

ボルタ位相差クライオ透過電子顕微鏡

Volta Phase Contrast Cryo-Transmission Electron Microscopy

福田 善之, Radostin Danev, Wolfgang Baumeister
Yoshiyuki Fukuda, Radostin Danev and Wolfgang Baumeister

Department of Molecular Structural Biology, Max Planck Institute of Biochemistry

要旨 クライオ透過電子顕微鏡法は、従来の重金属を用いた染色試料の観察に比べ、試料を無染色のまま生理的な条件で凍結するので試料本来の電子密度の観察が可能である。しかしながら、これまでのクライオ透過電子顕微鏡による観察像のコントラストは低いという問題がある。この問題の解決の為、ゼルニケ位相差法が開発され、コントラストを改善することができたが、一方でフリッジの発生などが欠点として指摘されている。近年、透過電子顕微鏡用の新たな位相差法として、ボルタ位相差法が開発された。ゼルニケ位相差法とは異なり、ボルタ位相差法は観察像においてコントラストの改善に伴うフリッジが発生しない。本稿では、このボルタ位相差法について概説する。

キーワード：ボルタ位相板、位相差コントラスト、クライオ透過電子顕微鏡、電子線クライオトモグラフィー

1. はじめに

位相差法とは、無染色の生物試料の観察に有効な方法で、光学顕微鏡では培養細胞などの観察において一般的に用いられている方法である。しかしながら、透過電子顕微鏡においては、ゼルニケ位相差法が2001年にダネブと永山により報告されるまで長らく実現されなかった¹⁾。近年、透過電子顕微鏡用の新しい位相差法として、ボルタ位相差法が開発された²⁾。本稿では、クライオ透過電子顕微鏡観察における位相差観察法の有効性、ゼルニケ位相差法、及びボルタ位相差法について紹介したい。

2. 位相差法の理論的背景

これまでに、透過電子顕微鏡は、細胞・組織の超微細形態の観察や、タンパク質分子の構造解析に貢献してきた。この透過電子顕微鏡観察においては、試料を真空中に置く必要がある、電子線が試料を透過できるほど十分に薄い、コントラストを高くするために重金属を用いた染色をする必要、などのいくつかの条件があった。そのため、細胞や組織の形態解析には、試料を樹脂に包埋してから、50–100 nm程度の厚さの超薄切片を作製し、酢酸ウラニルや鉛などで電子染色を行ったものを観察試料として用いる。一方で、タンパク質分子の観察には、精製したタンパク質を酢酸ウラニルなどの重金属でネガティブ染色したものを試料として用いる。しかしながら、これらの試料調整過程において、固定や染色によるアーティ

ファクトが生じてしまう可能性が問題として指摘されていた。

生理的条件により近い状態における生物試料の電子顕微鏡観察法として、クライオ透過電子顕微鏡法がある³⁾。この方法では、生物試料を急速に凍結することで、生物試料に含まれる水分子を非晶質（ガラス状）の氷として凍結したものを観察試料とする。そのため、従来の樹脂包埋試料やネガティブ染色法を行った生物試料とは異なり、試料が水和した状態にあるため、試料をより生理的条件に近い状態に保ちつつ、試料本来の電子密度に基づいた構造を解析できるという利点がある。しかしながら、生物試料を構成する主な元素は電子線を弱くしか吸収・散乱しないこと、そして、急速凍結生物試料においては、電子線照射による試料の損傷を避けるため、照射電子線量が限られてしまうという、二つの大きな理由により、クライオ透過電子顕微鏡では観察像のコントラストが制限されている。

急速凍結生物試料は、電子線を弱くしか吸収・散乱しないため、電子線に対する弱位相物体とみなすことができる。したがって、通常法（Conventional Transmission Electron Microscopy: CTEM）による弱位相物体の透過電子顕微鏡観察において、コントラスト伝達関数（Contrast Transfer Function: CTF） $G_c(k)$ は、以下の式で表すことができる。

$$G_c(k) = \sin(\gamma(k)), \quad (1)$$

この式において、 k は空間周波数を表す。このCTFにおける位相のずれ $\gamma(k)$ はデフォーカス量と対物レンズの球面収差によって決まり、以下の式で表すことができる。

$$\gamma(k) = 2\pi \left(-\frac{1}{2} \Delta z \lambda k^2 + \frac{1}{4} C_s \lambda^3 k^4 \right), \quad (2)$$

