

CEMOVIS 試料作製法

Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections

岩崎 憲治^{a, b}, 宮崎 直幸^{a, b}, 伊藤 喜子^{b, c}, 高木 淳一^a

Kenji Iwasaki, Naoyuki Miyazaki, Yoshiko Ito and Junichi Takagi

^a大阪大学蛋白質研究所^bCREST, JST^cライカマイクロシステムズ(株)

要旨 CEMOVIS は、液体に近いガラス状の水に細胞や組織等の厚い試料を固定し、そのまま冷却ガス窒素雰囲気中で超薄切片を作製する技術である。樹脂切片のように架橋・脱水・染色を行わないため、それにとりもなう微細構造の破壊や、構成分子の流出が起きない。尚かつ水和した状態の試料を観察できるので、より生きている状態に近い細胞・組織観察が期待できる。一方で、新しい方法ゆえにアーティファクトに対する検証も続いている。本講座では、CEMOVIS の手順と必要な道具、その利点とアーティファクトの詳細、それらを考慮した上での CEMOVIS の利用方法を紹介する。

キーワード：CEMOVIS, 非晶質, クライオ, 加圧凍結

1. はじめに

一般に、細胞や組織のような生物試料を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察するには、樹脂に包埋し超薄切片に切削して観察する。この樹脂包埋法には、アルデヒドやオスミウムによる試料の固定、有機溶媒による脱水、樹脂への置換操作が含まれ、その過程により微細構造が破壊され、構造アーティファクトが生じる。例えば、固定の過程では細胞内の物質の凝集が生じ、脱水、樹脂置換の過程では固定されなかった物質の流出が起こる。その結果、観察される試料は生理的条件からはかけ離れた状態のものになってしまう。

この問題は試料をガラス (非晶質) 状の水になるように瞬時に凍結し、水和した状態で観察できるクライオ電子顕微鏡 (Cryo-TEM) 法を使うことで解決できる。通常生物試料での Cryo-TEM といえば、精製したタンパク質を液体エタンに浸漬凍結した氷包埋試料の観察を指すが、比較的小さな原核細胞や真核細胞でも接着細胞の薄く広がった領域においてはこの浸漬凍結によりそのまま Cryo-TEM 観察できる。

しかしながら組織や細胞の内部を観察するには、試料が厚過ぎてそのままでは観察できない。これは Cryo-TEM に限ったことではないが、TEM で観察するには電子線が透過出来るほど試料は薄くなければならないという制約を受けるからである。そのような厚い組織や細胞を観察するには、非晶質に凍結した試料を Cryo-TEM で観察できるように薄

く加工しなければならない。薄くする方法としては現在、クライオミクロームを使用して超薄切片を作製する Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections (CEMOVIS) と Focus Ion Beam (FIB) を使用した削りだし (イオンミリング)^{2,3)} の二法が現実レベルに達しているが、FIB を使用した Cryo-TEM 観察は装置も含めてまだまだ一般化しているとは言い難い。

一方、CEMOVIS は様々なレビュー記事や教科書にも紹介される程、安定してきた方法であるといえる^{3,4)}。この CEMOVIS という言葉は 2004 年のレビュー記事において、Jacques Dubochet によって初めて使われるようになった¹⁾。本方法は非晶質の層に試料を凍結物理固定し、そのまま相転移が起きないように層を維持して薄切し、Cryo-TEM で観察するという技術である。よって、いわゆる徳安法を指す意味で使われる凍結超薄切片法とは大きく異なる。本講座では、この誤解を避けるため、表題とも併せて CEMOVIS で統一し、CEMOVIS の手法に関して紹介する。CEMOVIS は、細胞あるいは組織を天然に近い水和した状態で観察ができる点で従来法と比べ非常に優れており、高分解能観察の可能性があるが欠点もある。それは水をそのまま薄切することによる様々なアーティファクトであり (3 節参照)、これについての評価は、現在も続いているところである。また、全ての構成分子が像に含まれ、かつ互いに近い密度 (電子顕微鏡像ではグレースケールの濃度) としてコントラストを形成するので、微形態からの構造物の帰属が困難な点もあげられる。

これら CEMOVIS の利点欠点の詳細、そしてそれらを考慮した上での CEMOVIS の利用方法をその手順と必要な道具を紹介したうえ述べていきたい。尚、実際実験をする上でも役

¹ 〒 565-0871 吹田市山田丘 3-2
TEL: 06-6879-8608
E-mail: ikenji@protein.osaka-u.ac.jp
2011 年 11 月 15 日受付

