

小収束角 HAADF-STEM トモグラフィによる細胞膜構造の解析 ～次世代のフリーズエッチトモグラフィの可能性に向けて～

Structural Analysis of Cell Membranes

by Small Convergence Angle HAADF-STEM Tomography

諸根 信弘^a, 青山 一弘^b

Nobuhiro Morone and Kazuhiro Aoyama

^a 国立精神・神経センター神経研究所

^b 日本エフィー・アイ株式会社アプリケーションラボラトリー

要旨 細胞膜の細胞質側表面を急速凍結・ディープエッチング像で観察すると、カベオラやクラスリン被覆ピット、アクチン膜骨格のネットワークによってアンジュレーションが激しいことがわかる。本特集では、このように視野全体で大きく焦点距離が異なる構造のプラチナレプリカについて、取差補正付き3コンデンサシステムを持った電子顕微鏡を利用して、従来のTEMトモグラフィと収束角を変化させたSTEMトモグラフィによる3次元再構築像を比較した。小収束角HAADF-STEMトモグラフィによる3次元再構築像では、ミッシングウェッジによる計算上のアーティファクト（ゴースト）がほとんど生じないことが初めて明らかとなった。細胞膜研究の新しいツールとして期待できる。

キーワード：細胞膜、クラスリン被覆ピット、フリーズエッチ、STEM収束角、HAADF-STEMトモグラフィ

1. はじめに：細胞膜構造とSTEMトモグラフィ

細胞膜の厚さは僅か5 nmではあるが、電子顕微鏡で観察すると膜表面のアンジュレーションが激しいことがわかる。特に、細胞質側表面には、クラスリン被覆ピットやカベオラ、アクチン膜骨格などの膜ドメインに関わる構造が構築されているため、通常の2次元透過像で観察される以上に、膜表面の凹凸が著しく、複雑な3次元構造が形成されている。これまでに、私たちは、急速凍結した細胞膜をディープエッチング後にロータリーシャドウウィングしたプラチナレプリカを試料として、電子線トモグラフィによる3次元再構築法（Freeze-etch Tomography：フリーズエッチトモグラフィ）を開発してきた。特に、細胞質側表面から10 nm領域にあるアクチン線維のメッシュワークを「膜骨格」と定義して、このアクチン膜骨格で囲まれたメッシュの大きさを3次元定量解析することに成功した¹⁾。この電子線トモグラフィによる結果は、超高速ビデオカメラによる、生きた細胞膜上での膜分子の1分子運動解析と良い相関性を示すと同時に、膜骨格フェンスモデルの構造的基盤を初めて明らかにした^{1~4)}。

このようなアンジュレーションの激しい生物試料を、より高い分解能で観察するためには、①厳密には焦点距離の異なる

複数の観察点に対して、より多く焦点を併せることが要求される。併せて、②金属レプリカ試料のプラチナが持つ高いコントラストは、焦点を合わせるうえで有効であると期待できるため、このような元素番号効果を活かした観察法が望まれる。

本特集の別稿で議論されているように、最近、生物分野においてもSTEM（Scanning Transmission Electron Microscope）トモグラフィを用いた三次元構造解析がTEMトモグラフィに対して多くの優位点を持つことが明らかになってきた^{5,6)}。本稿では、既述の課題①②を検討するために、アンジュレーションの激しいプラチナレプリカに対して、STEMトモグラフィを試みた。その結果、小収束角HAADF（High-Angle Annular Dark-Field）モードで、これまで以上に優れた3次元再構築像が得られたので、その実験的試行錯誤を概説したい。

2. STEMトモグラフィとプローブ収束角

青山らの論文⁵⁾でも注目されている、厚みのある試料のSTEMトモグラフィでは、その入射電子線によるプローブの収束角（Convergence Angle）が得られる3次元再構築像の画質に大きく影響する。簡単な光学的考察から明らかのように（図1）、収束角を小さくすれば被写界深度が深くなり、より広い範囲でフォーカスのあった像を撮ることができるためである。これは、普通の一眼レフカメラにおける絞りの役割と同じであり、逆に収束角を大きくとることにより極端に