Am Klopferspitze 18, 82152 Martinsried, Germany
TEL: +49 (89) 8578-2034; FAX: +49 (89) 8578-2641
E-mail: fukuda@biochem.mpg.de
2015年12月27日受付

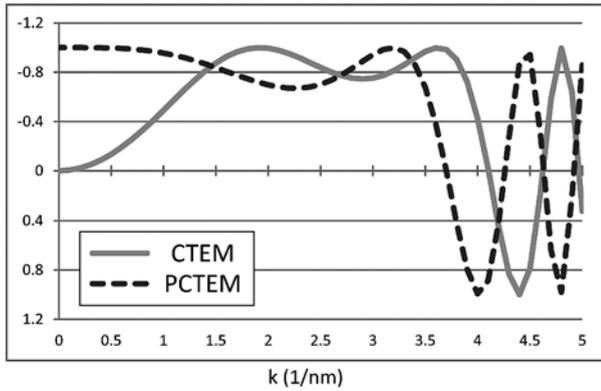


図1 通常法と位相差法におけるコントラスト伝達関数の比較
 実線：通常法 (CTEM) のコントラスト伝達関数. サイン関数であるため, 低周波数成分のコントラストを得ることが難しい.
 点線：位相差法 (PCTEM) のコントラスト伝達関数. 位相板による波長の遅れにより, コントラスト伝達関数はコサイン関数となる. そのため, 低周波数成分のコントラストを得ることが可能である.

この式において, Δz はデフォーカス量, λ は電子線の波長, C_s は対物レンズの球面収差係数である. CTEM による観察では, 低周波数成分のコントラストを得ることが難しい (図1, 実線). そのため, CTEM における観察像のコントラスト改善方法として, デフォーカスコントラスト法が用いられている. これは, 焦点をアンダーフォーカス側にずらすことにより, CTF を変調させて低周波数成分のコントラストを強める方法である.

一方, 位相差法では, 位相を $1/4$ 波長遅らせる位相板 ($\varphi = -\pi/2$) を用いる. そのため, 位相差法における CTF は以下のようになる.

$$G_p(k) = \sin(\gamma(k) + (-\pi/2)) = -\cos(\gamma(k)), \quad (3)$$

位相板を用いることにより, CTEM ではサイン関数であった CTF がコサイン関数となる. そのため, 位相差法を用いることにより, 正焦点の観察像において低周波数成分のコントラストを回復することが可能となる (図1, 点線).

3. ゼルニケ位相差法

ボルタ位相差法とゼルニケ位相差法の違いをわかりやすくするために, 改めて, ゼルニケ位相差法について解説したい. これまでに, ゼルニケ位相差法は, ウイルス, 細胞や組織切片といった様々な生物試料の観察に用いられてきた^{4,5)}. そして, 試料の三次元構造解析を行うために, 単粒子解析法^{6,7)} 及び電子線トモグラフィ法⁸⁻¹⁰⁾ にも用いられてきた.

通常の透過電子顕微鏡観察では, 後焦点面に対物絞りを挿入することで, 観察像のコントラストを改善する (図2a). ゼルニケ位相差法では, ゼルニケ型位相板を後焦点面に挿入する (図2b). このゼルニケ型位相板は, 透過した電子の位相を $1/4$ 波長遅らせる厚さの炭素薄膜からなり, 位相を変化させずに透過電子を通過させるための穴を中心を持つ. この

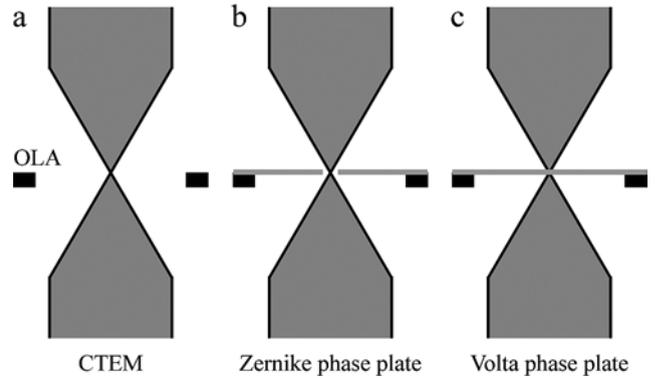


図2 各方法における後焦点面の模式図

(a) 通常法における後焦点面. 対物絞りが位置している. (b) ゼルニケ位相差法における後焦点面. 透過電子はゼルニケ位相板の中心孔を通り, 散乱電子はゼルニケ位相板を通過する. (c) ボルタ位相差法における後焦点面. 透過電子は電子線の照射により形成されたビームスポットを通過する. 散乱電子はビームスポット外のボルタ位相板を通過する. OLA: 対物絞り.

