

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」
平成 18 年度採択研究代表者

永山 國昭

自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

ns-nm 分解能電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発

1. 研究実施の概要

1. 位相差電子顕微鏡の高度化と応用(岡崎、日本電子)

無損失位相板とピエゾ制御過熱位相板ホルダーの開発を行い、位相差法としての高度化を行った。無損失位相板は現在用いられている薄膜位相板の欠点である電子線損失を解決するために提案され、磁場の作り出す AB 効果を利用する(AB 位相板)。昨年度に続き、実用に耐える極細線磁石作成を行った。昨年度のプロトコールでは、帯電問題が避けられず、徹底した有機物除去を行い、この問題を解決した。位相差顕微鏡の基本体、200kV 電頭を日本電子より購入し、高度化のもう一つの目標位相差低温トモグラフィーの開発を行った。

2. パルス光電子顕微鏡による高分解能低温電子顕微鏡の開発(岡崎、つくば)

電子線損傷を軽減し、生体分子一粒子解析法の分解能向上を目指し、パルス光電子を用いた高速パルス電子顕微鏡の開発を行っている。この実験はつくばにおいて行われ、光電子エミッター作製装置を作製した(2007 年度は多くの不具合が見つかり、実用上の完成に至っていなかった)。複雑な装置のため、真空度が上がらない問題を抱えており、難航している。

3. 電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発(岡崎、日本電子、浜松医大)

同一試料、同一視野を光頭と電頭で同時観察する装置の開発。日本電子から出向している大学院生を中心に浜松医大と協力して試作機作成と予備実験を行った。2007 年度デザインでは、光学顕微鏡性能が不十分のため、2008 年度はデザインを一新し、光学側性能を確保した。デザイン変更のため、半年ほど開発が遅れた。装置は日本電子から借用する 200kV 電頭に組み込む。

4. 雰囲気試料室による Live TEM Imaging 法の開発(岡崎、日本電子)

開発の遅れている生きた生物試料を扱う雰囲気試料室の開発遅れを取り戻すため、世界で唯一生物用雰囲気試料室の開発と実験を行っている農工大箕田准教授の参加をお願いし、スピードアップを図った。2008 年度は、種々の基本性能をテストできた。

2. 研究実施内容

電子顕微鏡の要素技術は、§ 1 に示す 4 つである。それらを一つの電頭に組み込むのはあまりにもリスクが大きすぎるため、3 種の装置に組み込んで完成させることとした。200kV 位相差トモグラフィ（AB 位相板）、200kV photon-electron hybrid live microscopy（ハイブリッドレンズと雰囲気試料室融合）、200kV 光電子パルス顕微鏡である。