^a 〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1

E-mail: morone@ncnp.go.jp

2009年8月29日受付

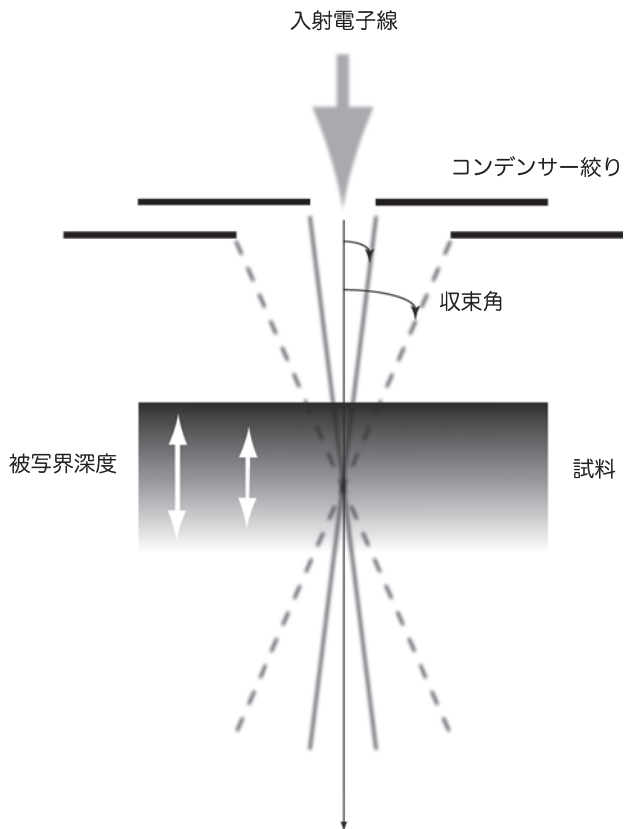


図1 電子線収束角と被写界深度の関係

STEMでは収束した電子線を走査するが、この収束角を変えることにより被写界深度の深さを変えることができる。つまり、小さいコンデンサ絞りをを用いて、入射電子線の収束角を小さくすれば、より広い範囲でボケの少ない像を得ることができる。アンジュレーションの激しい試料を観察するためには小さい絞りを使うことが有利である。

浅い被写界深度とすることも可能である。フリーズレプリカを試料とし、高い分解能での構造解析を行おうとした場合、厚み方向の凹凸が問題となる。つまり、飛び出した部分とへこんだ部分の両方にフォーカスをあわせられなければ精密な構造解析はできない。これはトモグラフィのために試料を高傾斜した場合にも要求される。現在の自動化されたトモグラフィデータ取得システムでは、高傾斜時にも全体にフォーカスをあわす機能（ダイナミックフォーカス）およびオートフォーカス機能が備わっているが、高傾斜した凹凸の多い試料で全視野に対してフォーカスのあった像を撮影するためには被写界深度の深さは非常に重要である。

実際、ディープエッチングされた細胞膜の細胞質側表面には、直径7～9 nmのアクチン線維のネットワークが3次的に絡んで広がっている。そのなかに、膜陥入構造である直径100～300 nmのクラスリン被覆ピットや直径50～80 nmのカベオラがドメインを形成している（図2）。そのため、試料傾斜角が0度のときでも、同一視野で観察される構造物には、100 nm以上の高低差があることになる。これまで私たちが実施してきたフリーズエッチトモグラフィでは、細胞

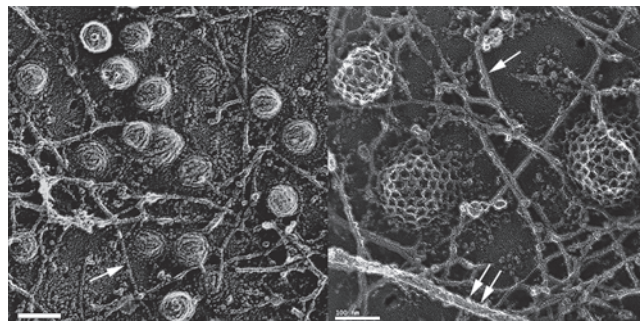


図2 繊維芽細胞の細胞質側表面のディープエッチング像カベオラ（左図）やクラスリン被覆ピット（右図）の間をアクチン膜骨格のネットワーク（1本矢印）や微小管（2本矢印）が走っている。

