

透過型電子顕微鏡観察業務について

著者	市川 佳伸
雑誌名	技術報告
巻	19
ページ	57-60
発行年	2014-03-10
出版者	静岡大学技術部
URL	http://doi.org/10.14945/00008044

透過型電子顕微鏡観察業務について

市川 佳伸

静岡大学 技術部 教育研究支援部門

1. はじめに

静岡大学グリーン科学技術研究所技術支援室には透過型電子顕微鏡 H7500 型 (日立ハイテクノロジーズ) が設置されており、動植物の組織、材料などの微細構造解析に使用されている。今年度、筆者は本学の教員よりバクテリオファージ粒子の構造観察についての相談を受け、研究支援業務として試料の準備と透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行うとともに、TEM の操作からネガの現像や画像解析等についての技術指導を行った。筆者は植物の細胞内微細構造解析を行ってきたが、バクテリオファージについては未経験であったため最初はなかなか観察が出来ずにいた。結果としては依頼者に納得して頂ける画像データを取得することが出来たので、観察とデータ取得に至るまでの過程について、失敗経験なども含めて報告する。

2. バクテリオファージについて

バクテリオファージ (以下、ファージ) とは細菌に感染するウイルスである。サイズは 20~200 nm で、土壌、河川、海水、動物の腸内などの細菌が生息するあらゆる場所に存在している。大腸菌に感染する T4 ファージが有名で、高等学校の生物でも取り上げられているし、実験教材としてもよく使われている。ちなみに本学農学部の 1 年生が受講する生物学実験でも T4 ファージを材料として取り扱っており、実は非常に身近な存在である。さらにファージは細菌病の治療や防除のために医薬や農業分野でも応用される (ファージセラピー) ほか、ファージの宿主特異性を利用して細菌の分類 (ファージタイピング) や、生物工学、分子生物学分野にも日常的に用いられており、様々な分野での研究が進められている。

研究をするにあたり、対象のファージがどのようなファミリー (科) に属するのかについての情報が必要になってくるが、その粒子構造が分類の指標のひとつとされているため、まずは電子顕微鏡での観察が必要となってくる。ファージ粒子は通常、DNA を収納した頭部 (Head) や尾部 (Tail) などの部分からなっている (例: T4 ファージ、図 1)。ほとんどのファージが尾を持つが、このうち尾の形状によりミオウイルス科 (長い尾部、例: T4 ファージなど)、シホウイルス科 (長くしなやかな尾部、例: λ ファージなど)、ポドウイルス科 (短い尾部) の 3 つのファミリーに分類されている。尾部の形状はまた細菌への感染方法の違いにも関与している。

今回依頼を受けた観察業務では、病原菌に関わる 3 種類のファージについて、それぞれどのような尾部を持つかを主に観察し、それぞれが属するファミリーを確認することを目的とした。

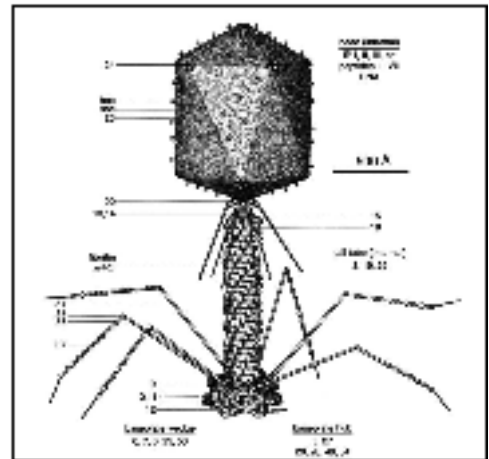


図 1 T4 ファージの外形 (模式図) [1]
タンパク質のシートで作られた 20 面体の頭部と長い尾部を持つ。大腸菌を宿主とし感染力が高い。

3. 透過型電子顕微鏡観察について

本学のグリーン科学技術研究所研究支援室（静岡キャンパス）に設置されている共同利用機器のTEM H-7500（図2）を使用して今回の業務を行った。これまでに主に動植物組織や微細繊維などの材料の観察に用いられている。このTEMはデジタルカメラが装備されていないので、フィルムでの撮影となり、隣にある暗室での現像作業が必要となる。