に立つ CEMOVIS の詳細なプロセスは、文献 5 にも詳しく記述されている。参考にされたい。

2. CEMOVIS 試料の作製手順

2.1 加圧凍結

本方法を用いる眼目の一つは、氷晶の形成を防ぎながら非晶質状態に試料を凍結することである。厚さ $1\ \mu\text{m}$ 程度の非常に小さな体積であれば、液体エタンを使用した浸漬法にて達成させられる。しかし $1\ \mu\text{m}$ をはるかに超える培養細胞や、組織片等であれば、その内部と表面の熱伝導に時間がかかるため、凍結時に氷晶の成長が起きてしまう。特に大きな六方晶は細胞内の構造を壊し、歪め、Cryo-TEM の通常観察条件では結晶の多重散乱のため、電子線を殆ど通さない像として現れる（大抵の CCD カメラでは、真っ黒なコントラストとして表示される（図 3a の黒矢頭部参照））。ここで登場するのが加圧凍結装置である。2100 bar（ ≈ 2072 気圧）を瞬時に試料にかけることで液体の粘性を高め、これと同期して液体窒素で急速冷却を行うことで、試料の深部まで晶質形成を抑えた状態で凍結を行うことができる。試料表面から $200\ \mu\text{m}$ までは非晶質層を形成できるという報告もあるが⁶、無論、試料の組成に依存する。1960 年代にスイス ETH の Moor と Riehle によって開発された本装置の使用は、むしろ凍結置換法においてよく知られており、オルガネラ等の微形態保持が非常に良いのもこの晶質形成抑制のおかげである⁷。現在市場に出回っており、ポピュラーな加圧凍結装置は 2 種類である。一つはライカ社の EM PACT2（図 1a）であり、もう一つも現在はライカ社の（かつて Baltec/Balzers 社が扱っていた装置の後継機に相当する）Leica EM HPM100 である（図 1b）。筆者らは EM PACT2 を使用している。本装置では培養細胞やバクテリア、単離したオルガネラ等の溶液試料の場合は、内径 $0.35\ \text{mm}$ の銅製のチューブ（図 2a）に吸引し（図 2b, c）、組織片の場合は真ん中が窪んだ外径 $2.8\ \text{mm}$ の平板キャリア（図 2d）の上に乗せ、装填する。スイッチを押せば、コンプレッサーで蓄えられた空気圧が液体の加圧媒体（通常メチルシクロヘキサン）を通して試料にかかり、同じくして液体窒素のジェットが双方向から試料を冷却する仕組みになっている。

さて、加圧凍結をする前に凍結防止剤を試料に加える。我々がよく使用するのはデキストランで、最終濃度が 20% になるように加える。Dubochet らのやり方に従っているわけだが、浸透圧による影響があまりないことがデキストランを選んだ理由として記述されてある⁵。図 3a は我々のラボで大腸菌に対して、デキストランを加えずに CEMOVIS を行った画像であり、図 3b のデキストランを加えた場合と比べると、非常に氷が歪んで強度が弱いように見える。一方、図 3b の方では氷がしわしわに歪んでいないのがわかる。このことから、凍結防止剤は晶質形成抑制としての役目だけでなく、粘性の保持にも役に立っていると考えている。

