振動型クライオポンプもしくは固体窒素による温度コントロール可能ホルダーの開発調査に着手し、クライオ電子顕微鏡の新たな段階の貢献に寄与することが目的である。

## 3. 研究の方法

温度コントロール可能な低振動型クライオスタットを用いる方法、真空引きによる固体窒素を用いる方法の2者を中心に検討しながら、電子顕微鏡用極低温ステージの試験的研究を実施した。第1に、低振動型クライオスタットを購入し、電子顕微鏡ホルダーと接続（非接触・輻射型、気体接続、細線接続など）する方法を検討し、達成温度と振動に対して観察することを当初計画した。実際には、簡易試験、設計段階で終了している。第2に、振動を補償するための piezo 素子等との接続を検討することとした。実際には、上記の1のため、検討することができていない。第3に、真空引きによる固体窒素による達成温度等について検討することとした。従来の液体窒素ホルダーの液体窒素デュアをドラッグポンプで真空引きすることで実施した。さらに、その真空引きのためのホースの材質長さに関して検討した。第4に、これらの実験を通して、極低温でのコントラストを測定し、その原因を明確化することとした。以上

のステップを通して、当該極低温ステージの開発のための基礎データを収集し、試作品を作成することを目指した。

## 4. 研究成果

当初予算の削減により、低振動型のクライオスタットを用いた電子顕微鏡ホルダーとの接続の全ては実現しなかった。現時点では、当該クライオスタットを購入し、接続に向けた設計図を設計し、試験的な開発を開始した段階である。ここでは、50K程度を目標にした低振動型ホルダーの開発設計書がテストデータと共に示され、現在もまた、交付金等による予算と合算しながら、開発を進めている。

また、真空引きによる方法に関しては、実験を進めた。真空ホース等の弾性、及び、強さ等を検討し、結果として、通常のドラッグポンプを用いて、通常-175度程度までしか冷却できないホルダーを使って、-190~-200度の低温（10度から15度低下）が実現することができることが分かった。図1は、その内の一つの例を示したものであり、15分程度で安定した温度となっていることがわかる。この温度は、液体窒素が固化する温度であり、実際に、デュアの中で、液体窒素が固化していることも確認した。

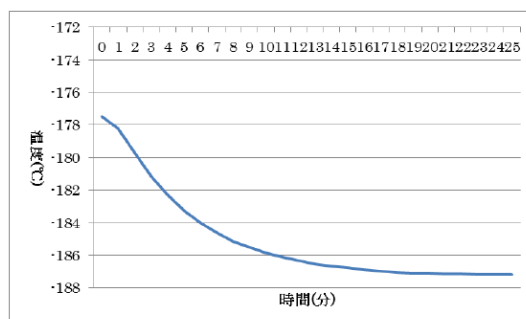


図1 真空引きによる温度低下のプロファイル。横軸は、真空引きを開始してから時間[分]。縦軸は、ホルダー先端の温度。

また、適した真空ホースを選択することにより、ホルダーの振動を抑え、真空引きの段階でも撮影が可能であり、その振動は1nm以下に抑えていることがわかった。図2にその撮影された写真を示す。真空ポンプのON/OFFのいずれの場合も同様の画像が撮影できていることがわかる。

このとき、利用した真空ホースに関して、柔らかすぎると真空を引く際につぶれてしまうが、硬いすぎる場合にはポンプの振動がそのまま振動が伝わるということが分かった。途中

に適切に柔らかい部分をもつことで振動を伝達せず、真空を引くことができる。上述のデータはそのようにして選択したホースを示しているが、今後もその材質の最適なものを検討する必要がある。

また、継続時間は2時間程度であり、十分に観察可能である。上述のように、温度の低下には、15分程度が必要であることがわかり、かつ、途中で、液体窒素を追加した場合には、温度の上昇があるため、同様の時間が必要であった。

