

STEMを用いた厚切り生体組織の電子線トモグラフィ観察による 空間分解能の向上

Dark Field Scanning Transmission Electron Microscopy Imaging Improves Resolution in Tomography of Biological Specimens

太田 啓介^a・東 龍平^b・中村桂一郎^a

Keisuke Ohta, Ryuhei Higashi and Kei-ichiro Nakamura

^a久留米大学医学部解剖学講座顕微解剖・生体形成部門

^b久留米大学医学部電子顕微鏡室

要旨 電子線トモグラフィ法 (ET法) の理論的な空間分解能は切片の厚さに比例する。しかし実際には色収差や S/N 比の低下などにより、特に試料の辺縁部では理論値通りの分解能が得られない事が多い。走査透過電子顕微鏡 (STEM) は ET 法で問題となる画像取得時の色収差や高傾斜撮影時のフォーカスずれの問題が無いこと、また、高いコントラストが得られることから、理論的分解能に近い三次元再構築像が得られる可能性がある。今回われわれは STEM 暗視野モードでラット小腸上皮厚切り切片の連続傾斜像を取得し立体再構築を行った。その結果、再構築像辺縁部においても組織内スケールとしての被覆陥凹のクラスリン格子構造や、アクチン束の六方格子配列を確認することが出来た。今回観察した試料の厚さ (200 ~ 400 nm) から予測される理論的分解能はおおよそ 10 nm であり、ET 法に STEM を用いることで視野全体にわたり理論的分解能に近い再構築像が得られることが明らかとなった。

キーワード：和文：電子線トモグラフィ、STEM、分解能、生物試料、樹脂包埋切片

1. はじめに

電子線トモグラフィ法 (ET法) は、電子顕微鏡試料の内部構造を数 nm の空間分解能で三次元的に解析する唯一の技術である (図 1)。平均的なタンパク質の大きさは直径数 nm であるので、この技術を生体試料に応用すれば、分解能の観点からは細胞や組織の構造を分子レベルで解析できる可能性がある。

これまで、タンパク質など生体高分子の構造は単離された試料の X 線結晶解析、単粒子解析、NMR 等の解析により得られてきた。今日、これら個々の要素が生体内でどの様に配置し機能しているのかを可視化することが、生化学的な解析とともに重要であると考えられるようになった¹⁾。一方、細胞の超微形態は細胞学・組織学的立場から通常の電子顕微鏡的観察により詳細に調べられてきた。しかし、一般的な試料である超薄切片の厚さは数十 nm であり、特殊な状況を除きタンパク分子そのものがどのように組み上がって我々が知る電顕像が作り出されているかは未知である。われわれは、このギャップをつなぐこと、すなわち、分子レベルで組織・細胞構築を理解する「分子組織形態学」的な取り組みが必要だと

考えており、ET 法が果たす役割が重要であると捉えている。

本稿では、生体観察を目指した ET 法の近年の動向について解説した後、データ取得に走査透過電子顕微鏡 (STEM) を用いることの意義とメリットについて、われわれの最近の取り組みを交えて解説を試みる。

2. 電子線トモグラフィ法を用いた構造解析の現状

ET 法自体の歴史は古く、1974 年には脂肪酸合成酵素の連続傾斜像からその分子構造の解析が行なわれている²⁾。近年の電顕のデジタル化と画像処理の高速化によって、汎用的な透過型電子顕微鏡 (TEM) でもオプションとして利用できるようになり、本誌 2004 年にも特集が組まれた³⁾。現在、生体試料観察のためには、樹脂包埋切片を用いる ET 法と凍結切片を用いる ET 法とがある。

樹脂包埋切片を用いる場合、微細な構造を観察する目的が多い ET 法では、より生体に近い構造が保持される急速凍結技法により作製された試料が用いられることが多く、これまでにゴルジ装置の膜構築⁴⁾ やタンパク分子レベルでのデスモゾームの構造解析⁵⁾ など主にオルガネラの立体構造の解析に用いられてきた。しかし、試料には樹脂包埋による変形が生じること、また得られる観察像も重金属染色による散乱コントラストに起因するものであることからタンパク質そのものを見ているわけではない。そのため、そこに映し出される像をもってタンパク質そのものの構造に言及する場合は慎重を