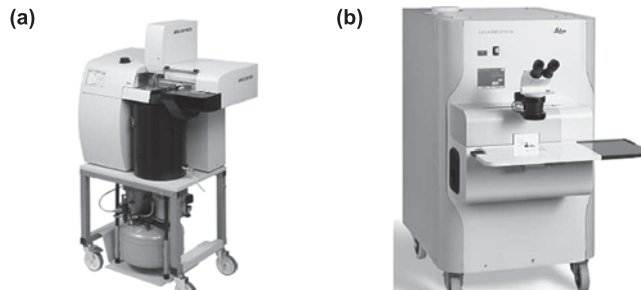


図 1

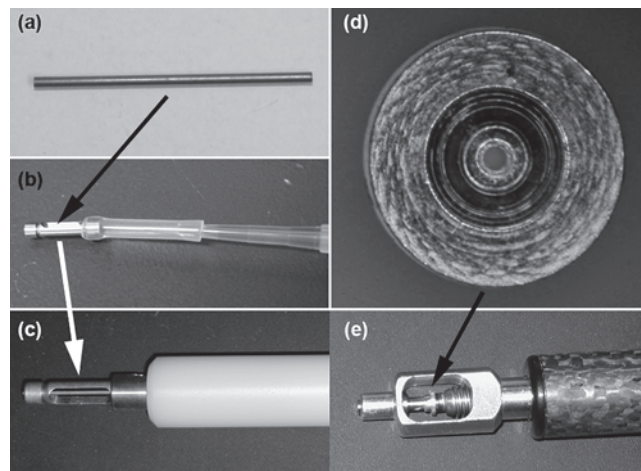


図 2

2.2 試料キャリアのトリミングと精密トリミング

この節の表題はトリミングと書いたが、化学固定切片の場合とは大きく異なる。クライオミクロームでは低温環境下のもと、ナイフワークのみでトリミング作業を行うため、銅製の試料キャリアの外壁をあらかじめ除去しておかないと膨大なトリミング作業を行うことになる。そこで、前節のチューブを使って凍結した場合は専用のチューブカッターを使用し、チューブの両端を切断する。平板キャリアの場合も、これ専用のカッターを使用し、小さく切り出す。この場合は目的によって様々な切り方があるが、扇状に切ると試料まで早く到着でき、手早く薄切に着手できる。

この後、一般的な樹脂包埋法で行う精密トリミングを行う。各種キャリアカッターの金属ナイフで切出した断面はかなりラフなため、電顕レベルの薄切が出来るレベルまで面精度を上げる必要がある。また、カッターが触れた凍結試料面に小さな亀裂（クラック）が入っている事が多く、ここを除去する必要もある。さらに銅キャリアと凍結試料は共存して超薄切片を作製することが出来ないため、試料部のみを突出させる必要がある。

そこで、ダイヤモンドナイフ製のクライオ用トリミングナイフを使用して薄切に不要な銅キャリア部を削除し、クラックの無い凍結試料部を突出させ、希望する超薄切片に最適なサイズへの調整を行う（図 4）。切削安定性のためには 45° のクライオ用トリミングナイフを用いるとピラミッド状に試

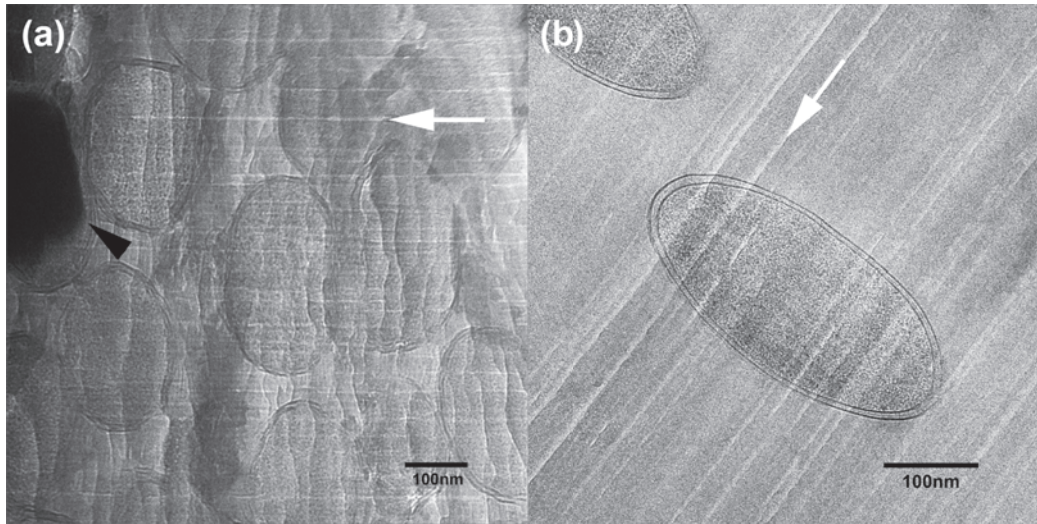


図 3

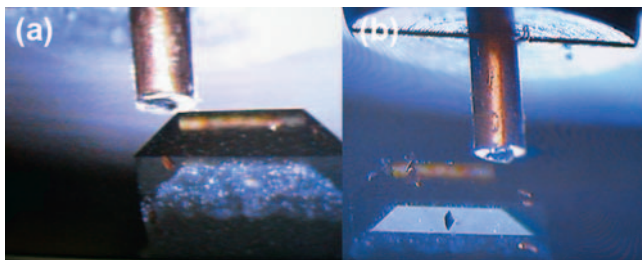


図 4

料ブロックが出来上がる。しかし、銅チューブの場合は使用できる試料面直径が $350\ \mu\text{m}$ しかないため、 20° のクライオ用トリミングナイフを使ってより切り立ったピラミッド状にすることで切削効率をあげると良いだろう。

2.3 クライオセクション

構造観察向けの凍結置換法では加圧凍結後、凍結状態に試料を保持しながら四酸化オスmiumを含む有機溶媒に置換、脱水し、最後は樹脂包埋をして薄切する。CEMOVIS では、加圧凍結後そのまま薄切を行う。つまり、操作行程自体は減

