

## 水の中の世界を電子顕微鏡で観る In-liquid Imaging by Electron Microscopy

佐藤 主税  
Chikara Sato

産総研・バイオメディカル研究部門・構造生理研究グループ

キーワード：電子線透過膜, ASEM, 環境セル, 環境 SEM, ラジカル

多くの物理現象や化学反応が水中で起こり、生命は海で生まれた。これらの現象を水中で高分解能観察することが求められている。近年の半導体製造技術の進歩は強靱な電子線透過薄膜を生んだ。その隔膜は、電子顕微鏡（電顕）カラム内の真空から濡れたサンプルを守り、水中観察を身近なものとした。もちろん、水中での物体はブラウン運動しやすい。倍率を上げるほど、動きを止めるためには高い時間分解能が必要とされる。露出時間の短縮には限りがあるため、動きやすいサンプルでは必然的に超高倍率ほどクライオ電顕の持ち場となり、水中観察電顕は missing mesoscopic scale を受け持つことになる。別の選択肢として、超解像度光学顕微鏡もある。しかし、電顕は波長の短い電子線がもたらす高分解能が魅力である。さらに、これまでの金属染色法の蓄積によって、ラベルを取り巻く周辺構造をある程度特異的に染色し可視化できる。今後、これら3顕微鏡法を組み合わせた総合的アプローチが増えることが予想される。

水中観察に関して、許容される電子線量は厳しく問われなければならない。経験的に、水中でのより安定な電子線観察には、少なくとも生体試料に関して2つのポイントがあると思われる。

1. 水中に浸されていること
2. ラジカル捕捉剤の添加

電子線損傷の最大原因は、照射により発生するラジカルと考えられる。1. は、サンプル上部を包む大量の水が対流によりラジカルを持ち去り、2. はグルコースやアスコルビン酸等がラジカルを捕捉・吸収する。その効果は、beam スキャンにおいて特に大きいと思われる。また、生体試料は観察前にグルタールアルデヒド (GA) で固定したほうが良いようである。GA の2つの反応基による架橋が、細胞における分子を動き難くするからで<sup>1)</sup>、生物試料の保存にも貢献する。

電顕による水中観察は、その原理から、薄い大気中 (1/100) で、数°C に冷やして蒸発を押さえた薄層水に包まれたサンプルを観察する環境 SEM<sup>2)</sup> と、薄膜を使った環境カプセル法<sup>3)</sup> に分けられる。後者の発展型が、SEM<sup>4)</sup> と TEM<sup>5)</sup> の両方で広がりつつある。環境カプセル TEM は STEM 化されて、

μm 厚の水層中の観察が可能になった<sup>5)</sup>。また、サンプルホルダーを、底に薄膜を張った dish 形式にし、その下に SEM を倒立させることで開放空間中の溶液を反射電子により観察できるようにしたのが大気圧電子顕微鏡 (ASEM) である<sup>6)</sup>。その利点は、電子が戻るのが膜近傍だけであり薄切が必要ないことであろう。膜近くでの物性・反応の観察や、培養細胞、特に初代神経細胞培養の回路網の研究に使える<sup>6)</sup>。抗体・抗生物質が効き難くなる細菌のバイオフィルムを膜上に形成させることで、感染症の慢性化機構の解明も期待される。Tilting などによる3次元構造決定は今後の課題である。

本特集では各分野を代表する先生方に、様々な応用例を御解説いただいた。この他の分野でも、電気化学反応・素材開発・揮発を伴う金属の固化 (ハンダなど) 等へ応用が広がっている。また、水中電顕法では、観察までのステップが少なく迅速な観察が可能である。そのため、病原菌・Mycoplasma の診断<sup>7)</sup> やスクリーニングにも適用可能である。ASEM 観察は、組織の表面近くを即座に観察できるため、迅速癌診断等への応用が待たれる<sup>6)</sup>。簡便な SEM と薄膜を組み合わせた装置ならば、染色液と発電機しか準備できないような場所、例えば難民キャンプのようなところでも診断機に使えるかと夢は広がる。

### 文 献

- 1) Tanaka, K.A.K., Suzuki, K.G.N., Shirai, Y.M., Shibutani, S.T., Miyahara, M.S.H., Tsuboi, H., Yahara, M., Yoshimura, A., Mayor, S., Fujiwara, T.K. and Kusumi, A.: *Nature Methods*, 7, 865–866 (2010)
- 2) Danilatos, G.D.: *J. Microsc.*, 121, 235–238 (1981)
- 3) Abrams, I.M. and McBrain, J.W.: *J. Appl. Phys.*, 15, 607–609 (1944)
- 4) Thiberge, S., Zik, O. and Moses, E.: *Rev. Sci. Instrum.*, 75, 2280–2289 (2004)
- 5) Jonge, N.D., Peckys, D.B., Kremers, G.J. and Piston, D.W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 2159–2164 (2009)
- 6) Nishiyama, H., Suga, M., Ogura, T., Maruyama, Y., Koizumi, M., Mio, K., Kitamura, S. and Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, 169, 438–449 (2010)
- 7) Sato, C., Manaka, S., Nakane, D., Nishiyama, H., Suga, M., Nishizaka, T., Miyata, M. and Maruyama, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 417, 1213–1218 (2012)