1. 位相差電子顕微鏡の高度化と応用

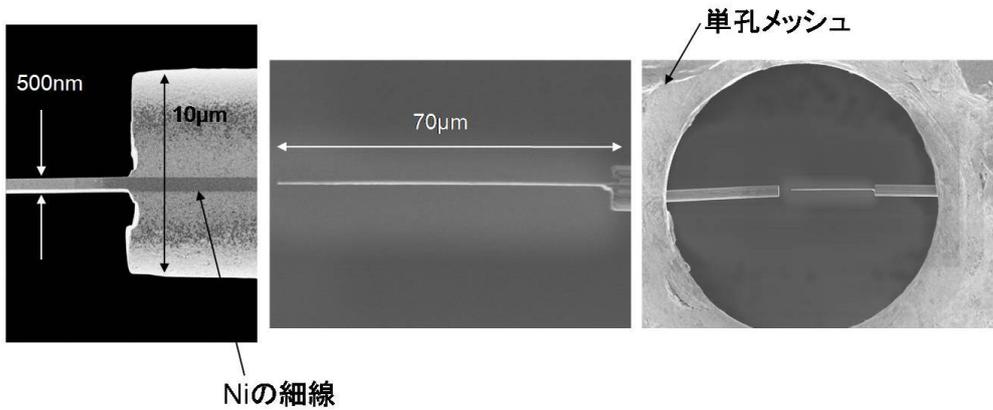


図 1. FIB で作製された AB 位相板の概観

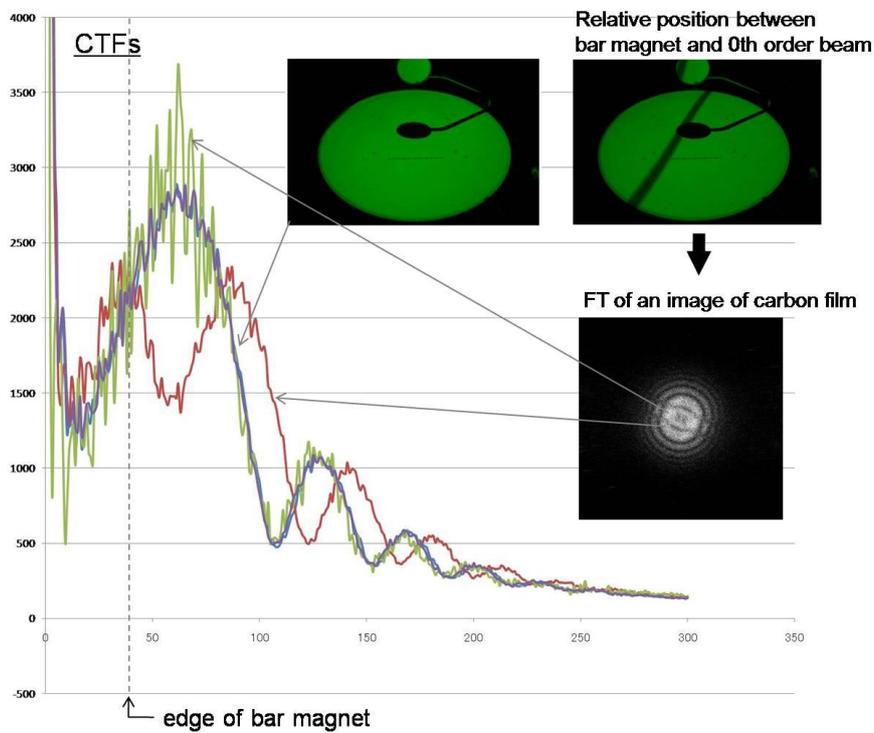


図 2. 伝達関数 (CTF) で明らかになった無帯電位相

a. 電子顕微鏡用の位相板には、薄膜位相板を使う薄膜型と微小電極の静電ポテンシャルや微小磁石のベクトルポテンシャルを用いるポテンシャル型の 2 種がある。現在、ポテンシャル型が次世代位相板として世界的に開発されているが、CREST では、微細加工技術の FIB (Focus Ion Beam) を用いて、微小磁石 $20\text{nm} \times 500\text{nm} \times 70\mu\text{m}$ の作成を試みた(図1)。無垢の白金線 ($10\mu\text{m}$) から出発して極細線磁石にいたる作成プロトコールにつき、昨年度のは帯電問題のあることが分かり、改良を行った。有機物を持ちこまない手法を徹底させることで帯電問題を解決した。結果を図 2 に示した。

b. ピエゾ制御過熱位相板ホルダーの基本体 200kV 組み込みとトモグラフィー
 高度な位置制御を行える新規の加熱型位相板ホルダーが、2007 年度に完成したので新規導入した。200kV 電頭に組み込み、位相差トモグラフィーを行った。結果は、予想以上にめざましく、ウイルスにつき図 3、4 に示す結果を得た。

T4 フェージのトモグラムは、通常像に比べ、位相差像の方がコントラストが高いため詳細が示されている。インフルエンザウイルスも位相差像により、膜、RNA などに新知見を与えた。

