

W-1 ワークショップ

九州電子顕微鏡技術研究会主催 「トモグラフィー」

加速電圧 100kV の透過型電子顕微鏡を用いた電子線トモグラフィーによる微小構造の観察

太田啓介¹・東龍平²・中村桂一郎¹

久留米大学医学部解剖学講座顕微解剖・生体形成部門¹，久留米大学電子顕微鏡室²

電子線トモグラフィー法(ET 法)は透過型電子顕微鏡を用いて数ナノメートルの分解能で試料の立体情報を解析する方法である。試料の立体情報を得る手法は ET 法以外にも多数存在するが、解像度 2nm～50nm の範囲で立体情報を得るには现阶段で ET 法は唯一の現実的な手法である。原理は医療用の X 線 CT と同じで、試料を様々な角度から撮影して得られた画像、即ち「影」の情報を数学的解析により逆投射し、その「影」を作った立体情報を再構築するものである。ET 法の観察対象は分子から細胞まで様々である。超高压電子顕微鏡を用いた ET 法では細胞やオルガネラレベルでの構造解析を行う事が可能となる。これに対し、加速電圧 100kV 程度の汎用透過型電子顕微鏡を用いた ET 法ではレプリカ膜や厚さ 100nm 以下の超薄切片に内包される構造が観察対象となる。生物試料を観察する上で 100nm というスケールは、サブオルガネラレベルの大きさで、多数のタンパク質が関与して作られる細胞骨格や構造体などが入る大きさといえる。

我々は HITACHI H-7650 を用い、加速電圧 100kV で樹脂包埋組織切片を ET 観察することにより、*in vivo* におけるタンパク質構造体の立体的構築の解析を試みた。観察対象は腸管上皮頂部に見られる微絨毛の芯を作るアクチン束とした。アクチン束の構造は精製タンパクからの再構成実験等で詳しく調べられているが生体内での真の構造についての解析は進んでいない。今回 *in vivo* のアクチン束の形態を ET 法にて再構築にあたり、試料の固定法、観察法、および再構築アルゴリズム等の条件検討を行った。固定法は化学固定、または高压凍結法と金属圧着法による急速凍結-凍結置換したものを用いた。いずれも 40~90nm の厚さのエポキシ樹脂包埋切片とし、カーボン蒸着により補強した。また傾斜観察像のアライメント用マーカーとして 5nm 金コロイドを切片表面に撒布した。試料は 1 軸傾斜観察に加え 2 軸傾斜観察を行った。即ち±60°，1~2° step で試料を傾斜させ一連の像を撮影した後、2 軸観察の場合は試料を 90° 回転し、同エリアを再度傾斜撮影した。各々のデータは 3 種類のアルゴリズム(WBP, SIR, TBR)で再構築し、2 軸観察では最終的に 2 軸のデータを結合させて解析用の再構築像とした。

その結果、中間調の多い生物試料では、再構築アルゴリズムに代数的反復法 (SIR 法) を用いることで比較的良い像を得ることが出来た。急速凍結技法試料では、アクチン束を構成する F-actin 様構造を描出することが出来た。3D 解析は、この構造が右巻きラセン構造を持ち、半回転するのに要する距離 (ピッチ) が約 35nm と F-actin の特徴と一致することを示した。しかし本観察では F-actin を構成する G-actin 様構造の配列は不完全にしか描出できなかった。一方 F-actin 様構造同士はアクチン結合タンパクと思われる別の構造物によって互いに連結されている様子が観察された。以上の結果は本手法が組織細胞中のアクチン束など微小な *in vivo* の構造の解析に有効な手段であることを示している。