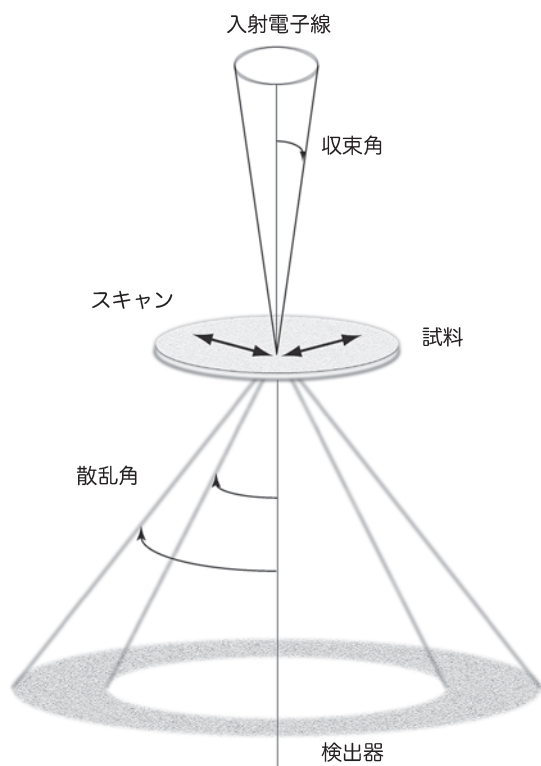


図3 HAADF-STEMと試料の関係

HAADF 検出器で検出される電子線の高角散乱強度は、試料に含まれる原子の原子番号の2乗に比例する。本研究で扱うフリーズレプリカ試料は、高い像コントラストが期待できる。

質側表面から10 nmまでに広がるアクチン膜骨格で囲まれる領域が、50～200 nm程度であることを明らかにした。そのため、従来のTEMトモグラフィでも、解像度の面では充分であった。しかし、アクチンフィラメントの5.5 nm間隔のストライプ模様や、カベオラやクラスリン被覆ピットに特徴的な表面模様のような、タンパク質複合体の分子構造を反映した構造を、アンジュレーションの激しい視野で定量評価するためには、小収束角STEMトモグラフィのような次世代の可視化技術が必要である。

表 1 本研究で比較された電子線トモグラフィの観察条件

	収束角 mrad*	3次元再構成
小収束角 STEM tomography	0.5	SIRT**
大収束角 STEM tomography	15	SIRT**
TEM tomography		SIRT**

mrad* : $2\pi \text{ rad} = 360^\circ$ なので, $0.5 \text{ mrad} = \text{約 } 0.0285^\circ$

SIRT** : Simultaneous Iterative Reconstruction Tomography

連続傾斜像の取得 : Titan80-300 (FEI)

3次元再構築の計算 : Inspect3D (FEI) と ResolveRT Amira for microscopy (Mercury computer systems, Inc)

3. HAADF-STEM トモグラフィとプラチナレプリカ

本研究で扱った STEM は, 高角環状暗視野 (HAADF: High-Angle Annular Dark-Field) モードの特徴を良く生かしている. この方法では, 非常に小さく絞った電子線を試料にあてて, プローブの位置を変えてスキャンしながら, 散乱強度をマッピングする (図 3). このとき, 電子線の高角散乱強度は, 試料に含まれる原子の原子番号の 2 乗に比例する. 本研究のフリーズレプリカ試料は, プラチナ (Pt: 原子番号 $Z=78$) で作製されているため, 原子番号効果により, 高い像コントラストが期待できる⁷⁻⁹. 実際, 小収束角と HAADF の条件を効果的に調整することで, フリーズレプリカのトモグラムが実現できたので, その詳細を説明したい.

4. 小収束角 HAADF-STEM トモグラフィの実際

これまでの電子顕微鏡では広い範囲で収束角を自由自在に変更することは難しかったが, 本研究では, 3枚の集束レンズを持つ Titan80-300 (FEI) により, 小収束角 HAADF-STEM トモグラフィが可能となった. また, 今回使用した装

置は集光系の収差補正装置を実装しているので, 収束角を非常に小さくしても STEM プローブを充分小さく絞ることが可能であり, 分解能低下も問題とならなかった. 従来装置 (例えば FEI TECNAI F30ST) でも, 極端に小さいコンデンサ絞りを使う場合, 小さい収束角を作ること自体は可能ではあるが, このとき極端な電子量の減少と分解能の低下を招くことになり, 実用には耐えない. 詳細については本稿では触れないが, 3枚の集光レンズで構成された集光系により電子線量

