

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業  
(先端計測分析技術・機器開発プログラム)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 生細胞ナノ構造解析用 Cryo-in lens-S(T)EM の実用化、製品化  
(英語) Product Development of Cryo-in lens-S(T)EM for the analysis of nano-structure in living cells.

研究開発実施期間: 2012年10月1日～2019年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 小瀬 洋一  
(英語) Yoichi Ose

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) (株) 日立ハイテクノロジーズ 科学システム製品本部 主管技師  
(英語) Chief Engineer, Science Systems Product Div., Hitachi High-Technologies Corporation

## II 研究開発の概要

凍結試料の単粒子解析をはじめとする構造解析が医学生物学、創薬の分野で必須項目となってきた。この傾向を鑑み、我々は走査電子顕微鏡 (SEM) をベースとして広く導入可能なクライオ電子顕微鏡 (電顕) を開発した。平成 24 年～28 年度は白倉 (名古屋大学) を代表者として、基礎開発を行い、ステップアップの延長期間 (平成 29、30 年度) は「ユーザー目線で使い易く、必要十分な機能を備えた製品」を目指し、解析ソリューションシステムの開発を行った。クライオ電顕とともに開発した前処理装置 (細胞膜剥離装置) と急速凍結により作製した凍結試料を、独自に開発したクライオステーション、クライオトランスファーホルダーを用いて、開発機 (Cryo in-Lens S(T)EM) に持ち込み観察した。画像の熱ドリフトを完全に押さえることはまだできないが、ドリフト補正などの画像処理を経て、単粒子解析、細胞構造解析まで一貫したソリューションを提供できるようになった。以下では、(1) 装置開発、(2) 試料作製法の開発と応用研究の順に成果を説明する。

### (1) 装置開発

#### (i) クライオトランスファーホルダーの開発

電顕用グリッドに載った凍結試料を、霜を付けないように電子顕微鏡中に持ち込み観察するクライオトランスファーホルダーを開発し、温調制御による $-185^{\circ}\text{C}$ での観察を実現した。具体的にはホルダーアームの長軸方向 2/3 を真空二重パイプ化し、液体窒素を先端近くまで満たすことにより低温化した。

熱解析を実施した結果ホルダー先端からの熱流入が大きいことが判明し、ホルダー先端からの熱流入を完全に遮断する片持ちステージを開発実装した。更に、液体窒素デュアー部分を真空排気し、液体窒素をスラッシュ化（固体化）することにより、 $-195^{\circ}\text{C}$ 定温観察を可能にした。

スラッシュ化による低温化と低振動化の有効性を確認できたが、一方で手動でのスラッシュ化操作は観察者の負担となっていた。延長期間では「ユーザー目線で使い易い製品」の観点からクライオトランスファーホルダーとアンチコンタミネーショントラップのスラッシュ化自動化を実現した。開発した自動化制御装置は温調器から試料温度信号を取り込み、試料温度が閾値を超えるとポンプで液体窒素デュアー内を排気する。制御装置は圧力センサを有し、温度と圧力を併用した制御シーケンスを実現した。また、リーク用窒素ガス配管を追加し、液体窒素への水分と酸素等の混入を回避することで、長時間の安定観察を実現した。

#### (ii) アンチコンタミネーショントラップの開発

クライオ電顕では試料が極低温下にあるため、試料表面に真空中の水分や異物が付着しやすい。これを防ぐため試料温度以下に冷却されたアンチコンタミネーショントラップを試料近傍に配置した。クライオトランスファーホルダー同様、アンチコンタミネーショントラップのアームの部分の中心に窒素ガス除去用のパイプを通すことにより、最終目標値である先端温度 $-186^{\circ}\text{C}$ を達成した。更にスラッシュ化することで $-200^{\circ}\text{C}$ まで達した。

#### (iii) ドリフト補正機能の開発

従来、スロースキャン（取得時間 40 秒以上）により最終的な高 S/N 画像を取得していたため、ドリフト量 1nm/フレーム以下に安定するまで 1 時間以上待つ必要があった。取得時間 4 秒以下のスロースキャンあるいは取得時間 0.2 秒以下のファストスキャンの動画出力機能を開発することによりドリフト条件が緩和でき、異常画像を排除しつつドリフト補正した画像重ね合わせを用いて高 S/N かつ高分解能の画像取得が可能となった。