^a 〒 830-0011 福岡県久留米市旭町 67
TEL: 0942-31-7541; FAX: 0942-31-7555
E-mail: kohta@med.kurume-u.ac.jp
2009 年 8 月 27 日受付

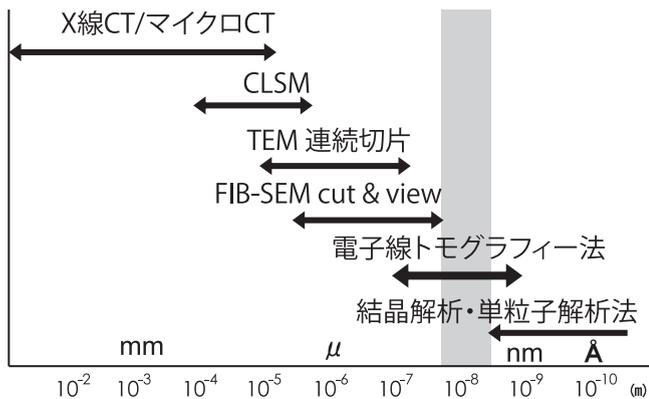


図1 三次元再構築技術の適応範囲

要する。

このような背景から生体内のタンパク質複合体の構造を直接解析する方法として、凍結切片を低温電顕で観察する cryo-electron tomography 法 (Cryo-ET 法) が注目されている。これはガラス化した氷に包埋されたサンプルから凍結超薄切片を作製し、そのまま観察する cryo-electron microscopy of vitreous section (CEMOVIS) と呼ばれる方法で傾斜撮影・再構築を行う技術であり、生体を構成する分子そのものの三次元構造を直接取得できる点で極めて重要である。しかし、試料を連続傾斜させて様々な角度からの像を多数取得することで分解能を向上させる ET 法にとって、凍結超薄切片は電子線に対して弱く (許容電子線量 1,000 ~ 4,000 e⁻/nm) 撮影枚数を多くするのは困難であること、シグナル/ノイズ比 (S/N 比) が低いことなどから分解能をあげることは困難であった。近年になり鏡体から画像処理技術にいたる多くの改良により、ついに数 nm の分解能を獲得しこの方法で細胞組織内でタンパク質自身を同定することが可能になってきた⁶⁻⁸⁾ もの、この技術で組織像全体を高い分解能で把握するのは未だ困難な作業である。

氷包埋試料による ET 法はより詳細で正確な情報を得るのに利点があり、例えばマルチズームと呼ばれるような生体内でタンパク質が会合した機能構造を解析する場合には Cryo-ET 法が必須である。一方、細胞の広範な構造を全体的に理解していく上では比較的厚い試料を容易に扱える樹脂包埋試料を用いた ET 法が有効である。そのため両者の技術の利点をよく理解し組み合わせることで、生体構造を分子レベルで解析していくことができると考えている。

3. 構造解析に求められる試料の大きさ (厚さ)

目的にもよるが、細胞や生体組織の観察では、注目する構造と周囲の構造の関係をj知る上で、出来るだけ厚い試料を観察したい。実際、超高压顕微鏡を用いた ET 法では数ミクロンの厚い試料の観察により樹状突起のスパイン等の構造⁹⁾ やミトコンドリア全体の構造解析が行われている。ところが、このように厚い試料では、個々のタンパク質分子を捉らえるほどの分解能を得ることはできない。つまり細胞内のタンパ