ため, 後焦点面において集束した透過電子は, 中心孔を通過するため位相のずれを受けない. 一方で, 急速凍結生物試料を電子線が透過した際に生じる弾性散乱電子は, 透過電子と比べて波長は変化しないが, 位相が $1/4$ 波長遅れている. そして, 弾性散乱電子は, 後焦点面で集束せず位相板を通過することで, さらに $1/4$ 波長の位相の遅れを受ける. その結果, 結像面において, 透過電子と位相板上を通過した弾性散乱電子が干渉することにより, コントラストが生じる.

ゼルニケ位相差法における, 位相差コントラストが始まる空間周波数 k_h は, 以下の式で示される.

$$k_h = \frac{r_h}{f * \lambda}, \quad (4)$$

この式において, r_h はゼルニケ位相板の中心孔の半径を, f は対物レンズの焦点距離を示している. そのため, ゼルニケ位相差法における CTF, 上記の式 (3) は, 以下のようになる.

$$G_p(k) = \sin(\gamma(k) + (-\pi/2)) = \begin{cases} \sin(\gamma(k)), & k < k_h, \\ -\cos(\gamma(k)), & k \geq k_h, \end{cases} \quad (5)$$

上記の式に示されているように, ゼルニケ位相差法における CTF では, k_h において, CTF がサイン関数からコサイン関数に変化する. この変化は不連続であり, その不連続性により, k_h に対応した周期のフリッジが観察像, 特にコントラストの強い構造 (細胞膜など) の周囲に発生する. このフリッジにより構造が隠れてしまうこともあるため, 観察像を解釈する上での問題として指摘されている.

また, 式 (4) から推察されるように, 大きな構造の観察の為には小さな径の中心孔が必要となる問題もある. 培養細胞や組織切片などの比較的大きな構造を観察するには低周波数成分のコントラストを回復する必要があるが, この為には小

さな中心孔が必要である。しかしながら、実際のゼルニケ位相差法観察において、ゼルニケ型位相板の中心孔が小さくなればなるほど、その位置を精度良く透過電子の焦点位置に合わせる事が飛躍的に難しくなる。これは、ゼルニケ位相差法の実際の観察における主な難点の一つである。さらに凍結試料は、非伝導性であるため、電子線照射により試料が帯電する。ゼルニケ位相板は、炭素薄膜から構成されているため、位相板自体は導電性だが、位相板作製過程や観察中に生じるコンタミにより帯電してしまうことがある。その結果、後焦点面での焦点位置がずれてしまったり、集束した透過電子がドリフトしてしまうことがある。

ゼルニケ位相板のもう一つの主な難点は、ゼルニケ型位相板の使用期間である。位相板上のコンタミによる位相板の帯電を防ぐために、ゼルニケ型位相板は常に $\sim 200^{\circ}\text{C}$ に加熱して使用している。しかしながら、ゼルニケ型位相板の性能を維持するためには、大体1週間ぐらいで位相板を交換する必要がある。

4. ボルタ位相差法

以上の様なゼルニケ位相差法の問題を解決するために、近年ボルタ位相差法が開発された。このボルタ位相差法では、ゼルニケ位相差法と同様に後焦点面に位相板を挿入する(図2c)。ボルタ型位相板は、ゼルニケ型位相板と同様に、通過した電子線の位相を $1/4$ 波長遅らせる厚さの炭素薄膜だが、中心孔を持たない。したがって、そのままでは、透過電子、弾性散乱電子ともに $1/4$ 波長の位相のずれを受けるため、位相の差を生じることができない。ボルタ位相差法では、加熱している位相板への電子線照射により形成されるビームスポットを用いて、透過電子と弾性散乱電子に位相の差を作り出す。