### (2) 試料作製法の開発と応用研究

#### (i) 試料作製法の開発

生きている細胞構造を維持したまま細胞膜を剥離して細胞骨格を観察する方法（アンルーフ法）を開発した。リングル液中にある細胞を倍率 30 倍の位相差倒立顕微鏡で観察しながら、極めて弱い超音波により発生した気泡を細胞に当てることにより、最適な状態で剥離を終了することが容易となった。開発機は分解能が高く、細胞骨格を形成するアクチン線維一本一本を観察することができる。しかも二次電子像をも捕捉することが出来るので、その表面像も観察できる。実際、急速凍結した細胞膜剥離試料では膜細胞骨格を高コントラストで観察することができた。この細胞膜剥離法は様々な顕微鏡観察に応用できるので、多くの人からリクエストを得ている。

#### (ii) 応用研究

電顕用グリッド上で細胞を培養し、細胞膜を剥離後急速凍結し、そのままクライオ電顕に持ち込み観察することで、無固定で、生きている状態の細胞の透過像(STEM)と表面像(SEM, 二次電子像)を試料温度 $-180^{\circ}\text{C}$ で撮影できるクライオ電顕が完成した。完全に氷包埋されていると SEM 像は平坦な氷の表面像となり試料の微細構造は観察されないが、試料温度が上がり氷の昇華が始まると SEM 像が現れてくるので、昇華状態を容易にモニターできることを確認した。以下では生物試料に応用したときの「実用性実証」についてどこまで達成できたかを述べる。

精製タンパク質の構造解析も細胞内タンパク質の構造解析も手段としては同じ単粒子解析である。ただ、細胞内ではサンプリングが難しく、また、数を稼げないなどの理由で分解能が落ちているに過ぎない。また、単粒子解析のもう一つの重要なファクターは正確さである。見かけ上の高分解能だけで正確性がなければ、何も意味を持たない。我々の研究室で精製できるタンパク質としてはアクチンであり、

これを線維としたものを試料として用いた。また、細胞内ではないが、生きているものとしてタバコモザイクウイルスの構造解析を通して開発機の性能を評価した。単粒子解析では粒子の数が分解能に関わる。通常は数千から数万の粒子像をもとに計算するが、今回は性能検査のためだけなので、200 以下で行った。200 枚の画像から計算された分子像の分解能はおおよそ 3nm であった。開発機による画像から再現された分子像の方が通常の 100KV の画像から求められた分子像より分解能は高かった。また、原子座標モデルとのフィッティングの結果は開発機による画像からの再現分子モデルがより正確であることが証明された。

一方、細胞内での *in situ* 単粒子解析はまだ世界的に進んでおらず、我々は開発機の性能を検査する目的でタバコモザイクウイルスの構造解析を行った。開発機を用いて常温負染色（ネガティブ染色）とクライオ像との比較を行った結果、1 枚の実写真ですでに 2.8nm の分解能を示した。立体再構築は現在進行中である。

さて、細胞内の構造であるが、細胞膜を剥離（アンループ）した細胞を急速凍結し、生きている状態に近い細胞内構造を STEM SEM 同時観察した。多くのアクチン細胞骨格のほかに通常の包埋切片では見られないような滑面小胞体やリボゾームなどが高コントラストで観察できた。アクチン線維 1 本 1 本が見えるところまで拡大した像で、5.4~5.5nm の縞目が観察できた。これはアクチン線維の短周期構造（5.5nm 周期）によるものであり、その分解能まで構造が保存されているという証拠である。つまり目標である「分解能 5.4nm での細胞の構造解明」が確認できた。

本クライオ電顕開発機は水中にあるナノバブルのような気泡までも STEM、SEM 同時記録ができた。SEM 像で水滴の表面が滑らかであるので気泡は水滴内にあることが確認できた。このようにクライオ電顕微鏡は溶液内の構造観察にも応用できるので、今後、化粧品、油脂などを始めソフトマテリアルの構造解析にも広く使用できる見通しを得た。