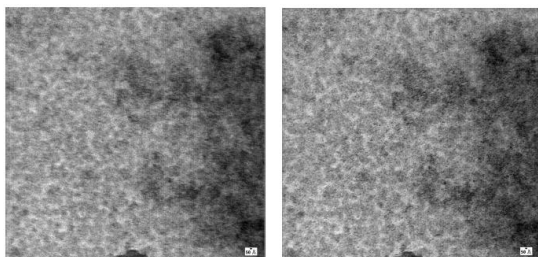


図2 真空引きによる振動のチェック。  
(左) ポンプがONの状態。(右) ポンプがOFFの状態。いずれの場合も同様の画像が観察できる。

図3に示したものは、真空引き時にポンプを停止した場合、その後のドリフトの状態を示したものである。最初の20秒程度は、温度上昇もなく、ドリフトも非常に少ないことがわかる。これらのことから、図2にあるように、ポンプON時に十分に視野の確認は可能であり、かつ、図3で示したように撮影時間(数秒以内)内では、ドリフトがほとんどない状態で写真の撮影を行うことが可能であることが示された。

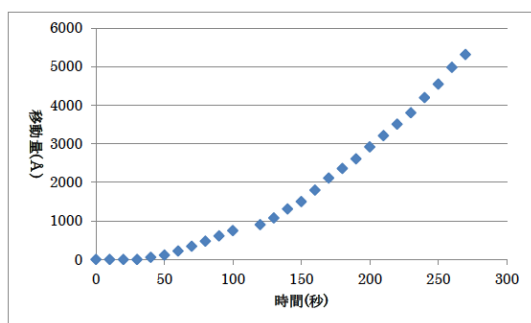


図3 ポンプ停止後のドリフト。横軸は、停止後の時間[秒]、縦軸は、ドリフト量。

以下には、上記の結果を受けて、今後の開発に向けたアプローチを列挙する。

真空引きをする方法では、更に、温度を低下させる必要がある。そのためには、更に、真空度を下げる必要があり、今後、パワーの

ある真空ポンプを使って検討する必要がある、現在もまた、交付金等による予算と合算しながら、開発を進めている。

また、液体窒素デュアが小さいために、真空引きによる液体窒素の消費が大きい。従って、本方法は、ステージ開発レベルに有効である可能性があり、ホルダーの場合にはその時間が短い(2時間のワーキングタイムに対して、20分程度の再充填・真空引きの時間が必要となる)ことが想定される。

クライオスタットを使った方法に関しては、H24年度中に完成させるには予算上困難であった。そのため、H25年度も含めて、継続的に開発を進めている。

ドリフトに関しては、予想通り、温度変化に応じて、生じた。一方で、止めた時間が10秒以内であれば、ほとんどドリフトをおこさないことも分かった。システムとして、撮影時に真空引きを止めるための電磁バルブシステム等を導入し、制御することで、ドリフトや振動を抑えたシステムの構築が可能である。

最終的に、今回、2つの手法を検討したが、また、未解決の問題も多い。いずれも、本成果は、今後も引き続き、試験され、具体的なホルダー開発に結びつける方向で継続的に研究を進めている。

ここで、本研究の成果の方向を示すものとして、関連した研究を雑誌論文として列挙した。これらは、すべて電子顕微鏡及びその処理方法に関する論文であり、研究代表者のもつクライオ電子顕微鏡技術およびその開発技術に依存した成果である。

## 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3件)

1. Fukunaga, Y., Higashihara, A., Nishino, Y., Yasunaga, T., Jin, M. & Miyazawa, A. (2012). Enhanced detection efficiency of genetically encoded tag allows the visualization of monomeric proteins by electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy* **61**, 229-236. (査読有)
2. Jing, Y., Dan, L. C., Shiori, T., Kotaro, K., Takuo, Y., Shinji, H. & Kang, S. (2013). Kinesin-1 regulates dendrite microtubule polarity in *Caenorhabditis elegans*. *eLife Sciences* **2**. (査読有)
3. Matoba, K., Takagi, J., Yasunaga, T., Jinnai, H. & Iwasaki, K. (2012). Tilt-angle measurement of a sample stage

using a capacitive liquid-based  
inclinometer. *Journal of Electron  
Microscopy* **61**, 193-198. (査読有)

[その他]

ホームページ等

[http://www.yasunaga-lab.bio.kyutech.ac.  
jp](http://www.yasunaga-lab.bio.kyutech.ac.jp)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安永 卓生 (YASUNAGA TAKUO)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教  
授

研究者番号：60251394