

# 透過型電子顕微鏡を用いた生化学実験について

技術部 先端技術支援室 後藤 由佳子

## ○発表の目的

透過型電子顕微鏡は分析棟 2 階にあり、日本電子データム(JEOL DATUM)と年間保守契約を結んでいる。使用している機器は JEM-1200EX で、1988 年 3 月に購入したものである。現在、生物適応、昆虫生化学、生物圏変動の 3 グループ、およそ 10 人が使用している。電子顕微鏡での観察対象は、植物、動物細胞、タンパク質など多岐に渡っている。

今回の発表では、透過型電子顕微鏡の観察原理、生物系グループでの観察例を述べる。また、電顕室をより効率的に利用してもらうために、今年度これまでにあったトラブルのうち簡単に対処できるものについてはその方法を紹介する。



図 1. 透過型電子顕微鏡 (JEM-1200EX)

## ○透過型電子顕微鏡の原理

電子顕微鏡には走査型電子顕微鏡と透過型電子顕微鏡の二種類がある。走査型電子顕微鏡が試料の表面を立体的に観るものであるのに対し、透過型電子顕微鏡では電子が試料の中を通ることで内部の構造等を二次元的(平面的)に観察することができる。

ヒトの目の分解能(二点を識別できる最小距離)はおよそ 0.2 mm、光学顕微鏡の分解能が 0.2  $\mu\text{m}$  であるのに対し、電子顕微鏡は機器の性能にもよるが分解能はおよそ 0.1 nm であり、およそ  $10^6$  倍に拡大して観察することができる。

光学顕微鏡では、光源から出た光は集光レンズを通して試料に照射され、対物レンズ系に入り像を結んだものを接眼レンズでさらに拡大する(図 2a)。透過型電子顕微鏡では、電子銃から照射された電子は照射レンズ、試料、対物レンズ、中間レンズ、投射レンズを通して、蛍光スクリーンに映し出される(図 2b)。このように、基本的な観察原理は同じであるが、焦点のあわせ方は異なる。光学顕微鏡では対物レンズと試料の距離によって焦点をあわせるが、透過型電子顕微鏡では試料の位置は固定され、電子レンズのコイルの励磁電流を調整して焦点をあわせる。また、透過型電子顕微鏡では、主に電子の散乱と位相の違いによる波長の変化により像のコントラストができる。

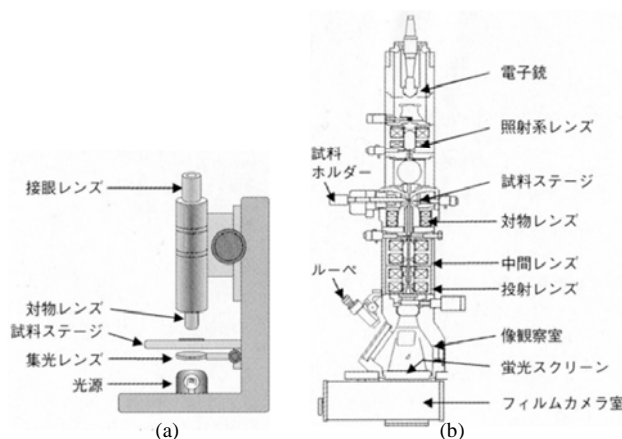


図 2. 光学顕微鏡(a)と透過型電子顕微鏡(b)の構造

## ○透過型電子顕微鏡での観察法

透過型電子顕微鏡で生物試料を観察する際には、電子染色を行う。電子染色法にはポジティブ染色法とネガティブ染色の二種類がある。細胞などの試料の場合、固定後に樹脂等で包埋した後、ウルトラマイクロームを用いて電子線が通るほど薄い(0.1  $\mu\text{m}$ )切片にし、酢酸ウランとクエン酸鉛などで染色する。試料に重金属を結合させ余分な染色剤を落とすことで、染色剤の残っている構造等を観察することが出来る(ポジティブ染色、図3)。一方、例えば、高分子のタンパク質を観察するときには、試料を固定する必要はない。試料をグリッドに載せて酢酸ウランなどで染色すると、酢酸ウランが試料の周辺や間隙に入り込み、試料の部分は電子密度が低いために電子線が透過しやすいことで、陰影像として観察される(ネガティブ染色、図4)。高分子のタンパク質のほかに、ウイルスなどの微小構造もネガティブ染色法で観察することが出来る。

また、低温研内では免疫電顕法も使われている。この方法では、抗体に結合させた標識物質により、超薄切片内での目的のタンパク質の局在を観察できる。

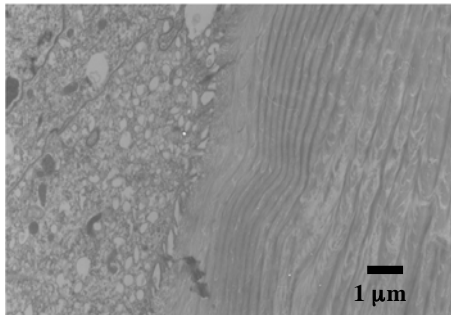


図3. ポジティブ染色の観察例  
カイコ体表(背中側)の超薄切片像。エポン包埋。  
酢酸ウランとクエン酸鉛で染色。5,000倍で観察。

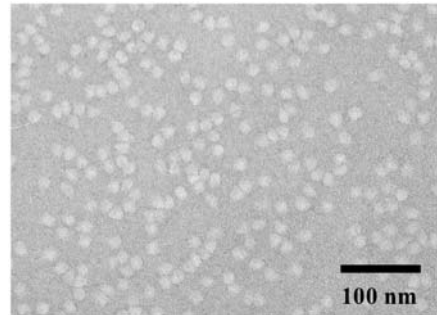


図4. ネガティブ染色の観察例  
カイコ体液の脂質輸送タンパク質 lipophorin  
(図中の白色球状のもの)。50,000倍で観察。

## ○最近のトラブルと今後の課題

JEOL DATUM と年間保守契約を結んでおり、毎年6月の定期点検時に部品交換を含む必要なメンテナンスをしてもらっている。その定期点検以外に、平成18年度6月から1月中旬までの間に9回修理を依頼した。購入から19年経っており、老朽化による故障等(基板の接触不良など)による修理の依頼が多い。またフィラメントや油拡散ポンプのヒータ(DPヒータ)など、消耗品の交換も依頼した。

トラブルの中には簡単に対処できることもある。例えば、原因不明で突然ボタン等を押しても反応しなくなってしまった場合、resetボタンを押すだけで復帰することがある。しかし、そのresetボタンの位置はあまり知られていない。夜間など研究所内にいる利用者が限られている時間にトラブルがあった場合、対処法が分からずに観察を諦めてしまうケースもあるようだ。そのため、利用者間でトラブル時の対処法などの情報を共有する必要がある。今後はトラブル時のチェック表と対処法を作成して、利用者に分かりやすく示す予定である。

## ○謝辞

電顕室の管理をする上で、日頃の生物系グループの先生をはじめ、研究員、学生の皆様のご協力は欠かせません。これからもよろしくお願いいたします。