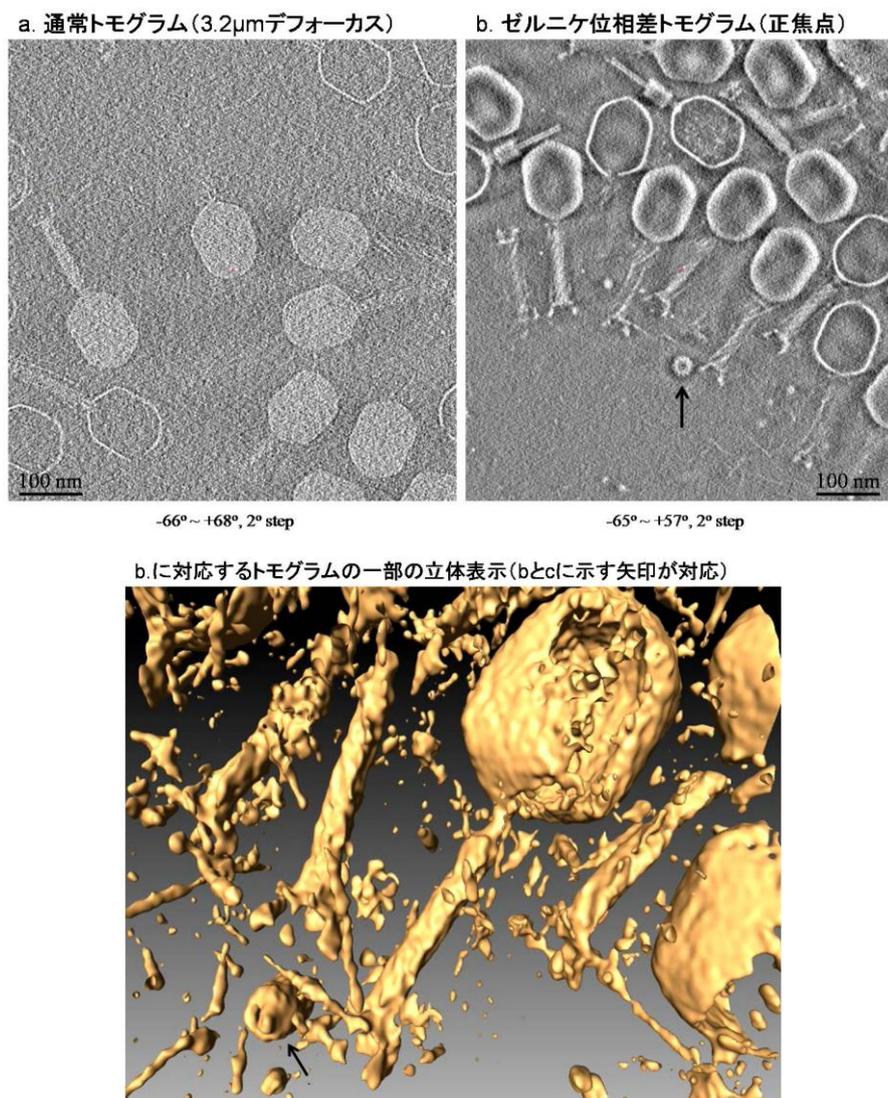
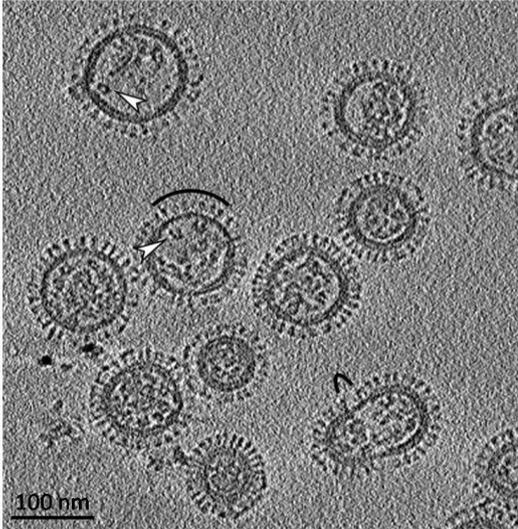


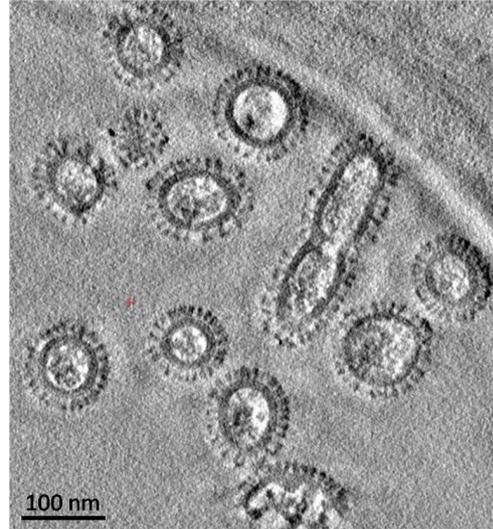
図 3. T4 フェージの位相差トモグラフィー像比較 (5nm 厚断面 : a, b) と立体像表示 (c)

a. 通常トモグラム (Harris et al., PNAS (2006))



-64° ~ +72°, 1° step, 120 kV, 55 e-/A²

b. 位相差トモグラム (正焦点)