TEMでのファージの観察方法としてはネガティブ染色法が一般的に用いられている。この方法は、観察対象であるファージ粒子以外の部分に染色液をのせることで観察するという方法である。組織を観察するような、固定や包埋、薄切などの操作が不要で、ファージの懸濁液さえ用意されていれば15分間程度で準備ができ簡易であるということが利点である。基本操作と原理についての簡単な図を示す（図3）。文献等で調べると、基本的な手順は同じであるが、ファージ粒子懸濁液をグリッド（試料をのせるプレート、直径3mm程）に載せておく時間（1～10分）や染色液を混ぜるタイミング（ファージをグリッドに載せる前か後か）などの点でいろいろなやり方があることが分かった。

まずは基本の手順に加えて、時間とタイミングを変えながら何度か試料を作製し観察をしたが、染色ムラや塩が析出したかと思われるようなもの（正確には何かは不明）といったアーティファクトが見られるばかりで、ファージがあるのか、どれがそうなのかも分からない状況が続いた。最終的に観察が出来た方法はTEMメーカーのウェブページに紹介されている方法[2]を参考にし、次の通りである。なお染色液には2%リンタングステン酸（pH 7.0）を使用した。

- 1、グリッド上にファージ懸濁液を5 μ L滴下し、10分間おく。
- 2、グリッドをピンセットでつまみ上げて縦にし、染色液を一滴たらして懸濁液ごと洗い流す。（下においたろ紙にてかるく吸わせる）
- 3、パラフィルム上に染色液滴を2つ用意しておき、グリッド表面を数秒ずつ浸ける。
- 4、余分な染色液をろ紙で吸い、（ピンセットにろ紙を当てながら、つまんだ部分の脇から吸い取るようにする）風乾させる。

この方法で観察は出来たが、同じように作製しても見えない場合もあり、染色液の吸い取り具合が関係しているのではないかと考えている。もちろん同じ程度に吸い取っているつもりだが、観察してみると染色液の“のり具合”がかなり違うと感じられ、ある程度の慣れと勘が必要であると思われる。コントラストが低いことでも苦労したが、対物絞りを最大に絞って観察し、撮影時の露出時間を長くした。このことは、試料へのダメージを軽減する点では良かった。また、ファージなのかアーティファクトなのか区別がつかないことが最初あったが、ファージであると判断する根拠としては「サイズ」「形」の同じ粒子が多数観察されているかどうかとした。



