



## 透過型電子顕微鏡による3次元構造観察

信州大学ヒト環境科学研究支援センター  
機器分析部門 (医学部総合研究室)

亀谷 清和

### I はじめに

光学顕微鏡の1,000倍の解像力を持つ電子顕微鏡は、細胞・細胞小器官・生体膜の微細構造・ウイルスの構造などを明らかにして生命科学の発展に大きな役割を果たしてきました。さらに、分子生物学・遺伝子工学の進歩に伴い、生命体の構造観察および生命活動を直接観察することは電子顕微鏡に与えられた重要な使命であります。

電子顕微鏡の最大の特徴は高い分解能を持つことです。分解能とは見分けることのできる2点間の最小距離で、ヒトの肉眼では0.2 mm程度、光学顕微鏡では0.2 μmですが電子顕微鏡は0.1 nmです。それぞれの単位がmm~μm~nmと1,000倍ずつ小さくなってきます<sup>1)</sup>。

電子顕微鏡には透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscope: TEM) と走査型電子顕微鏡 (Scanning electron microscope SEM) の2種類があります。TEMは、薄切片または薄膜状態の試料内部構造を透過する電子線の透過像で観察し、取得像は2次元像です。SEMは細胞膜表面や組織表面の立体的な形態構造を電子顕微鏡内移動させて観察します。また、TEMの分解能は理論的には、SEMに比べて10倍ぐらい良いという違いがあります。

### II ナノスケールの微細構造

近年、生物学や高分子・半導体材料など様々な分野においてナノスケールの微細構造観察が要求されるようになり、様々な分野において電子顕微鏡を用いた研究・解析が行われています。それらには、SEMのように試料作製時に表面を露出させることが不可能な部位をTEMの分解能で立体構造観察を行いたいという要求やTEMのみで観察可能である部位 (試料内部構造) の立体構造観察という要求があります。

例えば、生物学では細胞小器官の接着部位、細胞膜構造、生体内の析出・蓄積物構造の観察、連続する膜構造中に存在する電子線透過像の違う構造物観察があります。

高分子・金属材料では針状・板状形態を持つ析出物、不純物の偏析や粒界等の構造解析があります。析出物、偏析、粒界等は材料の特性を制御しており、これまでの2次元情報のみならず3次元構造を正確に捉えた組織観察・構造解析を行い、微細構造と機能との関係を

明らかにする必要があります。しかし、TEM試料は100 nm (0.1 μm) 程度の厚みしかなく、1枚のTEM像から厚み方向の情報を読み取ることは不可能でした。これまでのTEM観察や組成解析は試料本来が持つ3次元形状・形態に起因する特性を十分反映できず、それらの情報を利用していませんでした。そのためTEM観察像や組成解析の結果は、0次元 (点)、1次元 (線)、2次元 (面) までで、奥行き・厚み方向 (Z軸) の情報は得られていません。

### III 3次元トモグラフィー

最近、TEM法とCT (Computer tomography) 法を併用する3次元電子線トモグラフィー (3Dimensional Electron Tomography: 3D-ET) 法が実用化され、電子顕微鏡観察レベルのナノスケールで試料の3次元観察することが可能になり、様々な組織・細胞、材料への応用がなされています。特にクライオ電顕 (凍結試料の直接観察可能な電顕) によるタンパク質分子の高分解能構造解析では、分子表面の立体構造が明らかになっています<sup>2)</sup>。

Tomographyとは、基本的には医療用のX線-CTやMRIなどによる断層撮影と同じ原理を応用した手法で、対象の内部を数十枚から百枚程度の投影像から再構成する手法を意味します。特にTEM-CTという用語はTEMによる対象の投射像を取得し対象物を再構成する手法をいいます (図1)。

X線-CT等の場合、検出器が体を中心に回転するのに対して、3D-ETでは試料が電子線に対して傾斜する手法を用いています。実際には、試料を高角度、約+60°から-1°ずつ傾斜させながら-60°のまで連続的にTEM像を取得し、得られた一連の連続傾斜像からその切片の3次元情報を再構築します。その後、各角度における透過像を同位置に修正したバックプロ