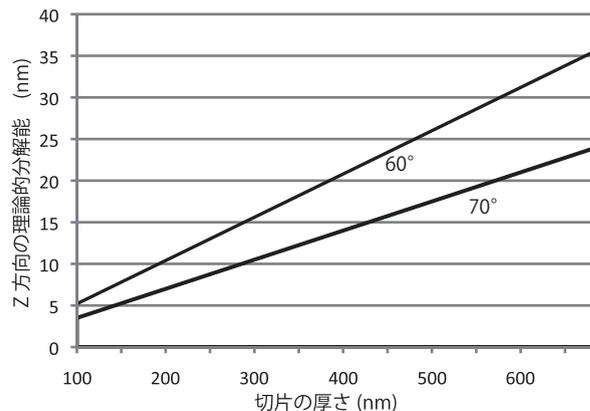


図2 トモグラフィーにおける理論的分解能
電子線トモグラフィーの場合はデータを取得できない missing wedge が存在するため、データ取得範囲 ±60°, ±70° のものを示す。

ク質粒子の配置を観察出来るような分解能を得るには、必然的に観察試料の大きさ (厚さ) に制約が生じる。

トモグラフィー解析の空間分解能は、試料が円柱状であると仮定した場合、

$$d = \frac{\pi D}{N}$$

の関係が成り立つ¹⁰⁾。d は分解能、N は傾斜撮影の撮影枚数、D が試料の直径、すなわち厚さである。この式は、試料が大き (厚く) なるほど分解能が低下するが、傾斜撮影をできるだけ細かく行うことで分解能が上がる事を示している。つまり ET 法において厚い試料を高い分解能で再構築しようとする場合、できるだけ多数の傾斜像を得るに耐えうる電子線に対して強い試料が望まれる。

また、切片を用いた ET 法の場合、傾斜撮影できない角度、すなわち missing wedge が存在するため、±60° の撮影を行った場合、X、Y 軸に対して Z 軸の分解能はおよそ半分以下になる。図2は ±60° および ±70° の間を 1° 間隔で傾斜撮影を行った場合に得られる理論的分解能と切片の厚さの関係を示している。タンパク質レベルでの解析に必要な Z 方向の分解能は 5 ~ 10 nm の分解能が必要である。すると、このグラフからそのような目的には、切片の厚さは理論上 200 ~ 300 nm 程度が限界であることが分かる。理想的な観察のためには、この範囲の厚さの試料を最適な観察条件で撮影することが重要になる。

4. ET 法において高い分解能を得るために一 STEM の利点

ET 法で得られる最終的な分解能は、多くの要因に影響されるため、容易に求められるものではない¹¹⁾。目的の分解能を得るには、前述のように適切な試料の大きさと、出来るだけ多くの方向から撮影された投射像が必要となる。これらの基本的要素に加え、再構築には、S/N 比が重要な因子となる。そのため、試料のコントラスト比、色収差、傾斜時のフォーカス変動などが再構築像の質に影響する。ここに STEM を用いる利点がある。STEM では暗視野像観察により TEM に

比べて容易に高いコントラスト像を得る事ができる。色収差の問題は切片が厚くなるほど大きくなり S/N 比は低下する。色収差の影響を取り除く方法として、EELS によるゼロロス像を用いるという方法が最も一般的であるが、STEM 像の場合、原理的に色収差がなく厚切り切片の電子線トモグラフィには有利である。さらに、傾斜撮影時のフォーカスズレ (図 3) は再構築像辺縁部の分解能低下の一因と考えられるが、この問題も STEM では操作時にフォーカス点をずらしながら撮影するダイナミックフォーカス法で取り除くことができる。これらのことから、STEM を用いた ET 法により理論値に近い分解能が得られる可能性が指摘されている¹²⁾。STEM トモグラフィの理論的背景については、本特集の青山氏の稿をご覧ください。

5. 実施例 (小腸吸収上皮における解析例)

現在われわれは、分子基盤がよく研究されているにもかかわらず、生体内での構造に不明な点が多いアクチン細胞骨格を中心に解析を行っている。アクチン細胞骨格は、直径 6 nm のアクチンフィラメントがさまざまな結合タンパク質により連結され、網目状や束状などさまざまな構造をとり、真核生物の運動能や力学的強度を与える重要な構造である。アクチンフィラメントのサイズから判断すると、これらの構造を理解するためには Z 方向の分解能が、少なくとも 10 nm 以下である必要がある。これまでにわれわれは通常の TEM を用いて厚さ 50 nm の超薄切片のトモグラム撮影を行うことで、一本一本のアクチンフィラメントを分別できる高い分解能が得られることを確かめている¹³⁾。今回、これよりも厚い 200 ~ 400 nm 厚の試料を STEM を用いて像を取得することにより、どの程度の分解能が得られるのかを検討した。