図2 透過型電子顕微鏡 H-7500（総合研究棟2F）

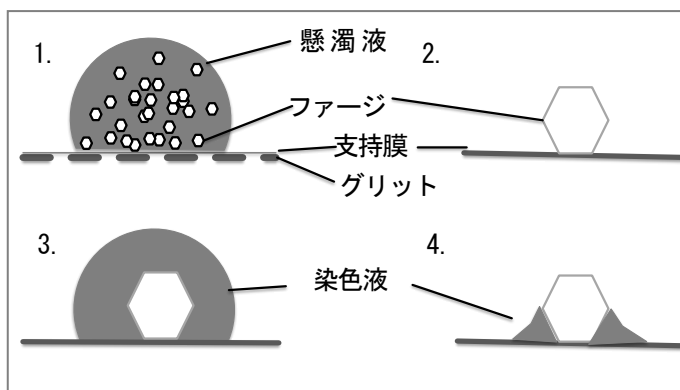


図3 ネガティブ染色法の基本手順

1. ファージ懸濁液をグリッド上に載せファージ粒子を吸着させる。
2. 懸濁液をろ紙で吸い取る。
3. 染色液を載せる。
4. 余分な染色液を吸い取る。

4. デジタル画像データについて

現像したネガフィルムは、引き伸ばし機を使って印画紙に焼き付ける、もしくは透過原稿ユニット付きイメージスキャナーで読み取る方法をとっていたが、鮮明な画像を取得するには1枚あたりに時間がかかり、しかも枚数が多い場合は1枚ごとにネガの交換や設定をしなくてはならないので非常に面倒であった。そこで、ライトボックス上にネガを置いてデジタルカメラで撮影する方法を取った。コンパクトデジカメでも画素数の大きいものが一般的になっており、フォーカスさえきちんと合わせることが出来れば、十分な画像を得ることが出来た。ただし、ネガフィルムであるので、画像処理ソフトウェアを使用して必ず階調の反転をすることと、デジカメではRGBで撮影されるので、グレースケールへの変換を忘れずにする必要がある。今回は無料で公開されている「ImageJ」[3]というソフトウェアを利用した。

5. 観察結果について

観察した3種類のバクテリオファージ(A,B,C)の写真を図4に示す。AとCは短い尾部を持っていることが観察出来た。このことからポドウイルス科に属し、Bは長くしなやかな尾部を持っていることからシホウイルス科であると判断した。また、ファージ粒子のサイズや頭部の形などが、同じ科に属する既知のファージと近いことから、これらはアーティファクトやコンタミではなく間違いなく目的のファージであると判断した。

ファージ粒子サイズと尾部形状について観察し、分類することができたので、観察業務としては目的を果たすことはできた。しかしながら、教科書にのっているような鮮明な画像は得ることはできなかった。TEM本体のメンテナンス不足や軸調整が不十分であることが1つの原因と考えられるが、ネガティブ染色での試料作製についてもまだ検討する必要があると考えている。

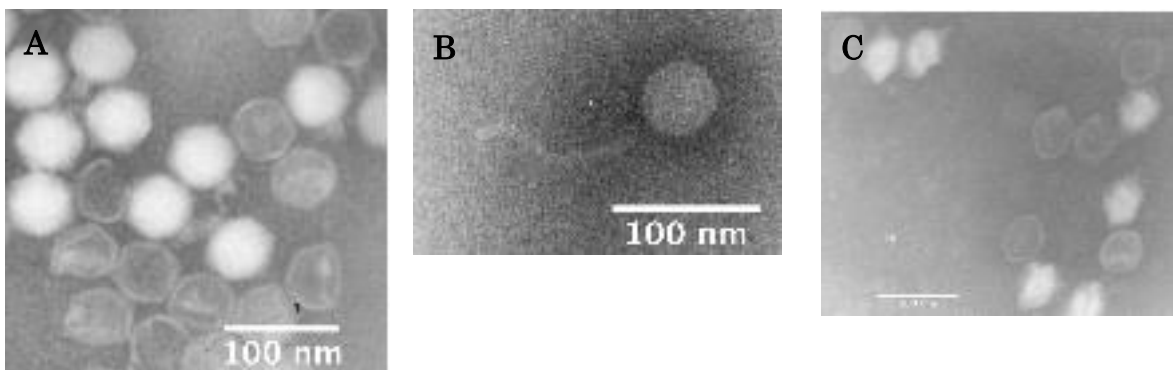


図4 ファージ粒子

A 60.0 k x zoom 80 kV. B 100 k x zoom 80 kV.
C 100 k x zoom 80 kV.

6. まとめ

ファージはネガティブ染色で簡単に観察できるものと考えていたが、実際に見てみると、注意しなくてはいけない点がいくつかあると感じた。まずはコンタミがあるとファージと区別出来なくなるので、できるだけ減らすために清浄な試薬の使用や環境を心がけることである。今回は染色液をそのつどフィルターでろ過して使用した。またアーティファクトとの区別をして信頼度の高いデータを得るために、ファージは同じ形状のものが複数しっかり観察できる視野で撮影をするということである。

また当たり前のことであるが、倍率は 100 k 以上が要求されるので TEM 本体の軸調整、非点補正をしっかりと行っておくことがやはり重要である。

参考文献

- [1] Leiman PG, et al. Cell Mol Life Sci. 2003 Nov; 60(11):2356-70.
- [2] http://www.hitachi-hitec.com/science/technique/chapter8_1.html
- [3] 画像処理ソフトウェア <http://rsb.info.nih.gov/ij/>