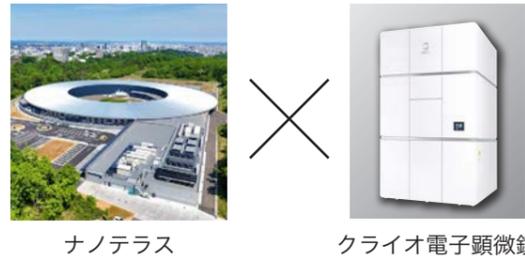


放射光・クライオ電子顕微鏡 相補利用事例

世界最高水準を有する2つの顕微鏡

放射光分析では溶液全体の統計的に平均化された情報を得ることが出来る一方、クライオ電子顕微鏡分析では局所的な微細構造を溶媒を含んだ状態で観察することが出来ます。

放射光とクライオ電子顕微鏡を相補利用することによって、マルチスケールなサンプルからマルチモーダルな情報を得ることが可能であり、多くの放射光施設でクライオ電子顕微鏡との併用が進められています。



ナノテラス

クライオ電子顕微鏡

日本酒の銘柄によって、構造物の大きさ・量が異なる？

放射光を用いた X 線小角散乱により、日本酒にはナノオーダーの構造物が多数含まれていることが明らかとなりました(図 1)。そこで、クライオ電子顕微鏡を用いて、急速凍結した日本酒の局所構造観察を行ったところ、日本酒中には紐状の構造物が無数に存在することが明らかとなりました(図 2)。また、日本酒の銘柄(製造方法)によっても、構造物の大きさや量が異なることも分かりました。放射光とクライオ電子顕微鏡を相補利用することによって、日本酒や幅広い食品分野において、品質保証、製造方法の改良・開発、製造方法と味・風味の相関の解明などが期待されます。

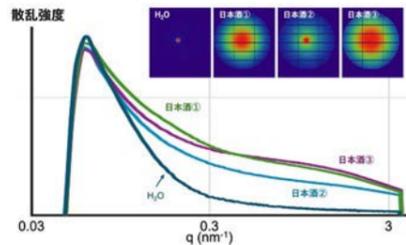


図 1. 日本酒の X 線小角散乱結果

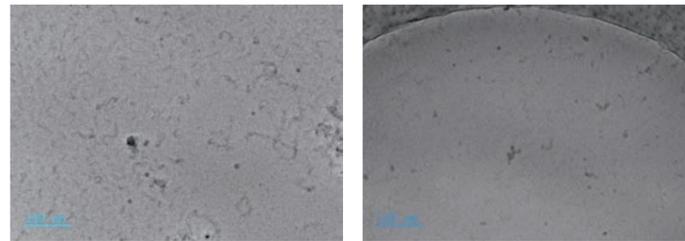


図 2. 日本酒の観察像(それぞれ別の銘柄)

画像提供：東北大学大学院農学研究所 日高将文博士、原田昌彦博士
東北大学国際放射光イノベーション・スマート研究センター 蟹江澄志博士

観察までのフローチャート

高性能クライオ電子顕微鏡で観察・測定してみませんか？

研究開発や製品開発では物質の構造を解析することが必要不可欠です。クライオ電子顕微鏡は、特に液体を含む試料の観察に有効です。豊富な知識を持ったスタッフが試料作製・測定手法の提案から解析まで対応します。



クライオ電子顕微鏡観察・測定を試してみたい試料がありましたら、下記問い合わせ先までお気軽にご連絡ください。

観察・測定目的や試料情報などの詳細をお伺いし、実験方法をご提案いたします。また、手続き方法の説明や観察日程の調整を行います。

実際に試料調製から観察・測定を行います。立ち会い観察にも対応可能です(オンラインも可)。

詳細なデータ解析が必要な場合は、ご相談ください。

2023 年度利用実績 (2023 年 4 月~2024 年 3 月) : 企業 18 日、アカデミア 55 日
2022 年度利用実績 (2022 年 6 月~2023 年 3 月) : 企業 13 日、アカデミア 38 日