正常ラット小腸を麻酔下に取り出し、通常の化学固定したもの、および直ちに高压急速凍結後 (BalTec HPM 010) 凍結置換を行ったものの 2 種をエポキシ樹脂に包埋し観察試料とした。薄切後、ウラン・鉛の二重染色を施し、両面をカーボンコーティングし、さらに 5 nm コロイド金を表面に標識した切片を傾斜撮影に用いた。STEM 撮影には 200 ~ 400 nm 厚の試料を TecnaiG2F30 (日本 FEI) にて加速電圧 300 kV で観察した。一方、通常の透過電顕撮影には 50 ~ 100 nm 厚の試料を H-7650 (日立ハイテクノロジーズ) にて加速電圧 100 kV で観察した。傾斜撮影は分解能向上のため二軸傾斜法を用いた¹⁴⁾。すなわち、STEM 観察では Saxton 法により $\pm 70^\circ$ 0.7 ~ 0.5 nm/pixel での傾斜撮影 (115 枚) を行った後、試料を 90° 回転し、同じ条件で再度傾斜撮影を行った。傾斜データは IMOD¹⁴⁾ によりアライメントを行い、同アプリケーション上で Filtered Back Projection 法により再構築した。切片の正確な厚さはコロイド金を用いて計測した。

傾斜撮影時に問題となる高傾斜時のフォーカスのズレについて、小腸刷子縁の横断切片の傾斜像を STEM, TEM で撮影したもので比較して示す (図 3)。写真は STEM で撮影した約 200 nm 厚切片の 0° (図 3b)、および 65° 傾斜時の像 (図

3c) と、通常の TEM で撮影した 60 nm 厚切片の 65° 傾斜時の像 (図 3d) である。STEM 撮影時には、ダイナミックフォーカス機能を用いた。図 3c は高傾斜時の STEM 像である。この写真で試料表面に標識した金粒子 (図 3c 矢印) に注目すると、すべての面に焦点の合った像が得られている事が分かる。ただ、厚切り切片の高傾斜像では細胞内の構造が重なるため写真上は微絨毛の形態が分かりにくい像となっている点ご容赦願いたい。一方、通常の TEM 像では、傾斜軸から離れた画面両端でフォーカスが大ききずれ、画面左側を正焦点付近に合わせた場合、その反対側では大きく負焦点となっている事が分かる。また、試料傾斜時には電子線が切片を透過する距離は $1/\cos\theta$ で増加するため、試料が 65° 傾斜している時は 0° の時の約 2.4 倍となる。取得像に注目すると、STEM 像では、S/N 比が 0° の時に比べて小さくなってはいるもののシャープさは維持されている。これに対し通常

