

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25610118

研究課題名(和文) ウエット試料のその場瞬間凍結法の研究

研究課題名(英文) Study of rapid freezing method of wet bio-specimens

研究代表者

箕田 弘喜 (Minoda, Hiroki)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20240757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：急速凍結の実現を目指した特殊冷却ホルダーを設計・製作した。冷却テストにより、冷却タンクにつながる熱伝導棒の先端部での温度計測の結果、最低到達温度 -164°C を実現した。これは、市販の冷却ホルダーと同程度である。一方、試料先端部は、熱伝導棒との接続を切った状態で、最低到達温度約 -30°C 、接触した状態で、伝導棒の温度より約 30°C 高いという結果が得られた。最低到達温度や冷却速度については、概ね目標を達成できたが、接触を切った状態の温度がやや低く、wet状態の試料観察ができないことから、ホルダーを改造が必要であることが分かった。今後、構造の再検討を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：A rapid freezing cryo-specimen holder was constructed to investigate a change of the structure of specimen during rapid freezing processes. After the construction the cooling tests were carried out. The temperature at the top of the heat conducting rod down to -164°C . This is almost the same as commercial type cryo-holder. The temperature at the sample position was about 30°C higher than the top of the heat conducting rod when the heat conducting is on. This temperature level is similar to that I expected. When the heat conducting off state change to the on state the temperature down to this temperature level about 1min. These performance is a sufficient level. However, the temperature at the heat-conducting off state was about -30°C . The specimen should freeze at this temperature and rapid freezing experiment should be impossible. Thus, reconstruction of the the holder structure is still necessary.

研究分野：電子顕微鏡学

キーワード：環境制御電子顕微鏡 クライオ電子顕微鏡 試料瞬間凍結

1. 研究開始当初の背景

我々は、生命現象の解明を目指して研究を進めてきており、そのためにたんぱく質の動態研究を進めている。生物試料を生きたままの状態に保持して電子顕微鏡で構造観察することを目指した手法、装置の開発が近年活発化してきているが、水中にあるたんぱく質分子の直接可視化を実現しているのは、応募者を含めて世界で数グループに過ぎない。応募者は、電子顕微鏡による生体高分子の構造変化のダイナミクスの計測を実現すべく、電子顕微鏡法の開発を推進しており、電子顕微鏡と光学顕微鏡の機能を組み合わせた装置である電子・光子ハイブリッド顕微鏡を開発した。この装置は、電子顕微鏡の光学系に光学顕微鏡のレンズを組み込んだもので、2つの顕微鏡の同一視野同時観察が可能である。したがって、試料を浸水状態に維持し、蛍光顕微鏡により、生物試料の変化の過程を観察し、所要の構造変化が起こった段階で試料を凍結することができれば、その試料の任意の場所について拡大して電子顕微鏡による高分解能観察をすることで、生物試料の機能発現を担う部位の分子レベルでの構造評価が可能となる。電子顕微鏡内に浸水状態の試料を導入することは、近年の環境制御電子顕微鏡法 (E-TEM) を用いれば可能であり、応募者は、世界で唯一“活きた生体高分子”の構造変化を、電子顕微鏡を使って調べることを実現している。この E-TEM 法と急速凍結の組み合わせを実現することが本研究の目的である。

2. 研究の目的

生命現象の解明につながるたんぱく質の機能の研究には、機能発現時の構造の評価を分子レベルの分解能で行うことが最も直接的な方法である。我々は、生物試料の構造・機能の研究を進めるために、電子・光子ハイブリッド顕微鏡を開発した。この装置で、電子

顕微鏡像と光学顕微鏡像を同一視野同時観察が可能である。本研究課題では、この装置を利用して、“活きた生物試料”の構造を、光学顕微鏡で確認しながら機能発現過程の任意のタイミングで凍結し、その同一視野について電子顕微鏡による高分解能観察に適用できる試料作製法を開発することを目的として研究を行う。

3. 研究の方法

電子顕微鏡用に、浸水試料を電子顕微鏡中に挿入可能で、かつ瞬間凍結するための機構を組み込んだ試料ホルダーを開発し、液中試料観察中の任意のタイミングで試料を急速凍結することを実現する。計画の概要は以下の通り。

(1) 既存の低温ホルダーに浸水試料を取り付けて、電顕観察下で試料冷却を試みて冷却過程について時間計測を行い、用いる寒剤による冷却状態についての基礎データを収集する。

(2) 基礎データの結果を踏まえて、新たな試料ホルダーを設計・製作し、その動作評価を行い、急速凍結の実現を目指す。

4. 研究成果

初年度は、既存の低温ホルダーに浸水試料を取り付けて、電子顕微鏡観察下で試料冷却を試みる実験を中心に研究を進めた。実験に用いた試料は、乾燥状態の試料と、我々が、開発した炭素 2 重膜に液体試料を挟み組み合わせる分子間力セルを利用した。その結果、冷却には、20 分前後の時間がかかること、また、冷却時の観察の際に、液体窒素タンクに液体窒素を補充していく過程で、温度変化を原因とする非常に大きな試料の移動が生じることを確認した。温度変化による試料の移動は、確認前から想定されていたことであるので、確認すべき項目としては、どの程度の倍率であれば、同一視野を冷却中に追従できるかという点であった。倍率は、移動距離の大きさ