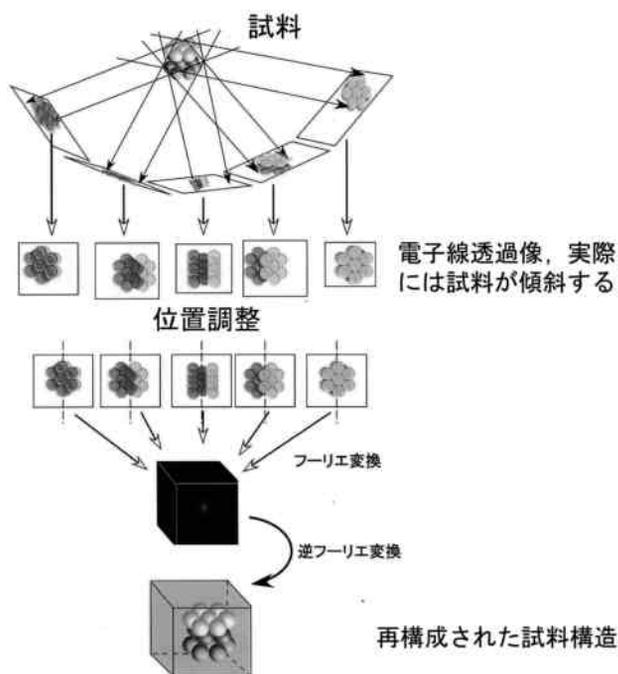
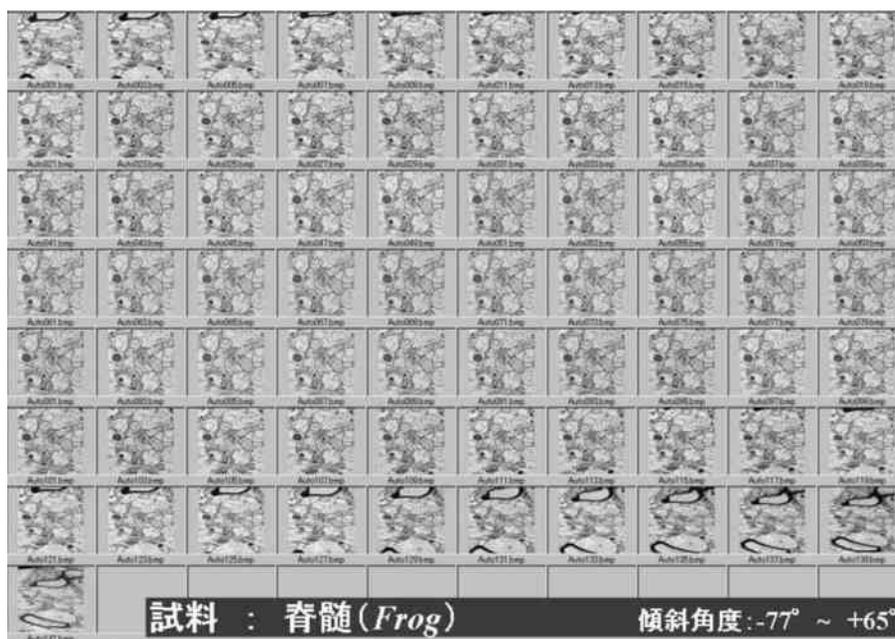


図1 取得画像から3次元画像を構築するプロセス

図2 傾斜角度 $-77^{\circ}$ から $+65^{\circ}$ までの連続画像

ジェクションにより2次元断面を構成し、最終的にはこれらの断面像を積み重ねて3次元物体を構成します。

トモグラフィーの実際のプロセスは、

- ① TEMを使用する連続傾斜像取得。(Recorder)
- ② 取得画像から3次元に再構成する。(Composer)
- ③ 3次元に再構成された像を任意の角度で回転させ構造観察する。(Viewer)からなります。

CTに必要な連続した傾斜像を得るのに最も重要な機構は、試料ステージの傾斜に伴う位置ズレをナノスケールで補正をしなければならないことです。最近のTEMでは全機能のデジタル化、周辺機器の一体化、ならびに自動化に伴い、レンズ系、ステージ等の制御、焦点、試料高さ、非点補正、試料傾斜などのコンピューターによる制御が進み、画像の観察や記録などもコンピューターにより処理されてきていますので、傾斜時の位置ずれを補正しながら1時間程度で必要枚数の画像が取得可能となります。

これらの結果、TEMによる3D-ETが可能となりました(図2, 3)。



図3 ラット腎臓ミトコンドリアの3D画像と3D画像からのX, Y軸画像解析

今後、TEMによる3D-ET法により蛋白質と様々な複合体を形成して機能している生物組織の立体構造解析は進むものと思われます<sup>3)</sup>。

機器分析部門(医学部総合研究室)では、平成20年度に大学(学長)と医学部の御協力により透過型電子顕微鏡JEM1400に更新することができ、同時に3D-ET装置を導入しました。この紙面をお借りして関係各位に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 電顕入門ガイドブック: 日本顕微鏡学会(編), 2004
- 2) Ray P, Klaholz BP, Finn RD, Orlova EV, Burrows PC, Gowen B, Buck M, van Heel M: Determination of Escherichia coli RNA polymerase structure by single particle cryoelectron microscopy. Methods Enzymol 370: 24-42, 2003
- 3) Studer D, Humbel BM, Chiquet M: Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution. Histochem Cell Biol 130: 877-889, 2008