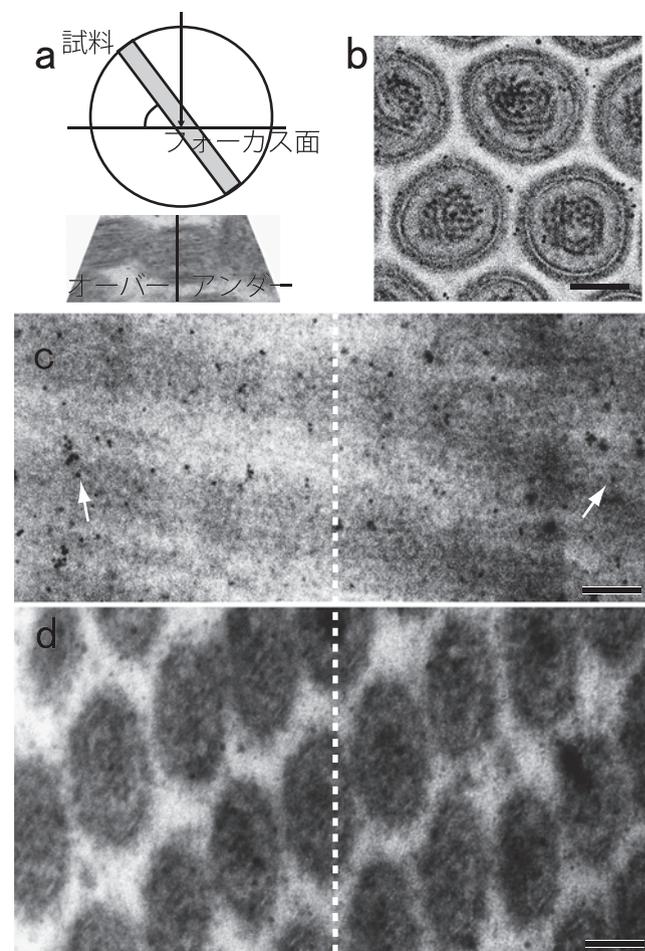


図 3 a. 切片の傾斜撮影時の模式図 b, c は 200 nm 厚の小腸微絨毛横断切片 STEM 像 (b は 0° , c は 65° 傾斜時) d は 60 nm 厚の小腸微絨毛横断切片 TEM 像 (65° 傾斜時) を示す。c, d 中央の白点線は試料の傾斜軸を示す。

傾斜像では画面の左右で試料面の高さが異なるが、ダイナミックフォーカスで得られた STEM 像傾斜像 (c) では金粒子のフォーカスが画面の左右で一致しているのが判る (矢印)。スケールバーは 100 nm。

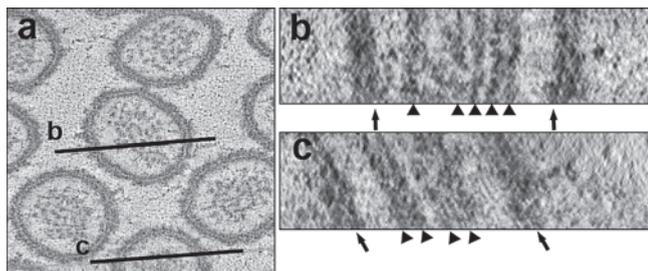


図4 小腸微絨毛横断切片, 通常 TEM 取得像からの再構築像. a. X-Y 断面; b, c. 写真 a 内に示した線 b, c で作成した X-Z 断面. 矢印は微絨毛質膜, 矢頭は中心部のパラレルアクチンバンドル内のアクチンフィラメントの位置を示す. 再構築像中央部(b)に比べると辺縁部(c)は画質が劣る.

TEM 像では, 色収差の影響が大きく, ボケが入った像なり, 表面に標識した金粒子の認識も困難である. これらの取得像の特徴は, 通常 TEM のトモグラフィーの場合, 視野中心部では比較的良好なデータが得られるものの, 周辺部ではその信頼性が低下することを意味している. 実際に, 通常 TEM 像から再構築したものから X-Z 断面を作成すると, 周辺部に比べ中心部の方が良好な結果が得られている (図 4). 切片の厚さ, 撮影時の加速電圧などが違うので直接比較は出来ないが, 取得像だけを考えれば STEM によるトモグラムは生物試料観察において有利であることが分かる.

生物分野での STEM の利用は試料ダメージが大きいことなどから, これまであまり用いられてこなかった. 実際, トモグラムを行った部分の試料は, 樹脂が大きく収縮している. われわれは金粒子を標準点とした計測により, 撮影後の樹脂が撮影前に比べ平均 62% に収縮することを確認した. もっとも, 電子線による樹脂の収縮については, 以前から知られている現象であり¹⁵⁾, 通常 TEM のトモグラム時に見られる収縮と差がないことを確認している.