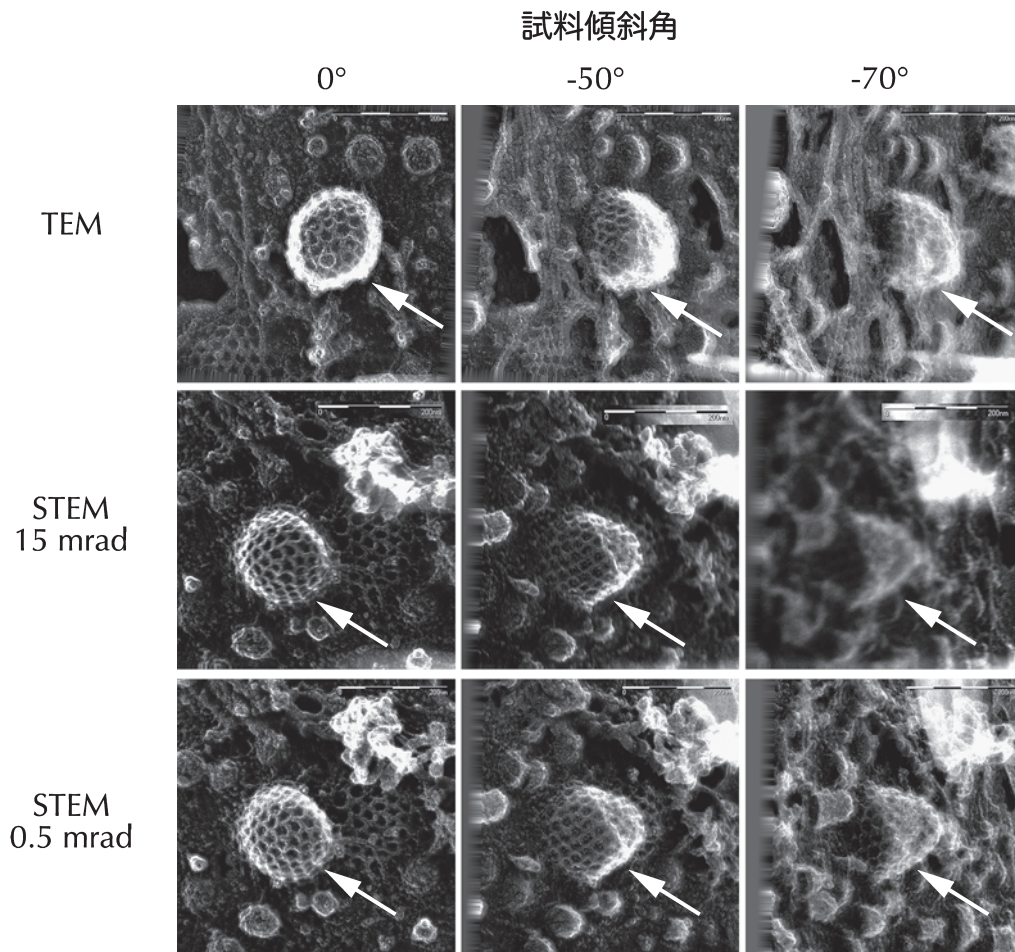


図 4 小収束角 STEM 像では高傾斜角でも視野全体に焦点があっている

従来の TEM に加えて, 広収束角 (15 mrad) STEM と小収束角 (0.5 mrad) STEM モードでの観察像を, 試料傾斜角 0 度と -50 度 (あるいは -70 度) で比較した. 各観察モードで, 白い矢印は同一のクラスリン被覆ピットを示している.

は変えずに収束角だけ変化させるということが可能となったことも、明記しておきたい。

本研究では、マウス胎児由来線維芽細胞の細胞質側表面を裸出させ、急速凍結・ディープエッチング・ロータリーシャ

ドーウィングを経て、プラチナ製のフリーズレプリカを調製した。このレプリカ試料を用いて、小収束角STEMトモグラフィ、大収束角のSTEMトモグラフィ、TEMトモグラフィによる3つのデータを比較した。加速電圧は300 kV, STEM

