

2023年度 TIA 連携プログラム探索推進事業「かけはし」 調査研究報告書(公開版)

【研究題目】液体セル電子顕微鏡法のソフトマテリアル研究への応用探索

【整理番号】TK23-009

【代表機関】NIMS

【調査研究代表者(氏名)】

竹口 雅樹

【TIA 内連携機関：連携機関代表者】

高エネルギー加速器研究機構：山田 悠介

産業技術総合研究所：高橋 知里

筑波大学：岩崎憲治

【TIA 外連携機関】

無し

【報告書作成者】

竹口 雅樹

【報告書作成年月日】

2024年3月29日

【連携推進(具体的な連携推進活動内容とその活動の効果等)】

(1) NIMS 竹口と AIST 高橋

内容：共同研究の打ち合わせ&実施、外部資金の申請(三菱財団(代表者高橋、協力者竹口))

効果：菌のような数 μm サイズの試料でも封じ込めを可能とする厚い液体スペースを作る技術を確立した。

(2) KEK 山田と筑波大岩崎

内容：液中結晶性試料の測定

効果：筑波大施設では、これまで実績のないシンチレーター・ファイバーカップル CMOS カメラを用いて、最も効率的なマイクロ ED 測定システムの導入に成功し、本研究計画の土台となるシステムの構築ができた。

(3) 全参加メンバーによる報告会(オンライン)

内容：メンバーによる研究進捗報告と今後の計画について意見交換

効果：メンバーの研究内容が共有され、メンバー間による複数の共同研究に繋がった。

【調査研究内容(研究背景・課題解決の内容と結果)】

(1) グラフェン液体セル・幅広スペーサー液体セルの開発

場所：物質・材料研究機構

内容：グラフェンを用いた液体セル・マイクロウエルグリッドの開発に向け、グラフェン間への液体ポケットによる液体セルの高効率製法について検討した。グラフェン表面改質条件の最適化により、再現性良く高効率に安定なグラフェン液体セルを得る技術を確立した。グラフェン液体セル中の液体試料は高倍率 STEM 観察および分析にも耐え、原子レベル分解能観察やナノスケール元素マッピングを行うことができた。

バイオ試料は液体セルの上下膜により容易に押しつぶされてしまうため、それらを液中観察するためには、試料より大きなスペースを持つ液体セルが必要である。グラフェン液体セルのマイクロウエル化についてはグラフェン間へのマイクロ・ナノ構造物の挟み込みにより液体内ソフトマテリアルに対するある程度の自由液体空間を確保できることも分かった。また液体セルの窓の外側にサイズの均一なポリスチレン球を配置することで厚い液体スペースを作る技術を確立した。

本研究に関わる成果発表は以下のとおりである。

論文

- ・投稿準備中(1件)

学会発表

- ・日本顕微鏡学会学術講演会第80回学術講演会(2023年6月26日~28日、島根くにびきメッセ) 口頭発表
- ・日本顕微鏡学会第80回学術講演会(2024年6月3日~5日、千葉幕張メッセ) 発表予定

(2) ソフトマテリアルの液中 TEM 観察

場所：産業技術総合研究所、Diamond Light Source

内容：各種の液体セルおよび液体ホルダー(Protochips社製、DENS社製)を使用し、種々の高分子製剤および菌の液中での観察を実施した。市販の厚い液体セルを使用した場合には、菌が電子線照射時に観察窓から観察窓外に逃げてしまうことが明らかになった。一方で、NIMS 製の液体セルでは、厚い液体セルであっても観察窓内に菌が留まり、観察ができることが示唆された。今後、厚みの異なるセルで観察の実施を行う予定である。

本研究に関わる成果発表は以下のとおりである。

論文

- ・投稿中(2件)

学会発表

- ・Nanoscale in-situ Microscopy Workshop, Royal Microscopical Society (2023年9月27日~28日、Diamond light source, UK) ポスター発表 ※Poster Prize Winner (2nd Prize)
- ・日本顕微鏡学会第80回学術講演会(2024年6月3日~5日、千葉幕張メッセ) 発表予定

