

[研究論文]

新規ネガティブ染色剤を用いた 透過型電子顕微鏡による生物試料の観察

--分析電子顕微鏡システム利用研究成果、そのXXIII (1) --

依田ひろみ¹・小池あゆみ¹

1 博士後期課程応用化学・バイオサイエンス専攻

Observation for living substances with the transmission electron microscopy using a novel negative staining reagent

--Research works accomplished by using Electron Microscope System: XXIII(1)--

Hiromi Yoda¹, Ayumi Koike-Takeshita¹

Abstract

Aqueous uranyl acetate has been extensively used as a superb staining reagent for transmission electron microscopy of biological materials. However, recent regulation of nuclear fuel material severely restricts its use. Since uranyl acetate is hazardous due to biological toxicity and remaining radioactivity, we examined gadolinium acetate (GdAc), a novel staining reagent for negative-staining electron microscopy in comparison with phosphotungstic acid (PTA). As a result, fine TEM images were observed when bacterial cells of *Escherichia coli* and *Thermus thermophilus* were respectively stained with 1 % PTA and 2.5 % GdAc. When GroEL/GroES complexes were stained, the high density sample on the grid was buried in the 1 % PTA, unless dilution of PTA or GroEL/GroES complexes. On the other hand, 2.5 % GdAc staining made it possible to observe high density sample clearly without dilution. We revealed that GdAc reagents possess excellent capability for staining of bacterial cells (~ μm) and GroEL/GroES complexes (~10 nm). GdAc can also be utilized as good negative-staining reagent to study supramolecular architecture of biological materials.

Keywords: Negative stain, Transmission Electron Microscopy, TEM, Chaperonin complex

1. はじめに

ネガティブ染色法は、透過型電子顕微鏡 (TEM) 下で、細菌の表層構造、遊離した細胞構成成分、酵素などのタンパク質分子、ウイルス粒子などの微小構造を観察するのに適した、迅速かつ簡便な方法である。重金属の染色液を用いた電子染色法の一つであり、染色剤が試料の微細構造の間隙に入り込んで密度差を作り出すことによって、電子線を透過する生体試料の観察像を“ネガティブ”に出現させるものである。

ネガティブ染色法では、従来、酢酸ウランが重用されて

きたが、核拡散防止条約により、現在は保管が認可された研究施設のみでしか用いることができない。酢酸ウランに代わる染色剤としては、タングステン、モリブデンの誘導体などが用いられているほか、新規の染色剤の開発が検討されている。

今回、既存のネガティブ染色剤であるリンタングステン酸と、人体への安全性と使用の簡便性を考慮して新規開発された酢酸ガドリニウムを主剤とする市販染色剤を用い、細菌およびタンパク質複合体の構造形態をネガティブ染色法/透過型電子顕微鏡法で観察し、評価した。

2. 材料および測定方法

2.1 生体試料の調製

大腸菌 *Escherichia coli* DH5 α および高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* HB27 を液体培養し、培養液を細菌試料として用いた。*E. coli* DH5 α は、5ml の LB 培地 (1 % Tryptone, 0.5 % Yeast extract, 1 % NaCl, pH 7.5) に植菌し、37 $^{\circ}$ C で一夜振盪培養した。*T. thermophilus* HB27 は、5ml の TM 培地 (0.4 % Tryptone, 0.2 % Yeast extract, 0.1 % NaCl, pH 7.5) に植菌し、70 $^{\circ}$ C で一夜振盪培養した。

精製した *E. coli* 由来 GroEL 変異体^{1,2} と GroES を用い、20 mM HEPES/KOH, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ (pH 7.5)、1 mM アデノシン三リン酸 (ATP) の反応液中で GroEL : GroES = 1 : 1 または 1 : 2 の混合比で GroEL/GroES 複合体形成反応を行い、反応液をタンパク質複合体試料として用いた²。

2.2 ネガティブ染色剤

リンタングステン酸 (PTA) は TAAB 社製を購入し、超純水に溶解後、KOH を用いて pH 4.0 に調整し、1% PTA、0.75% PTA 溶液をそれぞれ調製した。調製後、使用する分だけ 0.22 μ m フィルター濾過をして使用した。

酢酸ガドリニウム (GdAc) は、日新 EM 株式会社による当時開発中の試用品 (商品名 EM スタイナー) を適用し、超純水で 4 倍希釈して使用した (Gd 濃度 2.5 %, pH 6.0-6.2)。