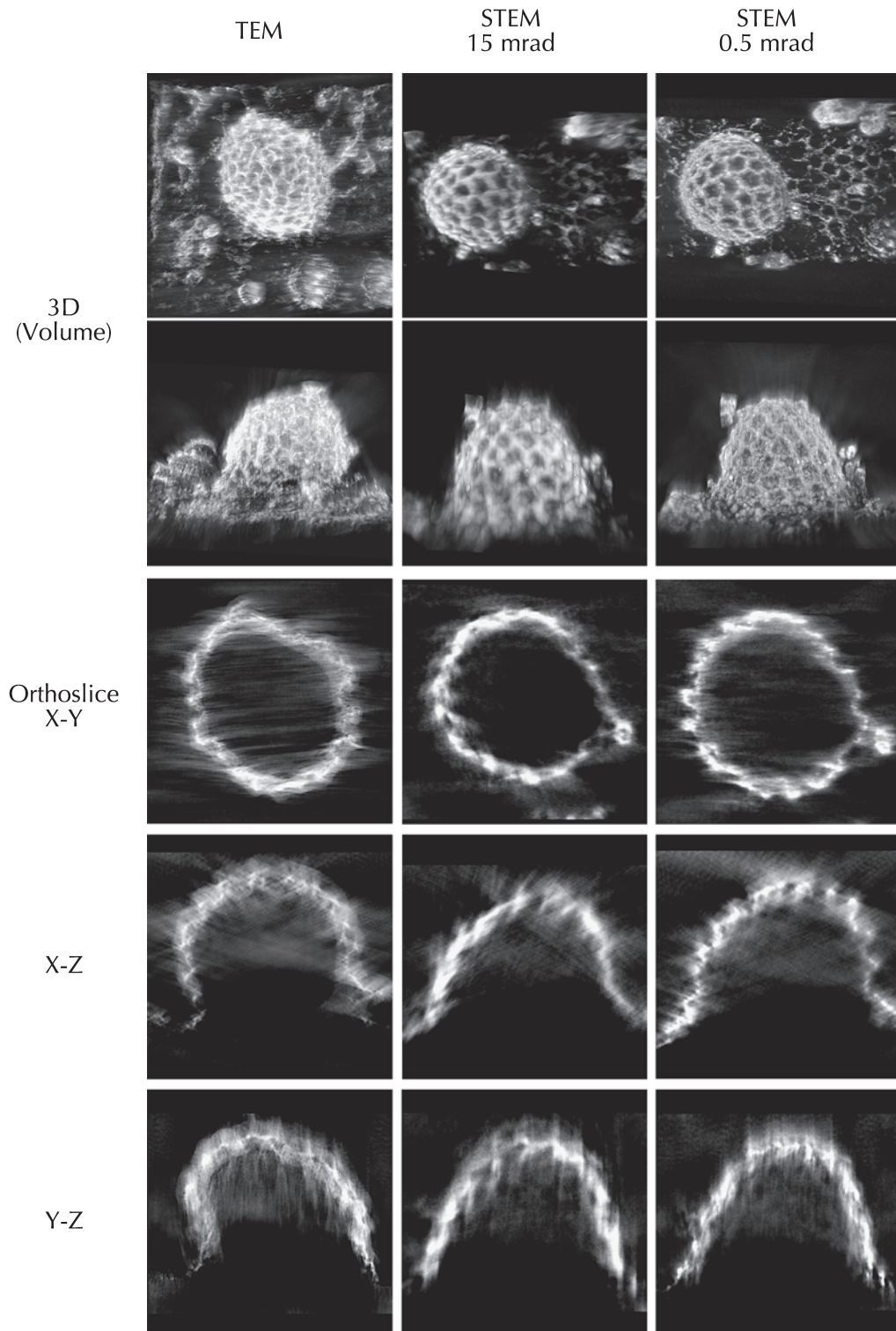


図5 小収束角STEMトモグラフィによる3次元再構築像ではアーティファクトによるゴーストがない。ボリュームレンダリングによる3次元像とオルソスライスによる断面像を利用して、再構築計算で生じるアーティファクトによるゴーストを比較した。

収束角は少収束角で 0.5 mrad, 大収束角で 15 mrad とした (表 1). ちなみに従来装置における STEM (高分解能) 観察時の収束角は 7 mrad 程度の収束角である. なお TEM 像の取得にはガタンエネルギーフィルタによるゼロロス像を用いた.

電子線トモグラフィの第 1 ステップは, 連続傾斜像の取得になる. 各々のデータセットの高傾斜時 (50 ~ 70 度付近) の像を比較してみた. 図 4 のように, 小収束角の STEM トモグラフィで, 直径 150 nm 程度のクラスリン被覆ピット全体に良く焦点が当たっていることが分かる (白い矢印). このように陥入が進んだピットを観察する場合, TEM モードでは, ピットの辺縁部に焦点が合いにくく, コントラストが白くハレーションすることがある. この傾向は, 高傾斜像で著しくなる. これに対して驚くべきことに, 小収束角の STEM モードでは, -70 度でも, 比較的良く焦点が当たっていることがわかる. このような連続傾斜像の 1 枚 1 枚に見られる, 焦点やコントラストによる像質も, 最終的な 3 次元再構築像に影響を及ぼすことが予想される.