-70° ~ +70°, 2° step, 200 kV, 55 e-/A²

図 4. インフルエンザウィルスの特モグラム (断層像) 比較

2. パルス光電子顕微鏡

真空蒸着によってエミッター先端の微小領域にセシウムとアンチモンを付着させ、高効率光電子発生体セシウムアンチモン (Cs_3Sb) 薄膜を形成させる装置 (光電子エミッター作製装置) の開発・製作を行った。 Cs_3Sb は酸素にさらされると量子効率が急速に低下して光電子を放出しなくなるため、エミッター先端部は常に超高真空中に置き、エミッター先端部を酸素 (空気) にさらすことなく蒸着装置から電子銃を取り出せるようにする。本装置は、以下の特徴を持つ。

- i) 陰極先端の近くに微小穴のある「蒸着絞り」を置く。
- ii) 陰極先端の中心の同じ領域に Cs と Sb が蒸着。
- iii) 上記のための軸合わせ用光学系を真空外に置く。
- iv) 作動排気により、蒸着中も陰極収納室は高真空。

- v) 陰極先端にレーザー照射して、光電子の量を計測。
- vi) エミッター先端部をペルチェ冷却し、量子効率を高める。
- vii) 陰極先端を密閉カバーで覆い外部に取り出せる。

図 5 に概観を示すが、上記の仕様を満たす装置としては 70% 程度の完成度である。この先にこの装置で作られた光電子エミッターを電子顕微鏡内へ高真空のまま移

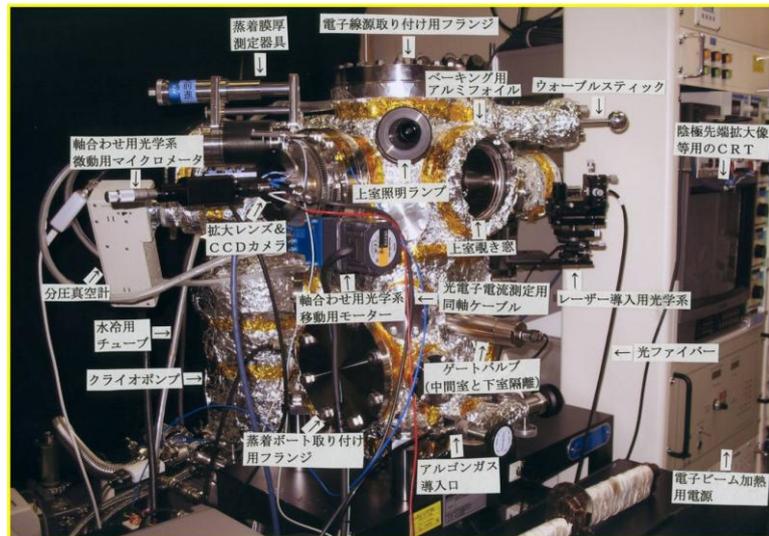


図 5. 光電子エミッター作製装置の概観

設する手順があり、パルス光電子顕微鏡全体としての仕上りは半分程である。2009 年度全力を注ぎ CREST 終了時まで基礎実験を行えるようにしたい。

3. 電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発

2007 年度試作ハイブリッド顕微鏡対物レンズは通常の光学顕微鏡による像と比較すると極めて分解能とコントラストが低い。この問題を解決するため、市販光学対物レンズを使用可能な新デザイン(図 6a)に切り替えた。結果はめざましく、明視野像(図 6b)も蛍光像(図 6c)も通常顕微鏡の