と、移動の速さに依存するので、試料グリッド上の観察位置に大きく影響するが、実験の際の目安として確認が必要であった。何度かの確認において、予想通り移動の程度は大きく、1 万倍程度の倍率にしてしまうと、たとえば、この方式で試料冷却をしたとしても、観察中その場で、試料の同一位置を追っていくことが難しいことが分かった。この知見は、我々の今後の実験を進めていく上で重要で、電子顕微鏡観察を想定した場合には、同一視野を常に観察し続けけることが大きいものの、我々は、電子光子ハイブリッド顕微鏡を使用しての実験が可能であるため、電子顕微鏡と同一視野で蛍光顕微鏡が可能であり、蛍光顕微鏡の倍率に置いては、十分に同一視野の追跡が可能であることが確認できた。

従来、我々が開発した試料の浸水状態を保持する炭素膜パッキングの分子間力 wet セルは、試料厚さも市販されている wet セルより薄く、冷却ホルダーに十分保持可能であること、また、セル全体の容積が小さく、熱容量が小さいので、急速凍結の用途には非常に適している構造であることも確認できた。上記、既存の装置を使用した予備実験と並行して、試料の急速凍結を目指した特殊冷却試料ホルダーの設計を進めた。

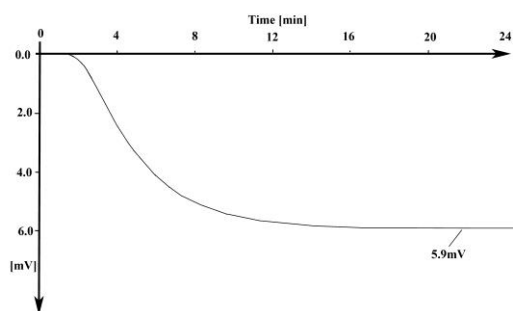
2 年度目は、1 年度目の基礎実験で得られた知見を参考に特殊冷却ホルダーのデザインを確定させて、設計を進め、その後、そのデザインに沿って思慮ホルダーの製作を行った。最終的に設計に当たった要件としては、以下の 3 点を最重要のポイントとした。

- (1) 冷却の on/off の切り替えが可能なこと。
- (2) 冷却 on の状態では、より効率よく試料を冷却できる構造にすること。
- (3) (3)冷却 off の状態では、冷却されたパーツと試料保持部の熱絶縁をなるべく大きくし、溶液試料が凍結することのない構造にすること。

完成した試料ホルダーの動作確認を行うた

めの治具として、真空断熱槽を既存の真空蒸着装置で排気するためのアダプターパーツと、試料先端部の温度計測を行うためのアダプターパーツも並行して作製した。しかしながら、ホルダーの真空断熱層の排気動作確認の時点で、真空断熱槽におけるリークのため、十分な冷却ができなかった。これは、熱伝導、および熱絶縁を両立する構造を実現するために、機械強度が十分に大きな構造でなかったために、冷客用窒素タンクを支えている構造に大きな負荷がかかったことによる。

そこで、ホルダー構造の設計変更を行い、機械強度の向上を行った。構造が当初より複雑になったことで、組み立て作業に予想以上の時間がかかったが、冷却テストにより、冷却タンクにつながる熱伝導棒の先端部での温度計測の結果、最低到達温度 -164°C を実現した。測定には、銅—コンスタンタンの熱電対を用い、電圧出力は、 5.9mV であった。室温を基準として電圧を出力させているので、冷却前の電圧出力を使った校正値は、 -4.95mV となり、温度に換算すると、上記にあるように -164°C である。時間変化のグラフを下図に示す。図の横軸は、冷却開始からの時間であり、縦軸は、銅—コンスタンタン熱電対の熱起電力である。冷却開始から 8 分程度で、概ね温度変化が亡くなっていることが分かる。この温度変化は、市販されている冷却ホルダーと同程度の性能を有していることが確認できた。



この結果は、冷却タンクから、熱接続の方式が、市販の冷却ホルダーの方式を参考に

設計したことから、予想通りの結果であるといえる。この上で、重要なのは、この伝導棒先端の冷却状態を如何に、試料に伝導させるかということであった。そこで、試料先端部についても温度変化を計測し、その結果、熱伝導棒との接続を切った状態で、最低到達温度約-30°C、接触した状態で、伝導棒の温度より、約 30°C高いという計測結果が得られた。また、凍結の速度については、1 分で、ほぼ最低到達温度まで、到達することから、現状実現できる温度特性としては、概ね満足できるレベルであると考えられる。現状では、接触した状態に実現する最低到達温度や、冷却速度については、概ね、目標を達成できているものの、接触を切った状態の温度がやや低く、wet な状態での観察ができないことから、熱絶縁の方策を再検討する必要があることが分かった。

今後、更に熱絶縁性を高める構造を検討して改造し、実際に急速凍結試料凍結後の構造評価を行い、氷晶形成の有無や、凍結に伴う構造変化の程度について検証し、その場急速凍結の可能性を探る。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

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・教授

研究者番号：20240757

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし