

超高压電子顕微鏡による厚い生物系試料のトモグラフィーとクライオ観察

○樋口公孝, 山本悠太

工学系技術支援室 分析物質技術系

概要

電子線トモグラフィー法による 3 次元像構築は現在広く実施されており、生物系試料においては微生物の全体像や細胞内外器官の立体構造の把握に有用である。厚い生物系試料の場合、試料傾斜時の見かけ厚の増加による信号強度低下や視野内でのフォーカス位置の差異に加えて、非生物系試料に比して低いコントラストや照射による試料損傷も問題となり、詳細な 3 次元像構築に必要な鮮明な連続傾斜像の取得が困難となるケースもある。名古屋大学の超高压電子顕微鏡(JEM-1000k RS)は STEM 機能を有しているため、上述の問題がある厚い生物系試料のトモグラフィー観察に有用である。また、生物試料の生存時に近い状態での微細構造観察手法として、試料を周囲の溶媒ごと凍結させた状態で観察を行うクライオ顕微鏡法がある。上述の超高压電子顕微鏡にて冷却ホルダーとワークステーションとを併用することで試料温度を極低温に維持したまま厚い生物系試料の取付から観察までの実施が可能である。本発表では以上の特徴を持つ名古屋大学超高压電子顕微鏡を用いた生物系試料のトモグラフィー観察およびクライオ観察の結果について紹介する。

1. 観察技術

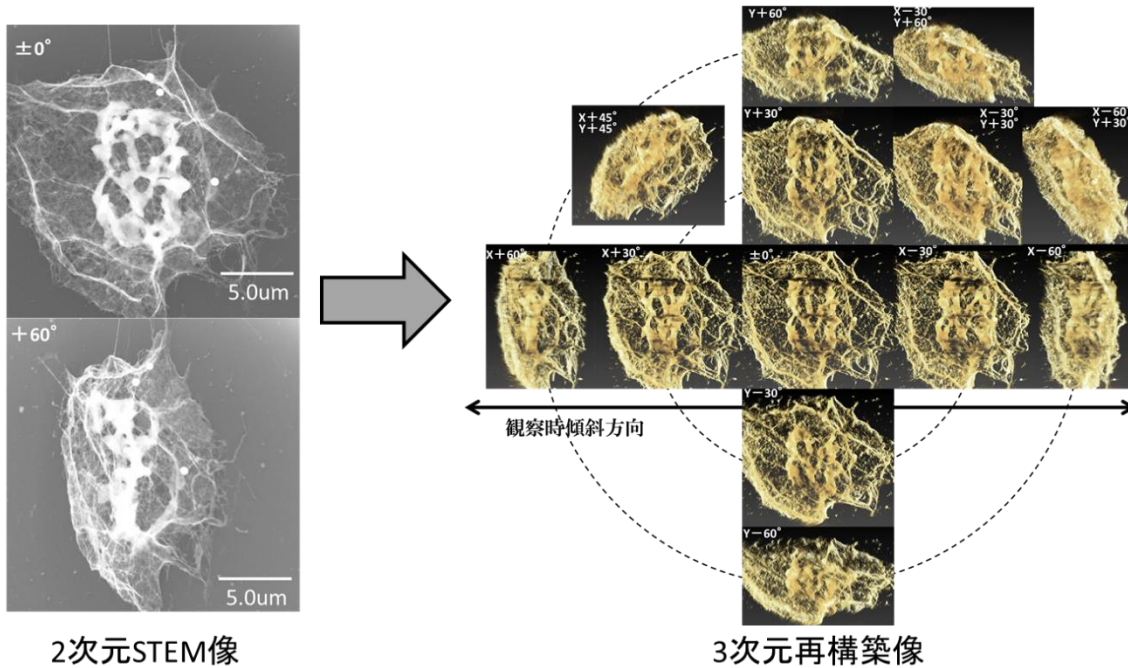
電子顕微鏡は加速電圧により電子線の試料内の透過能が大きく異なる。例えば、超高压電子顕微鏡(1000 kV)は汎用の電子顕微鏡(200 kV)に比べ 10 倍以上厚い試料でも透過像を得ることができる。そのため、試料を傾斜させながら透過像を複数枚撮影し、それを元に 3 次元像を構築することで、厚い試料の立体構造を把握する試験に適している。本特徴は生物系試料においては、微生物の全体像や細胞内外器官の立体構造の把握に有用である。

電子顕微鏡の結像法は TEM(Transmission Electron Microscope)法と STEM(Scanning Transmission Electron Microscope)法の 2 つに大別できる。TEM は試料に平行電子線を照射しレンズ作用により拡大像を得る手法である。一方 STEM はプローブ状に細く絞った電子線で試料上を走査し、透過電子や後方散乱電子を用いて結像する方法であり、それぞれ明視野像(Bright Field Image;BF 像)および環状暗視野像(Annular Dark Field Image; ADF 像)を取得できる。生物試料の 3 次元像観察において特筆すべき STEM の特徴として、TEM に比べて電子線照射による試料損傷が少ないこと、オートフォーカス機能により試料傾斜時に視野全体での焦点合わせが可能であること、カメラ長等のレンズ条件や電子線の絞り角等の照射条件により BF 像および ADF 像のコントラストの調整/選択がある程度可能であるため一般に低元素から構成される生物系試料でもコントラストのある像が得やすいことが挙げられる。名古屋大学 エコトピア科学研究所 超高压電子顕微鏡施設の反応科学超高压走査透過型電子顕微鏡(JEM-1000K RS)は、加速電圧 1000 kV で STEM 機能を有しているため、上述の高い電子線透過力による厚い生物試料の 3 次元観察に適した装置であると言える。

また、生物系試料の電子顕微鏡観察では真空中で試料を安定に観察するために、試料の脱水・固定・染色といった前処理を行う必要があり、この過程でサンプルの変形が伴うことで、生きている時点とは異なる形状となることが多い。この問題に対しては試料を周囲の溶媒ごと凍結させその状態を維持したまま観察を行うクライオ顕微鏡法という手法が有効である。上述の超高压電子顕微鏡は液体窒素を用いた冷却ホルダーおよび試料取り付け用のクライオトランスファーを用いることができるため、試料温度を極低温に維持したままの状態を取付から観察まで実施することが可能である。

2. 観察結果

①正常ラット腎臓由来の培養細胞(NRK)の常温トモグラフィー観察

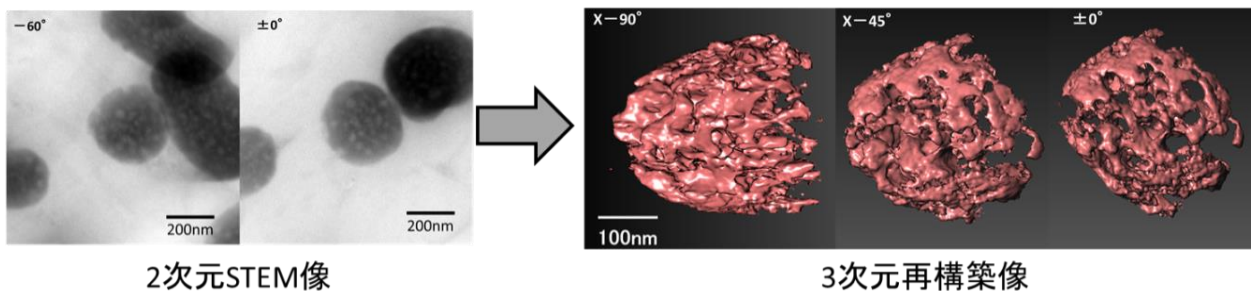


2次元STEM像

3次元再構築像

試料を -62° から $+60^\circ$ まで傾斜させながら 2° ごとに計 61 枚の 2 次元 STEM 像(観察倍率 10,000 倍、ADF 像)を撮影した。サンプル厚は $3\mu\text{m}$ であり TEM 用サンプルとしてはかなり厚いが、上左図の通り電子線が十分に透過していること、十分なコントラストが得られていること、傾斜時にも視野全体でフォーカスが合っていることが見て取れる。次にその 2 次元像をもとに専用ソフトにて 3 次元再構築した像が上右図である。3 次元像に再構築することで撮影時の試料傾斜方向以外の方向からの像や内部の断面像などが取得でき、試料内部の各器官の立体的な配置が把握できた。