るため、Dubochet たちはこの利便性を述べている⁵⁾。

さて、本プロセスで必要になるのは無論、冷却ガス窒素雰囲気下で薄切作業のできるクライオマイクロトーム (図 5) である。非晶質部分の相転移がおきないように -135°C 以下に試料温度を保ちながら、薄切を行う。無論このときに空気中の水分による霜ができるだけ混入しないようにする。我々が用いているのはライカ社の UC6 及び FC6 だが、液体窒素がマイクロトームチャンバー左下部のプールに常に供給され、わずかに加温された冷却ガス窒素が、常にチャンバーの下部よりフローアウトしている。そのため、チャンバー内部は常に内圧が少し高い状態で冷却ガス窒素雰囲気下に保たれている。このため外気の流入を最小に抑えることが出来る。温度は、この冷気をモニターしながらヒーターにより正確にコントロールしている。よって温度コントロールに心配はないのだが、水気がない乾燥状態にあるため、試料自体が非常に静電気を帯びやすい。そこで、イオナイザーを頻繁に使用する。我々は、CEMOVIS 用に開発された CRION というイオナイザーと静電帯電銃の切り換えが可能な装置を使用している。

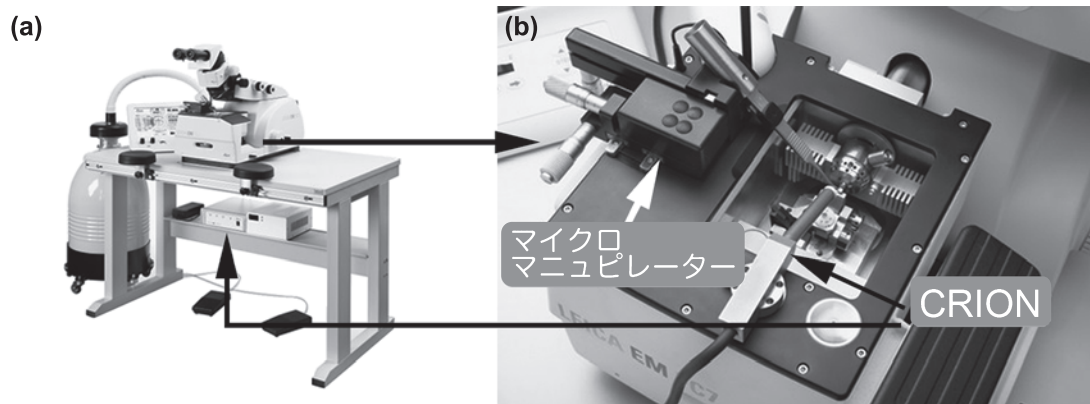


図 5

先程のトリミングが終了したあと、これから薄切する氷が透明であれば非晶質層であり、白色であれば晶質である。この状態で、クライオ専用のダイヤモンドナイフ（免疫電子顕微鏡用ではない CEMOVIS 用が望ましい）にて薄切を行う。非晶質であれば粘性が高いため、干渉色を帯びたセロファンのような透明な切片が得られる（図 6）。しかし、晶質であれば白っぽく、ガリガリと壊れていく。切片の厚みは一般に 50 ~ 100 nm の場合が多い。ダイヤモンドナイフの刃角であるが、経験的に小角度の方が良い結果が得られやすく、Diatome 社製の CEMOVIS 専用の 25° の刃角のものを筆者らは使用している。

CEMOVIS では、樹脂切片の場合における水のような伸展剤が使えないので、薄切の際に切片が丸まってしまう。連続して薄切する際は毛先でリードすることで、丸まってしまうようにするのだが、この切片の湾曲性が薄切の作業を最も困難なものにする。CEMOVIS 作業の中での最大の難関であろう。さらに、このときに前述の試料の帯電効果が作業をより困難にする。氷のリボンが、静電反発と思われる影響で飛んでなくなってしまうこともしばしばある。静電気制御の加減も、スムーズに切片を滑り出させる大切なポイントである。さて、最後にリボン状の氷をグリッドにのせるわけであるが、これらの作業はマイクロ・マニピレータがあると便利である（図 5b）。グリッドは、マイクログリッドあるいは 1000 メッシュのものを用いることが多い。小さなメッシュサイズは、試料支持に都合がよいからである。カーボン膜を貼り付けることもあるが、なくてもよい。