(3) マイクロ ED の FS

場所：高エネルギー加速器研究機構、筑波大学

内容：筑波大学にある CRYOARM200 を用いたマイクロ ED 実験について、より解析高難度な試料に対応すべく、データ測定および解析の両面においてワークフローの見直し、確立を行った。データ測定においては SerialEM ソフトウェアに東大および阪大にて開発されたマイクロ ED 測定のスクリプトを導入し、それを改良することで、多量の結晶から迅速かつ精確に回折データ収集を行うことが可能となった。特に解析高難度な試料では結晶性の歩留まりが悪く、数百個の結晶から数個しか構造解析につながる回折データを得ることが出来ないケースが多々あり、多量結晶からの測定ワークフローの確立は極めて重要であった。データ解析においても、DIALS を用いた逐次自動処理を開発し、データ測定終了後に即時に結晶性を確認し、データ測定へとフィードバックすることが可能となった。また、多量の結晶のデータ処理結果一覧から良質なデータのみを抽出し、マージして完全データセットを得て、構造解析計算に進めることが可能となった。

上記のワークフローの確立により、マイクロ ED 実験がルーチン化され、複数の外部ユーザーから提供された試料について構造解析に成功することが出来た。

本研究に関わる成果発表は以下のとおりである。

論文

- ・ Tsunekawa, E., Otsubo, Y., Yamada, Y., Ikeda, A., Adachi, N., Kawasaki, M., Takasu, A., Aramaki, S., Senda, T., Sato, S., Yoshida, S., Fujita, M., Sawada, T. “X-ray and Electron Diffraction Observations of Steric Zipper Interactions in Metal-Induced Peptide Cross- β Nanostructures.”, J. Am. Chem. Soc. 145. (2023), 16160–16165

学会発表

- ・ 日本結晶学会年会 (2023 年 10 月 27 日～29 日、宇部市文化会館、山口大常磐キャンパス) 口頭発表

【今後の活動予定】

- 1) 本調査研究連携機関間で、グラフェン液体セルによる超分子やタンパク、高分子などの液中観察やマイクロ ED 構造解析への適用などに関する共同研究を実施する。
- 2) 本調査研究での成果を元に共同研究などを通じて顕著な成果を得た上で、大型外部資金「未来開拓学術研究推進事業」への応募につなげたい。
- 3) 本調査研究により、AIST における液中における可溶性ポリマー製剤と病原体との相互作業の微細構造観察が可能となり、未探索であった領域における研究が可能となり、三菱財団への応募をするとともに、2024 年度の「創発的研究支援事業」「科研費 基盤 B」への応募を計画している。
- 4) 本調査研究により、KEK と筑波大学におけるマイクロ ED 法を用いた有機化合物および無機化合物構造解析の基礎的な技術が確立したため、ユーザー利用拡大を目指すハイスループット化やタンパク質への応用に向けた技術開発を行うべく「科研費基盤 B」もしくは「科研費基盤 A」への応募を計画している。

【SDGs17 目標について、調査研究成果について、貢献ができると思われる項目があれば、最大3つまで☑をご記載下さい。】

研究成果に関連する SDGs 目標がある。

関連する SDGs 目標は無い

1 <input type="checkbox"/> 貧困をなくそう	2 <input type="checkbox"/> 飢餓をゼロに
3 <input checked="" type="checkbox"/> すべての人に健康と福祉	4 <input type="checkbox"/> 質の高い教育をみんなに
5 <input type="checkbox"/> ジェンダー平等を実現しよう	6 <input type="checkbox"/> 安全な水とトイレを世界中に
7 <input checked="" type="checkbox"/> エネルギーをみんなに、そしてクリーンに	8 <input type="checkbox"/> 働きがいも経済成長も
9 <input checked="" type="checkbox"/> 産業と技術革新の基盤を作ろう	10 <input type="checkbox"/> 人や国の不平等をなくそう
11 <input type="checkbox"/> 住み続けられるまちづくりを	12 <input type="checkbox"/> つくる責任、つかう責任
13 <input type="checkbox"/> 気候変動に具体的な対策を	14 <input type="checkbox"/> 海の豊かさを守ろう
15 <input type="checkbox"/> 陸の豊かさを守ろう	16 <input type="checkbox"/> 平和と公正をすべての人に
17 <input type="checkbox"/> パートナリーシップで目標を達成しよう	

以上