問い合わせ先

東北大学多元物質科学研究所 西 1 号館 (科研 S 棟) クライオ電子顕微鏡受付
〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1 E-mail : tagen-cryo@grp.tohoku.ac.jp



東北大学 多元物質科学研究所

クライオ電子顕微鏡利用案内

世界初！材料系・生命系二刀流 AI 制御の自動データ収集システムを実装したクライオ電子顕微鏡
次世代放射光との相補利用で硬い材料から柔らかい材料までを可視化



クライオ電子顕微鏡の特徴

クライオ電子顕微鏡法では、液体/溶媒を含んだ試料を急速凍結し、低温下で観察することにより、本来の状態に近い試料観察を実現します。主に生体試料(タンパク質など)を対象として発展を続け、2017年にはノーベル化学賞も受賞しています。現在では、装置性能の向上、電子直接検出型カメラの開発、解析技術の進歩などによって、高分解能構造解析が可能となっています。

【主要スペック】

1) 本体 CRYO ARM™ 300 II (JEOL)

電子銃	冷陰極電界放出型電子銃
撮影モード	TEM、STEM、DIFF
加速電圧	300 kV/200 kV
位相板	ホールフリー位相板
エネルギーフィルター	インカラム型オメガフィルター
試料ステージ	
使用冷媒	液体窒素 (自動供給機構組み込み)
試料冷却温度	100 K 以下
試料傾斜	モーター駆動 (±70°)
試料交換装置	自動制御クライオトランスファー機構
試料ストレージ	最大 12 個保持可能
その他	エンクロージャー、磁場キャンセラーなどを設置し、外乱を抑えた最適な環境



CRYO ARM™ 300 II (JEOL)



検出器 (K3 (AMETEK Gatan), XF416ES (TVIPS))

2) 検出器

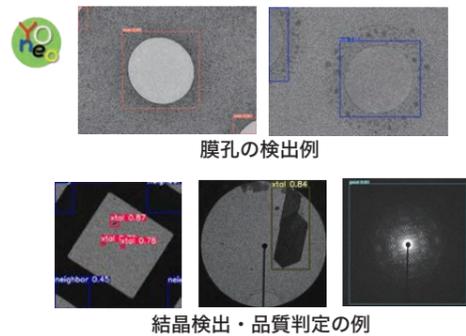
電子直接検出型カメラ	K3 (AMETEK Gatan)
CMOS カメラ	XF416ES (TVIPS)

3) 試料作製装置

浸漬凍結装置	EM GP2 (Leica)
親水化处理装置	DII-29020HD (JEOL), JEC-3000FC (JEOL)
クライオウルトラミクロトーム	UC/FC シリーズ (Leica)
真空蒸着装置	IB-29510VET (JEOL)

本装置では、データ収集を制御する AI システム (yoneoLocr) を搭載しており、測定の失敗が大幅に少なくなっています。このため、自動測定の併用により、非常に高効率なデータ取得が可能となっています。また、高速ネットワークを介したリアルタイム解析を行うことも出来ます。最近では、水素原子や電荷、化学結合の可視化により、世界最高水準での解析を達成しました。

AI システムによる測定の高効率 / 高精度化

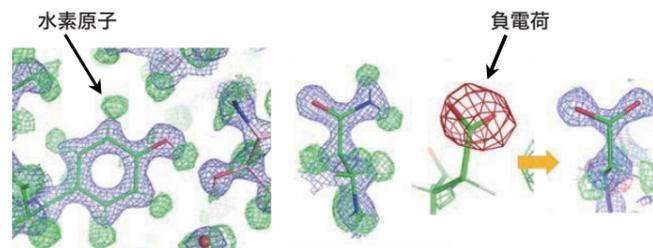


膜孔の検出例

結晶検出・品質判定の例

K. Yonekura et al., *Commun. Biol.* 4, 1044 (2021)

タンパク質の高分解能単粒子構造解析 (水素原子・電荷・化学結合の可視化)