通常、電子線で不導体を照射すると、表面が正に帯電し、その結果、そこを通過する電子線の位相の遅れをもたらす。

しかしながら、加熱した炭素薄膜に電子線を照射することで、負に帯電することが確認された。この電子線照射による位相のずれには、位相板の加熱温度が影響しており、加熱温度が上昇するほど、位相のずれは小さくなる。そして、電子線照射により生じる位相のずれの量には、照射電子線量率ではなく、照射電子線総量が関係している。この電子線照射により形成される負に帯電したビームスポットの形成は可逆的であり、電子線照射停止後、時間経過により消滅する。このビームスポットの消滅に掛かる時間は、位相板の加熱温度ではなく、カラム内のガス濃度に関係している。そのため、この負の帯電は、電子線照射による位相板表面の化学的性質の変化によるものではないかと考えられている。

この電子線照射に伴う位相のずれの量は、照射電子線量で調節可能である。そのため、位相のずれの量を大体 $1/4$ 波長にすれば、原理的には位相板として使用することが可能である。実際の観察として、電子線照射により形成されたビームスポットを用いて炭素薄膜試料の観察像を撮影後、その画像のフーリエ変換像(Fast Fourier Transform: FFT)を取得して、通常法で撮影した炭素薄膜像のFFTと比較してみたところ、電子線照射により形成されたビームスポットによる位相のずれが $\pi/2$ に近いことが示され、得られたCTFに歪みなどは見られなかった。その結果、加熱した炭素薄膜への電子線照射により形成されたビームスポットを位相板として使用できることが示された。

ボルタ位相差法において、この負に帯電しているビームスポットの形成が肝要である。ボルタ型位相板もゼルニケ型位相板同様に観察時におけるコンタミを防ぐために $\sim 200^{\circ}\text{C}$ に加熱して使用している。位相板の加熱を行わない場合、電子線照射により形成されるビームスポットは正に帯電してしまい、正しい位相コントラストを得ることができない。

ボルタ位相差法の主要な利点の一つとして、観察像において、フリッジを発生しないという点がある。その理由として、

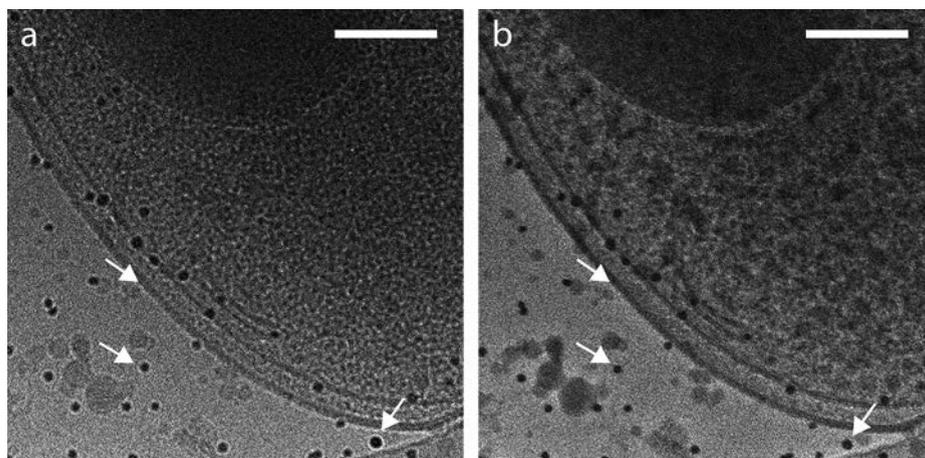


図3 通常法とボルタ位相差法の投影像の比較
急速凍結磁走性細菌の投影像。(a) 通常法, $-8\ \mu\text{m}$ デフォーカス。(b) ボルタ位相差法, $-1\ \mu\text{m}$ デフォーカス。矢印はフリッジを指している。スケールバー: $100\ \text{nm}$ 。