暗視野 STEM トモグラフィー法により得られた再構築の結果を図 5, 6 に示す. 図 5 は吸収上皮細胞頂部に見られた被覆陥凹である. 切片の厚さは約 270 nm で, STEM 撮影後再構築したものである. ここに示したものは再構築像辺縁部の一部を切り出したものであるが, 膜に直交した断面では辺縁部においても形質膜の脂質二重膜構造が確認できる (図 5a). 図 5c は被覆陥凹表面に対し接線方向になるよう切り出した構築像の一断面である. この被覆陥凹表面像には, クラスリン被覆として知られるクラスリン分子が自己集合して形成される籠状の六角形格子構造に一致する構造が明瞭に描出されている (図 5c, d). このことは, この再構築像が切片辺縁部においてもタンパク質レベルの分解能を保持していること示している. 図 6 は約 400 nm 厚の小腸微絨毛縦断切片の再構築像である. 撮影時の樹脂の収縮により最終的な厚さは約 270 nm になっている. 微絨毛内部にはフィンブリンで架橋されたパラレルアクチンバンドルが存在する. バンドル内では直径 6 nm のアクチンフィラメントがおおよそ 12 nm の間隔で六角格子状に配列するので, 隣接するフィラメント間

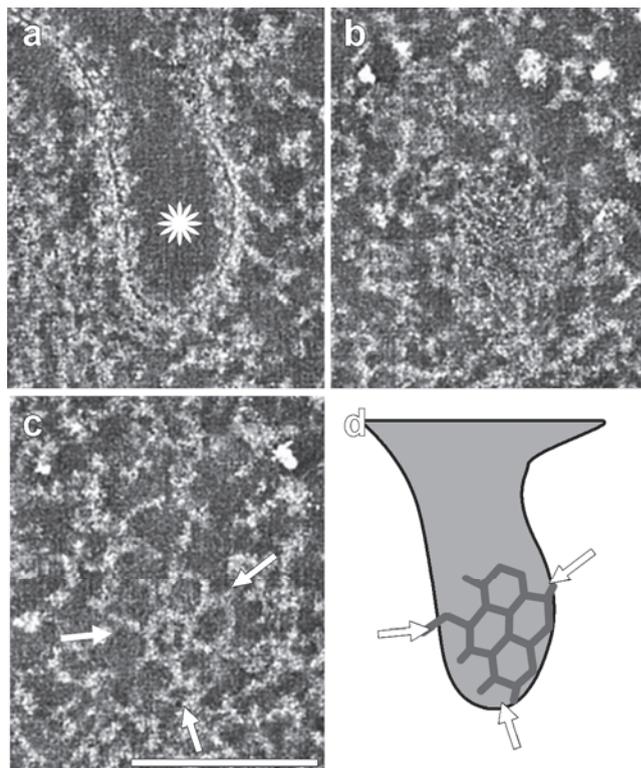


図5 小腸吸収上皮頂部の STEM トモグラム再構築像辺縁部に見られた被覆陥凹の XY 断面像. a ~ c の順に Z 方向に移動している. a では陥凹 (*) を録取る形質膜の脂質二重層が確認できる. c は被覆陥凹の細胞質側表面で接線方向になる断面であり, d の模式図に示すようなクラスリン分子が構築する六角格子構造に一致する構造が確認できる. c, d の矢印は同一の位置を示す. スケールバーは 100 nm.

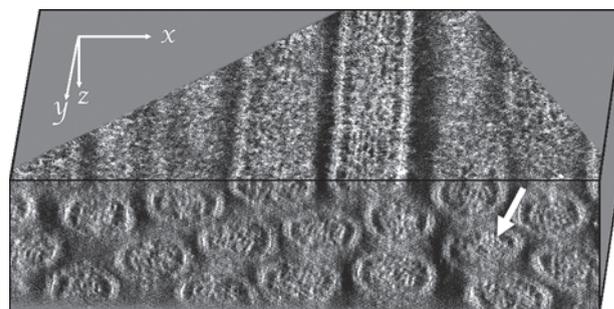


図6 小腸微絨毛縦断切片の STEM トモグラム再構築像 XY 平面と XZ 平面を示す. 矢印: XZ 平面でもアクチンフィラメント一本一本を区別できる.