この後、一般的には鏡面仕上げしたステンレス棒や専用圧着ツールを使ってグリッドに載せたリボン状切片の上から圧力をかけ、グリッドとの密着度を高める。さもなければ、切片面がグリッドから離れて不安定で凹凸のある面を形成するので観察が難しくなる。しかし、この圧着法ではアーティファクトの一つである“割れ目”を引き起こしている疑いもあり、近年、意図的に帯電させた試料をグリッドにすいつけてしまう静電気法が Petersen らによって紹介された⁸⁾。CRION は、ここで役に立つ。通常はイオナイザーとして直流電流で強い負の電場をつくる。切り換えスイッチを入れると静電帯電銃にかわり、低い電圧で負の電場をつくる。このため、絶縁体の氷のリボンが負に帯電する。一方、アースされたグリッドは伝導性があるため、これに帯電した氷のリボンがひきつけ

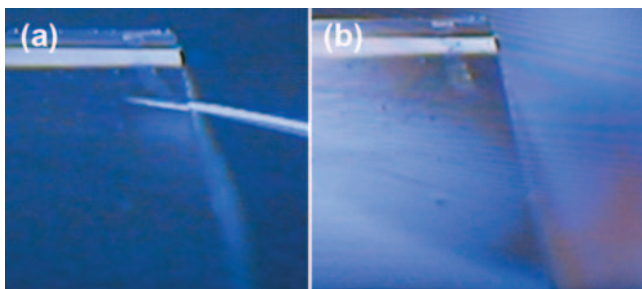


図 6

られる仕組みである。この場合、グリッドは、ある程度目の細かいメッシュの方が切片の引き付け効果が高くなるため、200 メッシュ以上の細かいものが適当だと思われる。

このようにして準備したグリッドをグリッドケースに入れ、液体窒素中に保存し、Cryo-TEM 観察作業へと移る。当たり前であるが、観察は低電子線照射システム（Minimum Dose System ; MDS あるいは Low Dose Kit）が必須である。通常の水包埋試料と同様、電子線損傷を受けやすいからである。

3. CEMOVIS のアーティファクト

CEMOVIS は、細胞あるいは組織を天然に近い水和した状態で観察ができる点で従来法と比べ非常に優れている。特に架橋、脱水等の処理がないため、生体試料構成分子の変性や非架橋分子の流出が起きないので微細構造が保持される。また、重金属による電子染色を行わず、試料中の構成要素そのものの主に位相コントラストによる観察を行うので試料の構成分子のポテンシャルを反映した画像情報が得られ、高分解能観察の可能性がでてくる。これらの利点を考慮すると、細胞の中の、あるいは細胞-細胞間や組織において、分子分解能で観察を目指すときの候補となる手法である。

一方、CEMOVIS にも欠点はある。それは氷をそのまま薄切することによる様々なアーティファクトである。CEMOVIS で観察上現れる薄切のアーティファクトは、主に 4 つのアーティファクトである；(1) ナイフマーク (2) クレバス (3) チャター (4) 圧縮。どれも CEMOVIS 特有の問題ではなく、常温の樹脂切片でも水に浮かべるという操作がなければ、生じる問題である。ナイフマークは、図 3 にある通りで、切削方向に生じる線状のアーティファクトである。これは、ダイヤモンドナイフの刃が完全にフラットでないことや薄切の際に生じた硬い氷の断片がダイヤモンドナイフの刃先に付着することにより生じる。クレバスは、切削の圧力により非晶質凍結切片の表面に生じる亀裂のことである。Cryo-TEM 観察においては鱗状に見えるものである（図 7a）。クレバスが、図 7a に観察されるように大きな裂け目の元になっているのかもしれない（アスタリスク部分）。

クレバスは、薄切する切片の厚みを薄くすると圧力が軽減され生じにくくなるという報告もあるが、切片の厚みを薄くすると逆に圧縮のアーティファクトがひどくなる¹¹⁾。電子線照射を繰り返すと、損傷によってナイフマークやクレバス部位が溶けて、あたかもないように観察されることがある。これは無論、ナイフマークやクレバスが試料表面にしかないからである。

図 7b の CEMOVIS 像の右下から左上方向に、黒い帯状のコントラストと明るい帯状のコントラストが繰り返されているが、チャターとは、この周期性のあるアーティファクトのことである。Zierold は、大きくゆるく波打つ非晶質凍結切片の様子を走査型電子顕微鏡（SEM）像で報告している⁹⁾。

