

電子顕微鏡観察のための凍結試料作製装置

教育学部理科教育講座 金子 康子
科学分析支援センター 辻 季美江

生物を構成する細胞の中では、様々な小器官や膜構造、管状・繊維状の構造や生体高分子が活発に動き回り、相互に関わりながら機能している。その様子は近年、種々の蛍光色素で標識することにより光学的に捉えることができるようになった。しかし、光学顕微鏡に比べて格段と分解能が優れている電子顕微鏡を用いて、活動する細胞内微細構造の瞬時の姿を捉えることは、細々と試みられてきたが、広範に行われる状況にはなっていない。これまで生物組織や細胞を電子顕微鏡で観察するためには、化学薬品を用いて細胞内の構造を固定する試料作製法が一般的であった。しかし、固定剤が細胞内に浸透して生体分子に架橋構造を作り固定が完了するまでには分単位の時間がかかることが分かっており、この間に細胞内の微細構造が変化することはまぬがれない。より生きている状態に近い構造を捉えるためには、組織や細胞の微細形態を瞬時に固定することのできる凍結固定が必要となる。通常、生物の組織・細胞は 70～90%の水分を含んでおり、凍結速度が遅いと細胞内で氷晶が成長して微細な構造は破壊され、電子顕微鏡観察には耐えない状態になる。そこで電子顕微鏡では構造の認められない非晶質の状態(ガラス様凍結)を得ることが極めて重要となる。この目的を達成するための装置が高圧凍結装置(Leica EM HPM100)と急速凍結装置(Leica EM CPC)であり、凍結ウルtramicroトーム(Leica EM UC7/FC7)と共に昨年度科学分析支援センターに導入された。

高圧凍結装置(Leica EM HPM100, 図 1)は、試料の凍結時に瞬間的に 2,100 bar の高圧をかけることにより氷晶の形成を防ぎ、その結果、数 100 μm の深さまでガラス様凍結を得ることが可能な画期的な装置である。微生物、培養細胞、組織など様々な生物材料に対応可能なキャリアシステムを有し、直径 6 mm の広い面積の試料も凍結することができる。高圧凍結した試料は凍結割断した後、既存のクライオトランスファー(Gatan Alto 1000)を備えた分析・低温低真空走査電子顕微鏡(Hitachi S-3400N)で凍結状態を維持したまま観察・分析することができる。良好な状態に凍結しただけで、他の処理は一切施さない試料は、細胞内の微細構造だけでなく、すべての分子の局在をそのまま保持していることから、付属のエネルギー分散型 X 線分析装置(EDX, Bruker XFlash 5010)で細胞内の主要なイオンの分布なども同時に可視化することが可能となる。また、高圧凍結した試料を -80°C 以下でオスミウム・アセトンなどの固定液に置換(凍結置換)後、



図 1 Leica EM HPM100(高圧凍結装置)

樹脂包埋して超薄切片を作製し、透過電子顕微鏡観察することにより、いきいきと活動している状態に極めて近い細胞内小器官や膜構造の微細形態を捉えることが可能となる。

急速凍結装置 (Leica EM CPC, 図 2) は、微生物やタンパク質などの高分子を薄膜状にした試料を、冷却した冷媒 (液化エタンなど) 中にスプリングにより急速に浸漬して凍結する装置である。冷却速度を速くすることにより氷晶の形成を防ぐが、この方法で良好な凍結が得られるのは試料表面から 10 μm 以下である。凍結した試料はクライオトランスファー (Gatan Alto 1000) を備えた分析・低温低真空走査電子顕微鏡 (Hitachi S-3400N) で凍結状態を維持したまま観察・分析することもできるし、新たに導入されたクライオトランスファーホルダー (Gatan Model 626) を用いて 200 kV 分析透過電子顕微鏡 (FEI Tecnai G2) で観察することも可能である。



図 2 Leica EM CPC (急速凍結装置)

凍結ウルトラミクローム (Leica EM UC7/FC7, 図 3) は、電子顕微鏡観察のために上記いずれかの装置で凍結した試料から、凍結状態を維持したまま超薄切片を作製することのできる装置である。生物試料だけでなく、やわらかい高分子材料の凍結超薄切片を作製することも可能である。例えば高圧凍結装置 (Leica EM HPM100) で凍結した試料から平滑な観察面を作出して分析・低温低真空走査電子顕微鏡 (Hitachi S-3400N) 観察、または凍結超薄切片を作製してクライオトランスファーホルダー (Gatan Model 626) を装着した 200 kV 分析透過電子顕微鏡 (FEI Tecnai G2) で観察するなど、幅広い活用が期待できる。また、凍結切片を用いた感度のよい免疫電子顕微鏡法 (特異的な抗体を用いて特定の生体分子の細胞内局在を検出する方法) に凍結ウルトラミクローム (Leica EM UC7/FC7) を利用することも可能である。



図 3 Leica EM FC7 (凍結ウルトラミクローム)

このように今回導入された凍結試料作製装置を、既存の分析・低温低真空走査電子顕微鏡 (Hitachi S-3400N) やクライオトランスファーホルダー (Gatan Model 626) を装着した 200 kV 分析透過電子顕微鏡 (FEI Tecnai G2) と組み合わせて活用することにより、従来法では困難であった、生きている状態に近い細胞内微細構造と分子の局在を電子顕微鏡で観察する手法の可能性が大きく広がる。活発に活動する細胞内微細構造の真の姿と機能の解明に迫り、新たな細胞像の構築に貢献することができる。これら最先端の微細構造解析技術を駆使することにより、近年進展の著しい生物学諸分野の研究をサポートすると共に、新たな研究分野の開拓も期待できる。さらに、これらの凍結試料作製装置は、生物試料だけではなく、やわらかい高分子材料の電子顕微鏡観察試料の作製にも威力を発揮することが期待される。