2.3 観察試料の作製と透過型電子顕微鏡観察

水溶性試料を観察するにあたり、支持膜付き Cu グリッドをイオンコーター IB-2 (エイコーエンジニアリング) により 1400 V、3 mA、30 秒間グロー放電して親水化し、処理後 1 時間以内に以下の処理を行った。

菌体観察のため、パラフィルム上の試料滴 10 μ l にエラストック支持膜付き Cu グリッド (応研商事) を 1 分間接触後、超純水で 1 回洗浄し、1 % PTA または 2.5 % GdAc 10 μ l で 1 分間染色した。ポジティブ染色防止のため、染色後ただちに家庭用ドライヤーで 30 秒間冷風乾燥し、ドライキーパー (SANPLATEC Corp.) 内でグリッドを 16 時間以上乾燥した。

生体分子観察のため、コロジオン支持膜付き Cu グリッ

ド (応研商事) に反応試料液 6 μ l を 1 分間接触後、超純水で 1 回洗浄し、1 % または 0.75 % PTA、あるいは 2.5 % GdAc 6 μ l で 1 分間染色した。ドライキーパー内でグリッドを 16 時間以上乾燥した。

上記のように調製したグリッドを、透過型電子顕微鏡 JEM2000EX (日本電子) で観察した。菌体観察は、加速電圧 120 kV、対物絞り (大) で行った。生体分子の観察は、加速電圧 100 kV、対物絞り (小) で行った。現像した撮影ネガフィルムを印画紙に焼き付け、600 dpi で画像取り込みした。

3. 結果

3.1 菌体観察

E. coli のネガティブ染色において、1 % PTA では、ポジティブ染色された菌体が希に存在した (Fig. 1a)。菌体の多くは、菌体の形状を留めるもの、または退縮したものであった。形状を留めた菌体の周辺では、菌体外部に鞭毛線毛構造を確認した (Fig. 1b、矢頭黒)。退縮した菌体は、グリッド調製時のピペット操作の物理的衝撃、または染色剤により壊死したと考えられ、細胞極に溶菌の痕跡があるものが確認された (Fig. 1b、矢頭白)。

E. coli の 2.5 % GdAc 染色では、ポジティブ染色された菌体は見られなかったが、ほとんどの菌体が溶菌し、両細胞極が陥入しているように見えた。(Fig. 1c、矢頭白)。細胞極周辺に崩壊した細胞壁が薄膜状に見え、1 % PTA 染色より潰れた形状が鮮明に確認できた。

T. thermophilus のネガティブ染色において、1 % PTA では、どの菌体もほとんどポジティブ染色され、菌体外部に残る染色剤はコントラストとして得られなかった (Fig. 1d)。

T. thermophilus の 2.5 % GdAc 染色では、染色剤は菌体周囲に留まり、菌体表面の凹凸が確認できるネガティブ染像となった (Fig. 1e)。しかし、PTA に比べて GdAc のコントラストは低いため、染色剤が視野全体に伸び広がっていても倍率や電子線照射量の条件に大きく影響を受け、撮影像のように菌体の輪郭をぼんやり浮き上がらせる結果となった。1 % PTA 染色時の *E. coli* (Fig. 1b) のような鞭毛線毛構造を確認することはできなかった。

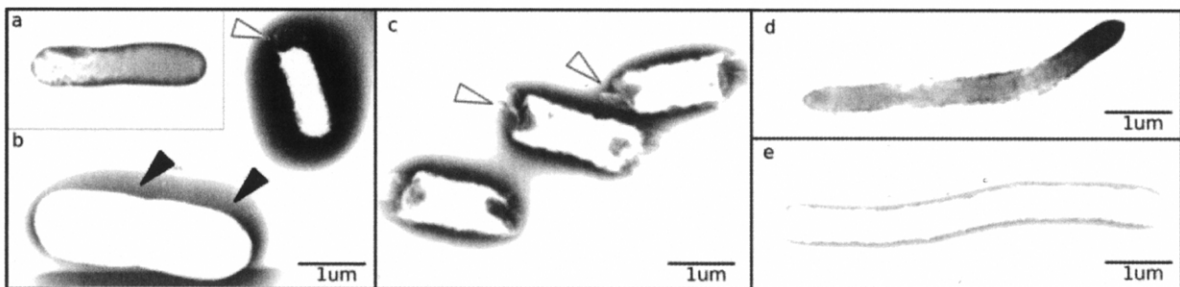


Fig. 1 細菌類のネガティブ染色

(a, b) *E. coli* の 1 % PTA 染色. (c) *E. coli* の 2.5 % GdAc 染色. (d) *T. thermophilus* の 1 % PTA 染色. (e) *T. thermophilus* の 2.5 % GdAc 染色. 矢頭白: 溶解した細胞極, 矢頭黒: 線毛を示す.