②ヒトの毛髪中メラニン顆粒の常温トモグラフィー観察

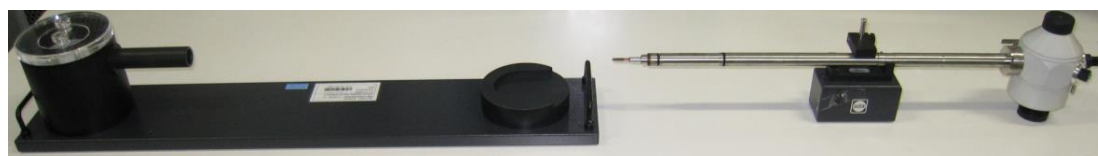


2次元STEM像

3次元再構築像

試料を ± 70 度の範囲で 2 度ずつ傾斜して撮影した計 70 枚の STEM 像(観察倍率 150,000 倍、BF 像)を元に構築した 3 次元像を上を示す。3 次元像に構築することで、空隙はメラニン顆粒の内部に広く分布していること、空隙の形は真球ではなく鉛直方向にやや伸びた楕円体であることを明らかにした。

③正常ラット腎臓由来の培養細胞(NRK)のクライオ観察

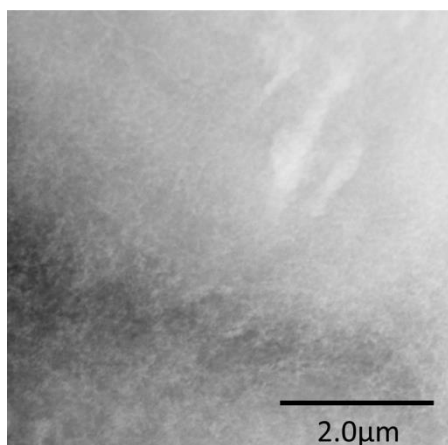


ワークステーション

クライオホルダー

上写真のワークステーションにクライオホルダーを差し込み、クライオホルダーのタンク部およびワークステーション内部に液体窒素を充てんすることで、ホルダー先端のサンプル取り付け部を冷却した。その環境下で同じく液体窒素にて十分に冷やされたサンプルをホルダーに取り付けた。ホルダーをワークステーションから抜き即座に電子顕微鏡に差し込むことでサンプルが空気に接する時間を極力短くし、サンプルの結露を防止した。試料温度は試料取り付け時は約 -190°C 、観察時は $-160\sim-170^{\circ}\text{C}$ と常に極低温の状態を維持した。観察はTEM結像法とSTEM結像法の双方で実施し比較した。なおTEM結像法においては撮影視野とは別の視野で焦点合わせを行うことで試料損傷を軽減するMDS機能(Minimum Dose System)を用いた。

今回の検討では、TEM結像法ではMDS機能を用いても焦点合わせ時に試料の損傷が目立ち、短時間での焦点合わせが必要であるのに対し、STEM結像法では比較的長時間にわたって試料の形状が維持されることが判明した。これはTEMでは焦点合わせ時および撮影時に視野全面に電子線が照射され続けるのに対し、STEMでは電子線は走査されるため同一箇所には極短時間しか照射されないことが原因と考えられる。



サンプルは電子顕微鏡用メッシュの上で培養させたラットの細胞(NRK)を液体エタンにて急速凍結して作成したものであり、細胞の周辺は非晶質の氷が覆っている状態である。

STEM結像法(倍率24,000倍、ADF法)により撮影した画像を左に載せる。図中右上側に細胞が存在している。サンプル厚は約 $5\mu\text{m}$ と非常に厚いサンプルであるが、ある程度のコントラストを得ることに成功した。

今後、より鮮明な画像を得るために、観察条件やサンプル処理条件の検討を行う予定である。

3. まとめ

加速電圧 1000 kV でのSTEM観察を行うことで、生物系試料の3次元像を構築することに成功した。本試料に限らず厚い生物系試料の立体構造把握には超高圧電子顕微鏡によるSTEM観察が有効であると考えられる。また、超高圧電子顕微鏡でのクライオ観察では、TEM結像法よりSTEM結像法の方が試料損傷の面で有用であること、STEMによりある程度のコントラストを得られることがわかった。

謝辞

本報告に当たり、ホーユー株式会社の今井健仁様、名古屋大学エコトピア科学研究所の田中信夫教授、丹司敬義教授、荒井重勇特任准教授、名古屋大学理学研究科の臼倉治郎名誉教授、成田哲博准教授、南方志帆様にはサンプルご提供から技術指導まで幅広くお世話になりました。心より御礼申し上げます。