これらのアーティファクトに比べ、構造の解釈を難しくす

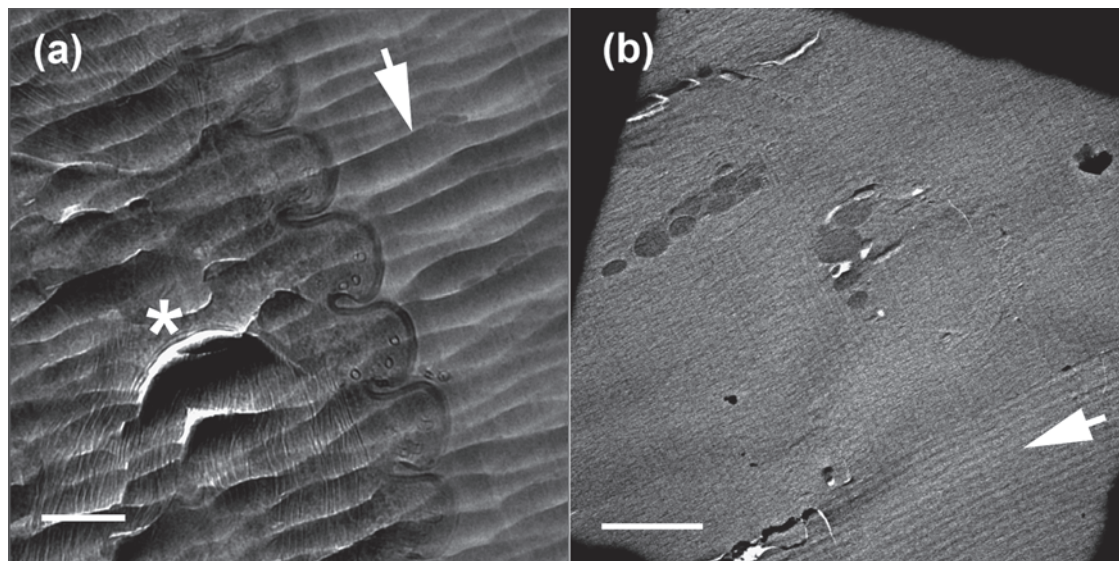


図7

るのが切片の圧縮によるアーティファクトである。というのもこれは切片ごとに、あるいは同じ切片の中でも圧縮の割合が異なっていることに起因する。この圧縮に関しては、Electron energy-loss spectroscopy (EELS) の測定によって、一般的に 35–55% 程度と見積もられている¹⁰⁾。これは、Richter が CEMOVIS において実際の構造がどれだけ変形しているかという実測値の報告と矛盾がない¹¹⁾。問題は、この試料の圧縮をどのように構造の解釈に反映するかである。図 3b を見て頂きたい。筆者らの研究室で撮られた大腸菌の CEMOVIS 像であるが、再現性よく楕円形をしている大腸菌の断面層が得られる。これは大腸菌が長軸方向に沿って切断されて楕円形に写っているのではなく、もともと短軸方向に沿って切断され丸い形であったものが圧縮によって楕円形になったものである。切削方向と楕円の向きが常に一定であることが大きな証拠である。また、内膜と外膜の間の距離が切削方向に対して垂直と水平方向では顕著に異なることも圧縮による変形を表している。大腸菌の長軸方向に平行な断面が観察されないのは、加圧凍結に使用する銅チューブに吸引する操作で起きると推測されている¹²⁾。圧縮がおきると、その分、切片の厚みが増す。仮に切削方向に圧縮が均一だと仮定し、密度が薄切前と後で変わらないと仮定すれば、幾何学的に元の大きさに補正できる（樹脂切片の観察の際に電子線照射によって生じる収縮とは、異なるので誤解のないようにして頂きたい¹³⁾）。無論、均一な圧縮と扱っている時点で、この方法には異論が出るだろう。大きな構造の歪みを作ってしまうが故に、4つのアーティファクトの中でも最も懸念されるアーティファクトである¹⁴⁾。

しかしながら、これらのアーティファクトを克服するために様々な試みがなされてきている。例えば、クレバスは 50 nm 以下の薄い切片では、あまり観察されなくなるとされている¹⁵⁾。また、チャターはナイフの薄切速度を大きくする

ことで抑えることができる¹⁶⁾。ナイフマークの問題は、表面構造の議論を避けることで回避できる。圧縮に関しては現状では如何ともしがたく、今後さらなる試行錯誤が必要となるものであるが、ナノメートルレベルでの構造に関しては影響がないという報告はある¹⁷⁾。その報告では、CEMOVIS で観察された酵母の 80S リボソームの構造と浸漬凍結したリボソームの構造を比較し、このような 30 nm 未満のナノメートルスケールの構造では、影響がみられなかったということを示している。我々も未発表ではあるが、同様の結果を得ている。従って、分子レベルでは内部のアーキテクチャーにはほとんど影響がないと考えてよいだろう。そうではあるが、まだ検証段階ということもあり、従来の樹脂包埋法等との比較をしながら構造解析を進めていくのが最良のアプローチであろう。