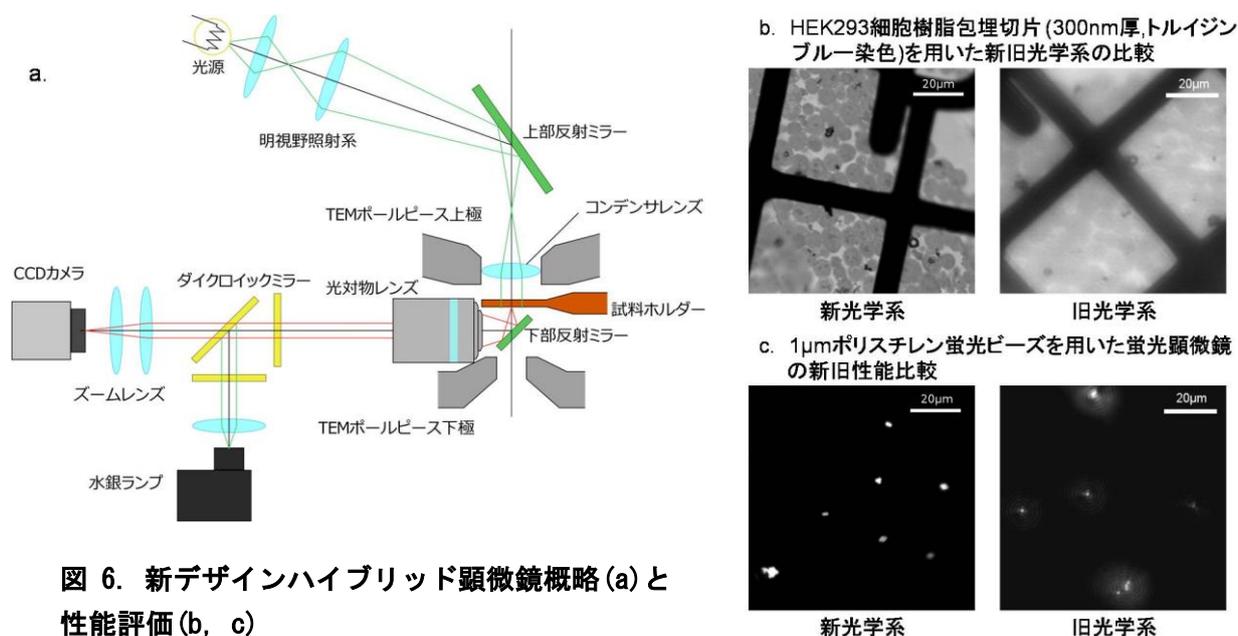


図 6. 新デザインハイブリッド顕微鏡概略(a)と性能評価(b, c)

性能を確保できた。このデザイン変更で、電顕側の性能は若干落ちるが、ハイブリッド顕微鏡は高分解能用でないので、5 Åの分解能は充分と言える。

電顕試料は、通常光顕では扱わない薄いものである。こうした超薄切片の光学像につき、観察可能性を検討し、画像処理により充分性能の出ることが分かった。大きな設計変更があったため(旧光学系から新光学系)スケジュールは遅れているが、組み立て部品は全て2008年度中にそろったので2009年度の早い時期に実験が開始できると考える。

4. 雰囲気試料室による Live TEM Imaging 法の開発

雰囲気試料室の改良を行った。雰囲気試料室の窓は、今まで炭素膜であったが、これを薄膜購入可能な SiN(チッ化シリコン)に置き換えることを行った。透過率テストで両者はほぼ同等であるが、薄膜ムラに関しては、SiN がアモルファス炭素膜に比べ、はるかに優れていることがわかった。結果を図 7 に示す。また、日本電子と箕田グループの間で 20 回ほど会合を持ち、位相差顕微鏡に適した新しい雰囲気試料室の仕様を固めることが出来た。特に外部からの物質注入が出来る仕様、加熱冷却が出来る仕様を志向した。

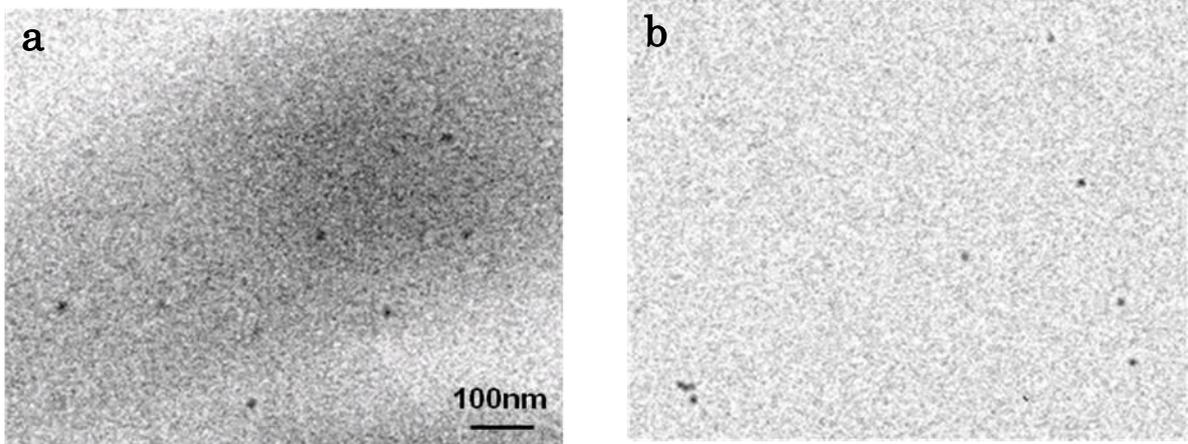


図7. SiN 膜の性能評価 (a) 炭素膜上(従来品)の金粒子 (b) SiN 膜上の金粒子

炭素膜には、厚さムラがあり、バックグラウンドの影響大。SiN では一様なバックグラウンドで、雰囲気試料室条件での観察に有利。

雰囲気試料室そのものは仕様が完全に固まり、図 8 に示すデザインが出来、試作段階に入った。これは日本電子の持つノウハウ(気圧制御、湿度制御)に温度制御、光注入制御機構を組み込んだ新規デザインである。2009 年度の早い時期に組み立てを完了し実験を開始したい。