3.2 生体分子 GroEL/GroES 複合体の観察

GroEL は直径約 15 nm のダブルリング構造、GroES は直径 10 nm 未満のシングルリング構造をしている³(Fig. 2)。これらは ATP 依存的に複合体を形成し、細胞内タンパク質の折りたたみに寄与する働きを持つ生体分子である。今回は GroEL 変異体を用い、GroEL/GroES 複合体をネガティブ染色に適用した。

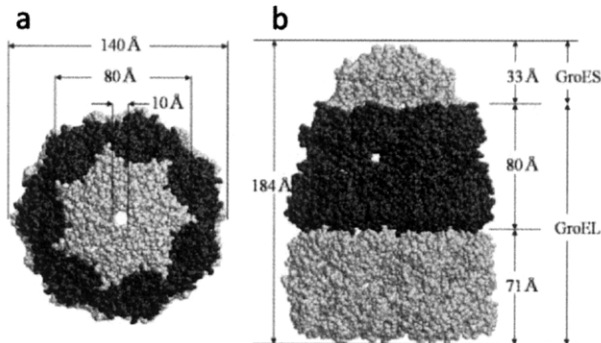


Fig. 2 GroEL/GroES 複合体の立体構造

(a) 上から見た図, (b) 横から見た図。

1 % PTA 染色では、1 μM GroEL/2 μM GroES/1 mM ATP 反応溶液を試料にした場合、GroEL/GroES 複合体が密集し、染色剤が偏在して試料が厚みを増したため、複合体のほとんどすべてがグリッド上で起立し、複合体を上から見た状態の観察像が得られた (Fig. 3a)。そこで、0.1 μM GroEL/0.2 μM GroES/1 mM ATP 反応溶液を試料にすると観察像が鮮明になり、転倒状態の GroEL/GroES 複合体を確認することができた (Fig. 3b)。転倒状態の複合体の多くは 1 分子の GroEL に 2 分子の GroES が結合したフットボール型複合体で、GroEL : GroES = 1 : 2 の混合比のために形成されたと考えられる。これらのことから、グリッド上に試料が過密に存在すると、PTA 染色液中に pH 調整のために含まれる KOH の粘性により、染色剤が不均一に乾燥すると考えられた。

そこで、PTA 濃度を 0.75 % にまで下げて KOH 含量を減少させた染色剤を用い、0.1 μM GroEL/0.1 μM GroES/1 mM ATP 反応溶液を試料にネガティブ染色したところ、遊離の GroES や、GroEL の 7 量体リング構造の各サブユニットが確認できるほど観察像は鮮明になった (Fig. 3c)。ここでは、GroEL:GroES = 1:1 の混合比のために、1 分子の GroEL に 1 分子の GroES が結合した弾丸型複合体が多く形成され、GroES が結合していない面がグリッドに接触した起立型が多く観察された。

一方、2.5 % GdAc によるネガティブ染色では、1 μM GroEL/2 μM GroES が観察できた (Fig. 4)。グリッド上の試料が過密であるため GroEL/GroES 複合体は起立型に見えるが、染色剤は均一に伸び広がっているように見えた。試料密度を希釈して用いれば、Fig. 3b に類似した、転倒状態の GroEL/GroES 複合体が観察されるだろう。

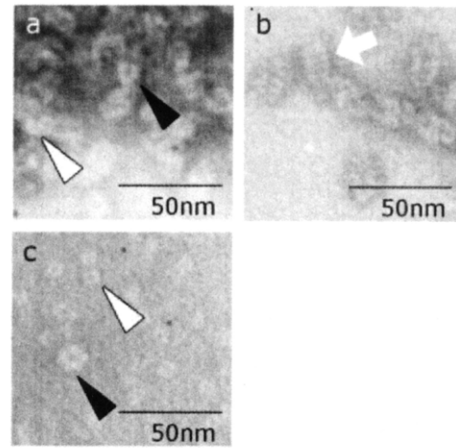


Fig. 3 GroEL/GroES 複合体の PTA 染色像

(a, b) 1 % PTA による GroEL/GroES 複合体の染色, (c) 0.75 % PTA による GroEL/GroES 複合体の染色。矢頭白: 遊離の GroES, 矢頭黒: GroEL/GroES 複合体 (起立状態), 矢印白: GroEL/GroES 複合体 (転倒状態) を示す。