4. CEMOVIS のクライオ電子線トモグラフィー (TOVIS)

非晶質凍結切片を使用したクライオ電子線トモグラフィーのことを、Tomography of Vitreous Sections (TOVIS) と呼ぶことがある。この方法は MDS を使用しながら低倍率で目標物を探し、尚かつ、そこで数十枚におよぶクライオ撮影を行わなければならないので難易度は高く、樹脂切片の電子線トモグラフィーとは比較にならないくらい神経を使う (図 8)。我々が始めたころは、そもそもクライオ電子線トモグラフィーを考慮した制御システムを装備した電子顕微鏡システムが国内にはなかった (現在も、国産では存在しない)。よって、一枚一枚 MDS を使いながら手動でクライオ撮影していたが、現在は自動でデータ取得が可能となっている。

これまでの TOVIS の報告で顕著な成果をあげた一つの例は、Frangakis らのグループが報告した、上皮細胞におけるデスモソームの構造であろう¹⁸⁾。彼らはデスモソームの構造を TOVIS によって解析し、そこに存在するカドヘリン構造

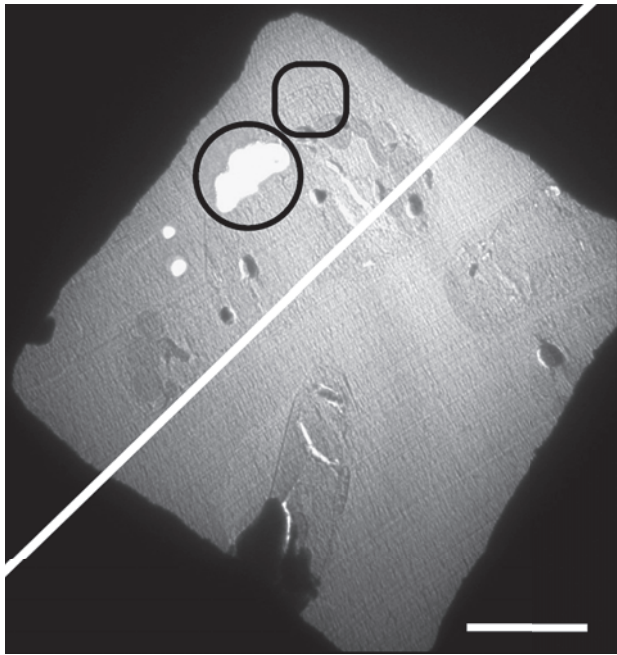


図 8

の可視化にサブトモグラム平均化法を用いた。非晶質凍結切片ではもちろん、信号/ノイズ (S/N) 比が非常に小さく、周期性構造物でない限り、単分子一つ一つを見分けるのは現状では不可能に近い。しかし TOVIS の場合、同一分子種の同一構造体が複数あれば、その分子を含む領域のトモグラフィデータ (サブトモグラム) の平均化によって S/N 比を改善し、分子のおおよその構造を可視化できる。この技術はクライオ電子線トモグラフィによる分子可視化が試されてくるようになってから、発達してきた。好熱菌の分子シャペロンのサブトモグラム平均化から始まり¹⁹⁾、最近ではコントラスト伝達関数 (CTF) による補正を考慮したサブトモグラム平均化法が登場し、より分解能改善が進んでいる²⁰⁾。注意したいのは単に三次元再構成像を足し合わせて、その数で割ったものではないことである。大抵、逆空間においてデータ欠損領域を考慮に入れつつデータをマージしてから新たに三次元再構成像を算出する。理論的には、単純な平均化より高品質の三次元像が得られる。このようにして得られたデスマソームのカドヘリン構造と、2003年に報告された加圧凍結-凍結置換法により作製された試料の電子線トモグラフィ像²¹⁾とを是非、比較して頂きたい。非晶質凍結切片ではカドヘリン分子が整然と並んで細胞間を接着している一方、加圧凍結-凍結置換法で作成した切片では高コントラストのため、サブトモグラム平均化をせずとも明瞭にカドヘリンが紐状に観察されたが、その構造は変形してしまっていた。これらの結果からも、それぞれの手法の長所短所が良く分かる。

5. CEMOVIS の適用方法

これまでのことをまとめると、CEMOVIS はオルガネラ等の形態を観察し、その形状を論じるにはアーティファクトの

ため、単独では不向きである。しかし、数十ナノメートルの大きさの超分子構造等の観察には向いているといえる。変性のない水和した、より天然に近い状態で細胞環境下における分子複合体観察ができるからである。クレバスをできるだけ抑え、小さな領域の観察を行うのが良いだろう。一方で、架橋-脱水操作では破壊あるいは脱落した構造が、CEMOVIS では観察されることもある。よって筆者らは、CEMOVIS は常に従来法と併せて相補的に情報を補間しながら使用するのが、現在は最良であると考えている。