S. M.-Yonekura et al., *Commun. Chem.* 6, 98 (2023)

さらに、生体試料のみならず、非生体試料やハイブリッド試料の観察・解析への応用についても積極的に進めています (応用例参照)。様々な試料加工法の導入も行なっており、試料形態にとらわれない観察・分析環境を備えています。

クライオ電子顕微鏡応用例

本装置では、主要な 3 つの測定法である単粒子構造解析、電子線三次元結晶構造解析 (MicroED/3D ED)、電子線トモグラフィー (Cryo-ET) に加え、エネルギーフィルター TEM (EF-TEM) による元素マッピングなど、各種材料に応じたオーダーメイド測定を駆使して、広範な材料研究への応用を進めています。

- 【測定手法】
- ・高分解能単粒子構造解析
 - ・電子線三次元結晶構造解析 (MicroED/3D ED)
 - ・クライオ電子線トモグラフィー (Cryo-ET)
 - ・各種材料に応じたオーダーメイド測定

主要な測定法を用いた解析の紹介

■ MicroED による結晶構造解析

[微小結晶やナノ薄膜などからの電子回折像を自動取得]

電子線はX線よりも原子と1万倍強く相互作用するため、MicroED/3D ED法を用いることにより、放射光では解析出来ない微小結晶などからの構造解析が可能。本手法では、試料を回転させながら測定を行い、電子回折パターンを連続的に記録します。独自に開発した電子顕微鏡測定を補助する GUI ソフトウェア (ParallEM) と結晶検出や品質判定を行う AI (yoneoLocr) を併用することで、データ取得を自動かつ高効率に行うことが出来るようになっています。本手法は、薬剤や有機低分子の粉末、有機半導体薄膜などの分析へ応用可能です。

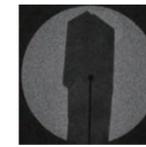


図 1. 微小結晶の実像

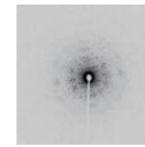


図 2. 回折像

画像提供: 東北大学多元物質科学研究所 陶山めぐみ博士、東北大学国際放射光イノベーション・スマート研究センター 蟹江澄志博士

■ Cryo-ET による 3 次元立体構造解析

[特徴ある 3 次元立体構造を解明。キラリティーまで決定可能]

Cryo-ET 法では、ステージの傾斜によって試料の連続傾斜像を記録し、得られた画像から立体像を再構成することが可能です。キラリティーを有するらせん状分子について、トモグラフィー撮影を行い (図 1)、撮影された画像から 3 次元再構成を行なった結果を示します (図 2)。0°の透過像では判別出来なかった、各らせん分子の重なりを明瞭に区別することが出来ています。また、もう一方の鏡像体に対しても本手法を適用することで、左巻き、右巻きの 3 次元キラリティーを区別して評価することが出来ました (図 3)。



図 1. らせん状分子の傾斜像

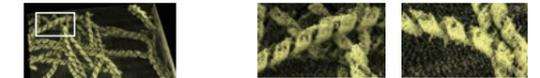


図 2. 3 次元再構成像

図 3. 鏡像体の比較

各種材料に応じたオーダーメイド測定

■ 口紅 (油性試料) の微細構造観察

[油性試料の本来の姿を可視化し、製品開発・品質保証へ応用]

口紅は液状油と結晶性ポリマー (ワックス) で構成されており、通常、液状油の存在が微細構造の観察を妨げていましたが、クライオ電子顕微鏡を用いることで、成分の欠損や構造変化を伴わずに観察することに成功しました (図 1)。また、口紅に顔料を加えたときの構造変化の観察を行い、顔料を加えることでワックス部分の構造が細かく分岐し、また厚みが薄くなること分かりました (図 2)。クライオ電子顕微鏡法を適用することで、顔料添加により口紅全体の硬さが低下する要因についての重要なヒントを得ることが出来ました。