単粒子解析専用機の 300kV FE-TEM は 20 台/年のペースで増設されており、これらの最先端装置を活用するためにはその数倍のスクリーニング機が必要である。本開発装置は SEM をベースとすることで小型安価かつ設置が容易でスクリーニング機に最適であり、創薬のスピードアップに大いに貢献できると見ている。また、汎用機用途としても病理診断、細菌検査、再生医療、形態機能研究など革新医療技術開発現場の基盤装置としての導入が見込める。

We developed a low-voltage cryo-EM that everybody can use easily in a wide range of science fields with an economical budget. This cryo-EM was developed based on a scanning electron microscope (SEM: SU 9000) equipped with a STEM detector to capture SEM and STEM images simultaneously, which was additionally equipped with newly developed cryo-transfer holder and anti-contamination trap. We chose not to target atomic resolution in cryo-EM development. Nonetheless, the low-accelerating-voltage (i.e., only 30 kV) cryo-EM that is capable of simultaneous STEM and SEM measurements offers several prominent advantages and may come to occupy a highly competitive position within EM technologies. We estimate that many researchers in the life sciences would be satisfied with this cryo-EM, because with it single-particle analysis is easily feasible with a small number.

#### ***Development of cryo-transfer holder***

Of all of the elemental technologies encompassed by our development plan, the most crucial component was the development of a cryo-transfer holder. Approximately 2/3 of the holder arm was formed by a double-walled vacuum pipe that was almost entirely filled with liquid nitrogen, which increased the cooling rate of the sample holder. We also added a vacuum system to release the gas from the liquid nitrogen in the pipe, and we tested the effect of converting the

liquid nitrogen into slush nitrogen in what was the world's first attempt to use slush nitrogen in a cryo-transfer holder. In this way we succeeded ultimately in reaching temperatures as low as  $-195^{\circ}\text{C}$ .

#### ***Development of new anti-contamination trap***

Because the sample in a cryo-EM is held at an extremely low temperature, a contamination trap cooled to a temperature below that of the sample is needed to prevent contamination of the samples. In our system, the arm portion of the trap was also comprised of a pipe in which liquid nitrogen may be introduced at a point near its tip. We also added a vacuum system and succeeded in cooling the trap to  $-200^{\circ}\text{C}$  by converting the liquid nitrogen into a slush.

#### ***Application to biological samples***

We developed a device for cell-membrane removal (i.e., unroofing) to facilitate observations of the membrane cytoskeleton. Such unroofed cells were used instead of cryo-section. Simultaneous cryo-STEM and cryo-SEM observation of membrane cytoskeletons in their native state, which was an original goal of this development project, has been achieved. Because soluble components in a cell are washed away upon unroofing, the cytoskeleton could be observed with sufficient contrast on focus. Short periodicity of actin filaments (5.5nm) were also observable. Surprisingly, ribosomes and endoplasm reticulum remained partially intact after unroofing, and were observed well together with the membrane cytoskeleton. In STEM, images are obtained by scanning an extremely focused electron beam over the sample, and therefore images are a bit map of electrons transmitted through the sample. Thus, the image obtained is not formed by an objective lens and does not suffer as much from the contrast transfer function (CTF). As a matter of course, images were observed at the focal point without any reduction of the resolution. This is optimal for single-particle analysis. This advantage is particularly prominent in our developed low-voltage cryo-EM installed with a cold-field emission electron gun, which generates a fine focused electron beam (0.34 nm in diameter). Indeed, the single-particle analysis of the actin filaments calculated from 200 images obtained by our 30 kV STEM exhibited a much higher resolution than that obtained by conventional 100 kV TEM. One cryo-image of tobacco mosaic virus in native state taken in our 30 kV cryo-STEM showed 2.8 nm resolution.

#### ***Application to Materials Sciences***

Cryo-EM seems to be a useful tool for the material sciences because of its remarkable reduction of irradiation damage to the samples. In particular, we have succeeded to observe fine bubbles (gas bubbles approximately 50–100 nm in size) formed in water very clearly. These could possibly be observed with conventional cryo-TEM systems as well, but the ability of our system to capture simultaneous STEM and SEM images offers proof that these bubbles actually do exist in the water. This is a useful new application of the cryo-EM that we have developed. Strong future demand of this cryo-EM is anticipated in areas such as cosmetics, pharmaceuticals, foodstuffs and soft materials.