6. おわりに

筆者らは分子分解能観察を目指して CEMOVIS を導入し、立ち上げた。X線結晶構造解析や NMR による非常な勢いで蛋白質構造解析であるが、その情報の蓄積とともに細胞や組織においてその単離精製された構造情報が如何に使われているかに研究の焦点が移ってきた。このような中で電子顕微鏡は要求に応えるポテンシャルをもっており、実際、デスマソームの構造のようにある程度の成果を収めつつある。しかし、日本はこの分野では欧米に 20 年とも遅れられる程大幅に遅れていた。我々は、まず「追いつけ」から始めて追いついたと自負している。これからは、追い抜かさなければならぬ。

謝 辞

本技術の導入は、独立行政法人科学技術振興機構 (JST) の行う戦略的創造推進事業 (CREST) の支援のもと、岡田 (岸本) 愛子特任研究員とライカマイクロシステムズ (株) の協力により始められました。また、加圧凍結装置、クライオミクロトームは文部科学省・特定領域「細胞の運命と挙動を支配する細胞外環境のダイナミズム」の協力を頂きました。CEMOVIS 観察では、京都大学大学院理学研究科・藤吉好則研究室の JEM-Z2100FC を使用させて頂くに当たり、藤吉好則教授、日本電子株式会社小林一美氏には大変御世話になりました。また、同様に JEM-3200FSC/BU を使わせて頂くに当たり、大阪大学大学院生命機能研究科難波啓一教授、加藤貴之助教には大変御世話になりました。

文 献

- 1) Al-Amoudi, A. *et al.*: *EMBO J.*, **23**, 3583–3588 (2004)
- 2) Marko, M., Hsieh, C., Moberlychan, W., Mannella, C.A. and Frank, J.: *J. Microsc.*, **222**, 42–47 (2006)
- 3) Frank, J.: *Electron tomography: methods for three-dimensional visualization of structures in the cell*, xiv, Springer, New York; London, 455 (2006)
- 4) Cavalier, A., Spohner, D. and Humbel, B.M. (eds.): *Handbook of Cryo-Preparation Methods for Electron Microscopy*, CRC Press (2009)
- 5) Dubochet, J., Al-Amoudi, A., Bouchet-Marquis, C., Eltsov, M. and Zuber, B.: in Cavalier, A., Spohner, D. and Humbel, B.M. (Eds.), *Handbook of Cryo-Preparation Methods for Electron Microscopy*, CRC Press, 259–289 (2008)

- 6) Studer, D., Michel, M., Wohlwend, M., Hunziker, E.B. and Buschmann, M.D.: *J. Microsc.*, **179**, 321–332 (1995)
- 7) 澤口 朗, 豊島典世 : 顕微鏡, **45**, 130–132 (2010)
- 8) Pierson, J. *et al.*: *J. Struct Biol.*, **169**, 219–225 (2010)
- 9) Zierold, K.: *Ultramicroscopy*, **14**, 201–210 (1984)
- 10) Shi, S., Sun, S., Andrews, S.B. and Leapman, R.D.: *Microsc. Res. Tech.*, **33**, 241–250 (1996)
- 11) Richter, K.: *Ultramicroscopy*, **53**, 237–249 (1994)
- 12) Matias, V.R., Al-Amoudi, A., Dubochet, J. and Beveridge, T.J.: *J. Bacteriol.*, **185**, 6112–6118 (2003)
- 13) Luther, P.K.: in Frank, J. (Ed.), *Electron Tomography: methods for three-dimensional visualization of structures in the cells*, Springer (2006)
- 14) Rigort, A. *et al.*: *J. Struct Biol.*, **172**, 169–179
- 15) Zhang, P. *et al.*: *J. Microsc.*, **216**, 76–83 (2004)
- 16) Al-Amoudi, A., Studer, D. and Dubochet, J.: *J. Struct Biol.*, **150**, 109–121 (2005)
- 17) Pierson, J., Ziese, U., Sani, M. and Peters, P.J.: *J. Struct Biol.*, **173**, 345–349 (2011)
- 18) Al-Amoudi, A., Diez, D.C., Betts, M.J. and Frangakis, A.S.: *Nature*, **450**, 832–837 (2007)
- 19) Walz, J. *et al.*: *J. Struct Biol.*, **120**, 387–395 (1997)
- 20) Zanetti, G., Riches, J.D., Fuller, S.D. and Briggs, J.A.: *J. Struct Biol.*, **168**, 305–312 (2009)
- 21) He, W., Cowin, P. and Stokes, D.L.: *Science*, **302**, 109–113 (2003)