本研究では, 1 軸傾斜の SIRT によって, クラスリン被覆ピットの 3 次元再構築の計算をおこなった. 図 5 に, ボリュームレンダリングによる全構築像やオルソスライスによる XY, XZ, YZ 断面像 (中心付近) を示す. TEM トモグラフィによる 3 次元再構築像は, コントラストが低い. クラスリン被覆ピットのようなアンジュレーションの激しい試料では, 視野全体に焦点を合わせることが難しく, 特に高傾斜時の像質の悪化が顕著であるため, 再構築ボリュームに高傾斜データがうまく寄与していない. そのため, 全構築像や断面像でも, トモグラフィのアーティファクトが目立つ. これに対して, 大収束角 STEM トモグラフィによる 3 次元再構築像は, 従来の TEM トモグラフィと比べてコントラストは高い. この理由には, HAADF によるプラチナレプリカに対する元素番号効果も効いていると考えられる. しかし, 収束角が大きいことで被写界深度が浅くなるため, フォーカスが少しずれると傾斜像において像のボケが顕著になってしまう. そのボケのため再構築ボリュームもボケてしまっている. また, 大きくボケた傾斜像は再構築に使えないため (含めると悪化してしまう), 取得したにもかかわらず再構築時に捨てざるを得なかった角度があり, そのためのアーティファクトの増加を招いている. 本研究で注目した小収束角 STEM トモグラフィでは, もっともコントラスト高く, ゴーストの少ない良質な 3 次元再構築像が得られることが初めてわかった. 試料傾斜角が 75 度付近まで視野全体に焦点があい, ほぼ完璧な連続

傾斜像が取得されているので, いわゆるミッシングウェッジによるアーティファクトもまったく目立たない. 見た目の定性的にも, 非常に美しい再構築ボリュームが得られた. 当然のことだが, ほとんどの傾斜角度の視野全体に焦点があうと, 連続傾斜像取得時の位置補正もスムーズに進むので, 3 次元再構築の精度も向上する.

5. おわりに

本研究により (定性的ではあるが), 小収束角 STEM トモグラフィ, 通常の広収束角 STEM トモグラフィ, 従来の TEM トモグラフィによる 3 次元再構築像について, 初めて比較することができた. 小収束角プローブを用いた STEM が, 少なくともプラチナ製のフリーズレプリカ試料に対しては, 最良であることが明らかとなった. 特に, 細胞膜の細胞質側表面にあるアンジュレーションの激しい構造群 (膜骨格, カベオラ, クラスリン被覆ピット) に対しては非常に有効であり, これまで私たちが提案してきたフリーズエッチトモグラフィの次世代版として大いに期待できる. 収差補正付き 3 コンデンサシステムを持った電子顕微鏡であれば, 入射電子線の収束角を小さく (0.5 mrad 程度まで) 絞ることにより生じるデメリットは何もない. 研究者にとって唯一の難点は, 装置の価格が高価であることであろうか.

文 献

- 1) Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, S.R., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J. and Kusumi, A.: *J. Cell Biol.*, 174, 851–862 (2006)
- 2) Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K. and Kusumi, A.: *J. Cell Biol.*, 157, 1071–1081 (2002)
- 3) Kusumi, A., Umemura, Y., Morone, N. and Fujiwara, T.: *Anomalous Transport: Foundations and Applications*, edited by Rainer Klages, Günter Radons, Igor M. Sokolov. 545–574 (2008)
- 4) Morone, N., Nakada, C., Umemura, Y., Usukura, J. and Kusumi, A.: *Methods Cell Biol.*, 88, 207–236 (2008)
- 5) Aoyama, K., Takagi, T., Hirase, A. and Miyazawa, A.: *Ultramicroscopy*, 109, 70–80 (2008)
- 6) Yakushevskaya, A.E., Lebbink, M.N., Geerts, W.J.C., Spek, L., van Donselaar, E.G., Jansen, K.A., Humbel, B.M., Post, J.A., Verkleij, A.J. and Koster, A.J.: *J. Struct. Biol.*, 159, 381–391 (2007)
- 7) Midgley, P.A. and Weyland, M.: *Ultramicroscopy*, 96, 413–431 (2003)
- 8) Kübel, C., Voigt, A., Schoenmakers, R., Otten, M., Su, D., Lee, T.C., Carlsson, A. and Bradley, J.: *Microsc. Microanal.*, 11, 378–400 (2005)
- 9) Friedrich, H., McCartney, M.R. and Buseck, P.R.: *Ultramicroscopy*, 106, 18–27 (2005)