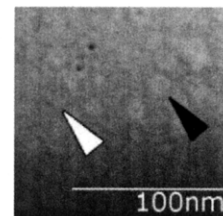


Fig. 4 GroEL/GroES 複合体の GdAc 染色像

2.5 % GdAc による染色。矢頭白: 遊離の GroES, 矢頭黒: GroEL/GroES 複合体 (起立状態) を示す。

4. 考察

ネガティブ染色法に用いられる酢酸ウラン、リンタングステン酸、リンモリブデン酸などは、組織切片観察用のポジティブ染色では酢酸鉛などを併用した二重染色にも用いられる。細菌類のネガティブ染色は手技次第でポジティブ染色されやすいが、*E. coli* は 1 % PTA (pH 4.0)、*T. thermophilus* は 2.5 % GdAc (pH 6.0 - 6.2) で、菌体の良好なネガティブ染色を実現した。*E. coli* が 2.5 % GdAc で溶菌したことは、浸透圧によるものと考えられる。GdAc は PTA に比べて電子密度が低いことから、今回は 2.5 % で使用したが、*E. coli* にはより薄い濃度で使用する必要があるだろう。一方、*T. thermophilus* では、2.5 % GdAc で PTA では観察できなかった菌体表面の凹凸が観察された。菌体の表面構造や成分の違いによって、PTA と GdAc を使い分けることで、良好な観察像を得ることができる。

サブミクロンサイズ、ナノサイズの生体分子となると、グリッド上での染色剤の伸び広がり、過剰な染色剤の除去のし易さなどによって観察像が大きく左右される。既存染色剤である PTA は、KOH によって pH 調整が容易で、沈殿を生じにくく、放射性がなく、ウイルスをポジティブ染色しない⁴などの利点から、酢酸ウランに次いで利用されている。今回試料に用いた GroEL/GroES 複合体は、ナノサイズのタンパク質分子であり、1 % PTA 染色で転倒したフットボール型複合体が観察でき、0.75 % PTA 染色では

GroEL 複合体のサブユニットや遊離の GroES 画像も鮮明に得られた。

1 μM GroEL/2 μM GroES/1 mM ATP の試料密度では、1 % PTA、2.5 % GdAc のどちらの染色剤でもほとんどすべての複合体が起立状態で観察された。これは、試料密度に応じて染色剤に厚みが出たことに因るが、GdAc の電子密度が PTA より低いために、同条件下で遊離の GroES が観察された点は評価できる。希釈試料は複合体を探すためにどうしても観察時間が延長され、電子線照射によるダメージ（試料ドリフトなど）が増大して適切な像が得られない場合があるが、染色剤に多少の厚みがあっても試料が観察できることから、簡便迅速な観察に GdAc は有効だろう。

GdAc の利点は、染色後のグリッド乾燥時にも現れる。PTA は染色剤の溜まりを残して乾燥する（これによって観察試料にコントラストとして輪郭を与える）のに対し、GdAc はそのように斑になることなくグリッド全体に伸び広がり、グリッド上からの染色剤の刷けも良く、PTA に比べて扱いやすい。また、室温での遮光保管により、少なくとも 1 年間は析出もなく、問題なく使用できた。

従来は、放射性のないネガティブ染色剤といえば、タングステンやモリブデンしかなかったが、ガドリニウムは簡易に取り扱える新規染色剤として十分機能的である。観察試料によっては、PTA にはない特性を利用することで、像を鮮明化することが可能だろう。

謝辞

本文に挙げた酢酸ガドリニウム溶液を、電子染色剤として製品開発中に提供していただき、試供品利用にも関わらず電子顕微鏡像の本文掲載を御了承いただいた日新 EM 株式会社に御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Sameshima T, Ueno T, Iizuka R, Ishii N, Terada N, Okabe K, Funatsu T. Football- and Bullet-shaped GroEL-GroES complexes coexist during the reaction cycle, *JBC* (2008), **283**, 23765
- [2] Koike-Takeshita A, Yoshida M, Taguchi H. Revisiting the GroEL-GroES Reaction Cycle via the Symmetric Intermediate Implied by Novel Aspects of the GroEL(D398A) Mutant, *JBC* (2008), **283**, 23774
- [3] Xu Z, Horwich AL, Sigler PB. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex, *Nature* (1997), **388**, 741
- [4] C.-S.Goldsmith and S.-E.Miller. Modern Uses of Electron Microscopy for Detection of Viruses, *CMR* (2009), **22**, 552