の距離はおおよそ 6 nm となる. 図 6 に示している断面は再構築データの辺縁部であるものの, XY 方向では各フィラメントは十分分離できており, XY 方向の分解能は 6 nm 以下と考えられる. Z 方向での分解能は理論的に約半分程度に低下していると思われるものの, XZ 断面では部分的ではあるがアクチンバンドルを構成する各フィラメントが六方格子状に配列する様子が確認できる (図 6 矢印). 隣接するフィラメントが鉛直方向に配列した場合, これを分別するには 6 nm より高い分解能が必要となる. 一方, バンドル全体が 30° 回旋

すれば、隣接のフィラメントはX方向にずれ、対角に位置するフィラメントが鉛直方向に配列する距離はおよそ15 nmとなる。従って、この場合は15 nmより高い分解能があれば各フィラメントを分別できることになる。今回、部分的にフィラメントの配列が確認できたのはアクチンバンドルがこのような準結晶構造をとっているためだと考えられる。また、このことは、この再構築像が理論値に近い10 nm前後(6~15 nm)のZ方向の分解能を持っていることを示している。

6. おわりに

今回行ったSTEM電子線トモグラフィーでは撮影条件、その後の画像処理が最適であるかどうかについて今後さらに検討する余地は残る。しかしながら、理論値に近い分解能を広い範囲で得られるSTEMの利用はET法を用いた細胞・組織構造の解析を行う上で有効な手法であると考えられる。ここまで述べてきたように、生体組織の構築をET法によりタンパク質レベルでの解析を行おうと考えた場合、その解析に使えるのは、厚さ300 nm程度の空間にすぎない。しかしながら超薄切片にすると5~6枚分に相当する情報を包含しており、連続切片からのデータと十分対比することが可能である。従ってこの技術は、cryo-ET法とともに用いることで、タンパクレベルから組織レベルに至る構造をシームレスに解析することを可能にするものであるといえる。

謝 辞

試料作製は宮崎大学医学部 澤口 朗准教授に、STEM観察は日本FEI 青山一弘氏、九州大学総合理工学研究院 波多 聡准教授との共同研究によるものであり、ここに謝意を表します。

- 1) Pierson, J., Sani, M., Tomova, C., Godsave, S. and Peters, P.: *Histochem. Cell Biol.*, *in press* (2009)
- 2) Hoppe, W., Gassmann, J., Hunsmann, N., Schramm, H.J. and Sturm, M.: *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, **355**, 1483-1487 (1974)
- 3) 鷹岡昭夫, 田中信夫, 馬場則男: 顕微鏡, **39**, 2-33 (2004)
- 4) Marsh, B.J., Mastronarde, D.N., Buttle, K.F., Howell, K.E. and McIntosh, J.R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98**, 2399-2406 (2001)
- 5) He, W., Cowin, P. and Stokes, D.L.: *Science*, **302**, 109-113 (2003)
- 6) Beck, M., Lucic, V., Forster, F., Baumeister, W. and Medalia, O.: *Nature*, **449**, 611-665 (2007)
- 7) Medalia, O. *et al.*: *Science*, **298**, 1209-1213 (2002)
- 8) Kurner, J., Medalia, O., Linaroudis, A.A. and Baumeister, W.: *Exp. Cell Res.*, **301**, 38-42 (2004)
- 9) 樋田一徳, 清蔭恵美, 有井達夫: 顕微鏡, **43**, 250-253 (2008)
- 10) Bracewell, R.N. and Riddle, A.C.: *Astrophysical J.*, **150**, 427 (1967)
- 11) Penczek, P. and Frank, J.: *Electron tomography 2nd ed.*, Springer, 307-330 (2006)
- 12) Aoyama, K., Takagi, T., Hirase, A. and Miyazawa, A.: *Ultramicroscopy*, **109**, 70-80 (2008)
- 13) Ohta, K., Higashi, R. and Nakamura, K.: *Proc. 16th Int. Microsc. Congr., Sapporo, Vol. 1*, 253 (2006)
- 14) Mastronarde, D.N.: *J. Struct. Biol.*, **120**, 343-352 (1997)
- 15) Berriman, J., Bryan, R.K., Freeman, R. and Leonard, K.R.: *Ultramicroscopy*, **13**, 351-364 (1984)