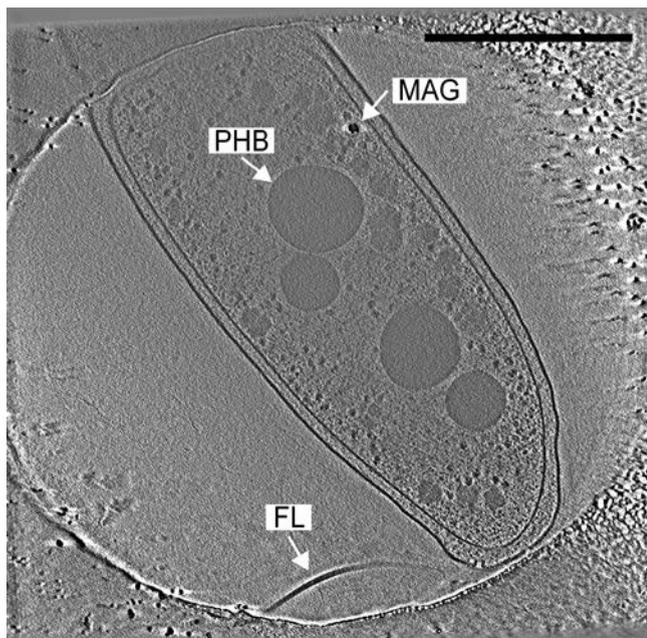


図4 急速凍結磁走性細菌のボルタ位相差電子線クライオトモグラフィ
立体再構築像より取り出した 8.4 nm のスライス像。MAG：マグネトソーム，PHB：ポリヒドロキシ酪酸顆粒，FL：鞭毛。スケールバー：500 nm。

形成されるビームスポットのサイズが非常に小さいことが考えられる。急速凍結した磁走性細菌のCTEMとボルタ位相差法により撮影した観察像を図3に示す。CTEMにおける観察像ではデフォーカスにより形成されたフレネルフリッジが金粒子や細胞膜近傍に生じているが、ボルタ位相差法における観察像では見られない(図3, 矢印)。そして、もう一つの主要な利点は、使用期間の長さである。ボルタ型位相板は、6ヶ月程度安定して使用することができる。一方で、ボルタ位相差法の欠点としては、透過電子も位相板上を通過するため、10%程度の電子のロスがある。

ボルタ位相差法を用いた三次元構造解析の応用例の一つとして、ボルタ位相差電子線クライオトモグラフィがある¹¹⁾。図4に急速凍結した磁走性細菌の立体再構築像から抽出したスライス像を示す。このスライス像において、細胞膜と細胞外膜の膜構造及びリボソームなどのタンパク質が示されている。そして、ポリヒドロキシ酪酸顆粒や鞭毛、マグネトソームといった特徴的な構造も示されている。

透過電子顕微鏡観察では、観察試料の厚さが制限されているため、急速凍結もしくは高圧凍結を行った細胞、組織の深部構造を観察するためには、凍結試料の切削を行わなければならない。図5に急速凍結したラット海馬由来初代培養神経細胞をフォーカスイオンビーム(Focused Ion Beam: FIB)で楔形に加工した試料の立体再構築像より抽出したスライス像を示す。このスライス像では、左側の構造は明瞭に観察されているが、右側の構造はそれほどはっきりしていない。これは、このスライス像における右側から左側に向かって集束

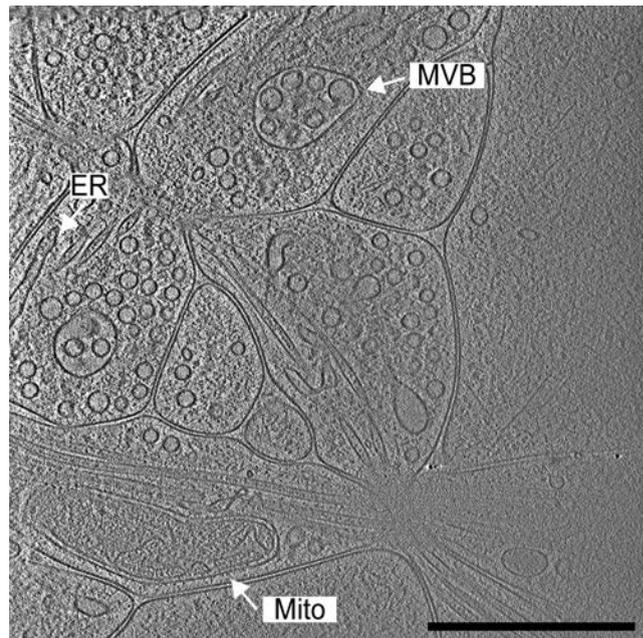


図5 集束イオンビームで切削した初代培養神経細胞のボルタ位相差電子線クライオトモグラフィ
立体再構築像より取り出した 8.4 nm のスライス像。MVB：マルチベシキュラーボディ(多小胞体)，ER：小胞体，Mito：ミトコンドリア。スケールバー：500 nm。

イオンビームを照射したため、観察像の左右に対応する試料の厚さが異なることに由来する。このスライス像では、滑面小胞体や多小胞体、ミトコンドリアが示されている。また、神経細胞由来の突起に沿って微小管が見られる。このように、ボルタ位相差法は、FIBで微細加工した凍結試料の観察にも用いることが可能である。