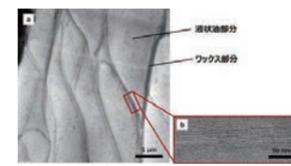


図 1. 口紅本来の構造 (a) とその拡大像 (b)

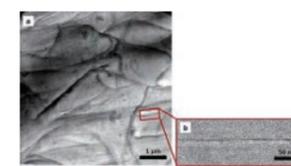


図 2. 顔料を加えた口紅の構造 (a) とその拡大像 (b)

画像提供: 株式会社コーセー

■ 納豆の糸 (ハイドロゲル) および納豆菌 (微生物) の観察

[食品ハイドロゲルと微生物を可視化]

納豆の糸 (ハイドロゲル) を急速凍結し、水を含んだ状態でのクライオ電子顕微鏡観察例を示します。試料を薄く加工するクライオ集束イオンビーム - 走査型電子顕微鏡 (FIB-SEM) を併用し (図 1)、微細構造を観察しました。ポリマーの存在を示唆するコントラストの濃淡および納豆菌 (微生物) の細胞構造を観察出来ました (図 2)。試料加工技術の開発も行い、試料形態によらない観察・分析を可能としています。

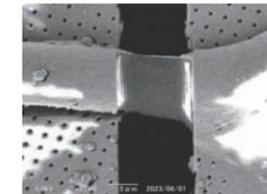


図 1. FIB-SEM による納豆の糸の加工 (薄膜試料作製)

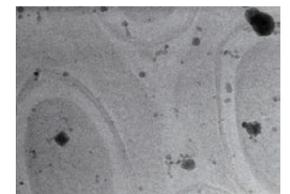


図 2. 薄膜化した納豆の糸のクライオ電子顕微鏡観察

■ EF-TEM による元素マッピング

[着目した元素をマッピング]

EF-TEM 法では、エネルギーフィルターを用いて、特定の元素と相互作用した電子のみを選択的に結像することで、試料中に含まれている元素をマッピングすることが可能です。構成元素にケイ素を含んだナノ粒子分散液を凍結し、クライオ電子顕微鏡によって観察を行なったところ、通常の TEM 像ではナノ粒子と炭素膜が観察されていますが (図 1)、EF-TEM 像ではナノ粒子 (ケイ素) のみが選択的に検出されています (図 2)。

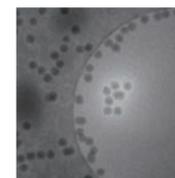


図 1. 通常の TEM 像

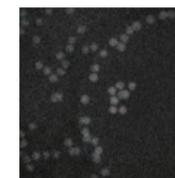


図 2. EF-TEM 像 (元素マッピングの結果)

■ 有機溶媒に分散したナノ粒子の観察

[有機溶媒に分散した材料評価も可能]

クライオ電子顕微鏡法では、水溶液試料を急速凍結して観察することが一般的であり、各試料調製および観察手法も水を前提として開発されてきました。しかし、多くの非生体系材料では、有機溶媒が用いられていることから、有機溶媒試料についても試料調製・観察手法を開発しています。例えば、メタノールに分散した金ナノ粒子を観察することで、粒子の形状・大きさ・分散状態などの情報を得ることが出来ました (図 2)。メタノールの他、種々のアルコール、炭化水素系溶媒など幅広い有機溶媒を用いた試料観察が可能となっています。

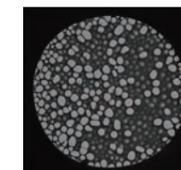


図 1. 有機溶媒凍結膜の張ったグリッド

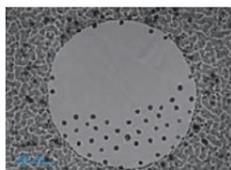


図 2. メタノールに分散した金ナノ粒子のクライオ電子顕微鏡観察