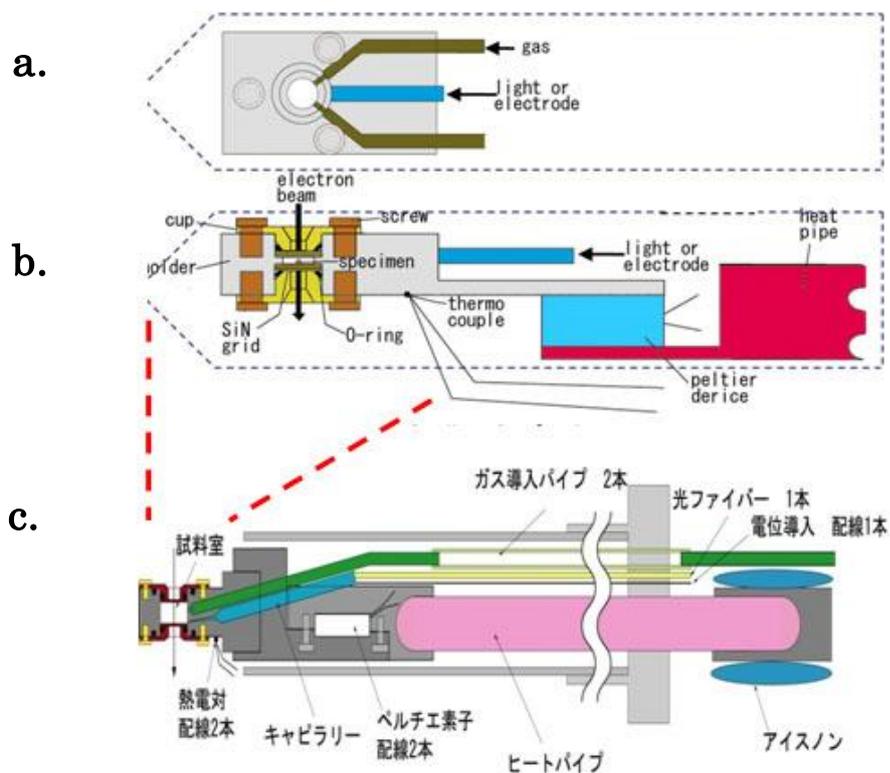


図8. 多目的雰囲気試料室拡大正面図(a)図と拡大側面図(b)および全体図(c)

3. 研究実施体制

(1)「岡崎統合バイオサイエンス」グループ

①研究分担グループ長:永山 國昭(自然科学研究機構、教授)

②研究項目

- i)位相差法の高度化と応用
- ii)電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発

(2)「日本電子」グループ

①研究分担グループ長:大蔵 善博(日本電子(株)、チームリーダー)

②研究項目

- i)電子・光子ハイブリッドレンズ系の開発
- ii)光電子銃の開発

(3)「物質・材料研究機構」グループ

①研究分担グループ長:木本 高義((独)物質・材料研究機構、主席研究員)

②研究項目

- i)電子エミッターの開発と電子線損傷低減

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Kuniaki Nagayama, “Development of Phase Plates for Electron Microscopes and their Biological Application”, *Eur. Biophys. J.*, 37 (2008) 345-358.
2. Kuniaki Nagayama and Radostin Danev, “Phase-plate electron microscopy: a novel imaging tool to reveal close-to-life nano-structures”, *Biophys. Rev.* 1 (2009):37-42.
3. Haruo Sugi, Hiroki Minoda, Yuhki Inayoshi, Fumiaki Yumoto, Takuya Miyakawa, Yumiko Miyauchi, Masaru Tanokura, Tsuyoshi Akimoto, Takakazu Kobayashi, Shigeru Chaen, and Seiryu Sugiura, “Direct demonstration of cross-bridge recovery stroke in muscle thick filaments in aqueous solution by using the hydration chamber”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008)17396-17401.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)