5. おわりに

近年、クライオ透過電子顕微鏡法に関連する技術、手法の開発及び発展が目覚ましい。観察像のコントラスト改善法としては、本稿で取り扱ったボルタ位相差法及び電子を直接検出するカメラがある。この電子を直接検出するカメラを用いることで、従来のCCDカメラに比べて観察像のS/N比が改善される。そして、空間分解能を改善する方法として、モーションコレクション法¹²⁾が報告されている。クライオ透過電子顕微鏡の観察では、撮影時における電子線照射に伴う試料の移動により、観察像がぼやけてしまうという問題がある。このモーションコレクション法は、画像取得の際に総露光時間を均等に分割して、同一視野の重ね合わせ像を取得する。そして、それぞれの画像の位置合わせを行うことで、電子線照射により生じる試料の移動などに由来するブレを補正することができる。その結果、観察像の空間分解能を改善することができる。

これらの新規技術の組み合わせにより、これまで困難であった、細胞内におけるタンパク質複合体の「その場」での構造解析が可能となった¹³⁾。これは、従来のタンパク質の局在解

析において用いられてきた、色素や金コロイドなどにより標識された対象の間接的な解析ではなく、目的の分子の局在を直接可視化することが可能である。そして、生化学的な試料精製法においてその精製が困難であった動的なタンパク質複合体、もしくは壊れやすいタンパク質複合体などを「その場」で解析することが可能になると期待される。

本稿では、新しく開発されたボルタ位相差法に焦点を当てて解説した。しかしながら、これまでに様々な位相板が透過電子顕微鏡用に開発されている^{14,15)}、興味のある方はこれらの総説にあたっていただきたい。

文 献

- 1) Danev, R. and Nagayama, K.: *Ultramicroscopy*, **88**, 243–252 (2001)
- 2) Danev, R., Buijsse, B., Khoshouei, M., Plitzko, J.M. and Baumeister, W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 15635–15640 (2014)
- 3) Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J.J., Homo, J.C., Lepault, J., McDowell, A.W. and Schultz, P.: *Q. Rev. Biophys.*, **21**, 129–228 (1988)
- 4) Yamaguchi, M., Danev, R., Nishiyama, K., Sugawara, K. and Nagayama, K.: *J. Struct. Biol.*, **162**, 271–276 (2008)
- 5) Fukuda, Y., Fukazawa, Y., Danev, R., Shigemoto, R. and Nagayama, K.: *J. Struct. Biol.*, **168**, 476–484 (2009)
- 6) Danev, R. and Nagayama, K.: *J. Struct. Biol.*, **161**, 211–218 (2008)
- 7) Murata, K., Liu, X., Danev, R., Jakana, J., Schmid, M.F., King, J., Nagayama, K. and Chiu, W.: *Structure*, **18**, 903–912 (2010)
- 8) Danev, R., Kanamaru, S., Marko, M. and Nagayama, K.: *J. Struct. Biol.*, **171**, 174–181 (2010)
- 9) Fukuda, Y. and Nagayama, K.: *J. Struct. Biol.*, **177**, 484–489 (2012)
- 10) Dai, W., Fu, C., Raytcheva, D., Flanagan, J., Khant, H.A., Liu, X., Rochat, R.H., Haase-Pettingell, C., Piret, J., Ludtke, S.J., Nagayama, K., Schmid, M.F., King, J.A. and Chiu, W.: *Nature*, **502**, 707–710 (2013)
- 11) Fukuda, Y., Laugks, U., Lučić, V., Baumeister, W. and Danev, R.: *J. Struct. Biol.*, **190**, 143–154 (2015)
- 12) Li, X., Mooney, P., Zheng, S., Booth, C.R., Braunfeld, M.B., Gubbens, S., Agard, D.A. and Cheng, Y.: *Nat. Methods*, **10**, 584–590 (2013)
- 13) Asano, S., Fukuda, Y., Beck, F., Aufderheide, A., Förster, F., Danev, R. and Baumeister, W.: *Science*, **347**, 439–442 (2015)
- 14) Danev, R. and Nagayama, K.: *Methods Enzymol.*, **481**, 343–369 (2010)
- 15) Glaeser, R.M.: *Rev. Sci. Instrum.*, **84**, 111101 (2013)