

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14499

研究課題名(和文)電子線励起の蛍光観察を水中にて実現し、がん細胞や微生物の微細解析を目指す研究

研究課題名(英文) Development of fluorescence labeling methods of proteins in cells and tissues for high-resolution correlated light-electron microscopy (CLEM) using Atmospheric scanning electron microscopy

研究代表者

佐藤 主税 (SATO, Chikara)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：00357146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：大気圧走査電子顕微鏡(ASEM)により、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡を駆使して相関観察することで、細胞の蛋白質の局在を自然な水環境中で可視化し、細胞や微生物の微細構造解析に向けた基盤構築を目指す。特に、電子線励起の蛍光顕微鏡による相関観察と、抗体ラベル系の開発に注力した。酸化亜鉛・タンパク質蛍光3種・qDot4種類に電子線照射し、CCD撮影した。EGFPとGFP等の蛍光タンパクでは蛍光観察できなかったが、ZnO粒子では数micro meter径の粒子が観察できた。qDotは4種共に凝集を形成し易く、電子線励起蛍光が弱かった。抗体ラベル系は、神経初代培養系とバイオフィルムなどを用いて開発した。

研究成果の概要(英文)：Proteins associate with other proteins and form protein complexes, localizing in a specific positions in cells and tissues for their functions. The correlative light-electron microscopy (CLEM) of a sample in liquid is highly required to determine their localization at high resolution. To realize electron microscopy in solution, environmental-capsule electron microscopy (EC-EM) has been developed. However, the limited space around the sample holder of standard TEM, preclude the simultaneous observation using OM with high resolution objective lens of large NA. We have developed atmospheric scanning electron microscopy (ASEM) with inverted SEM to allow the use of an open sample container sandwiched by OM and SEM. In this research, we have tested many fluorescent substances, including GFP, qDot and ZnO. Further the markers tested here should be exploited for the application to various biological fields including basic biology, medical research, agriculture, drug discovery and diagnosis.

研究分野：タンパク質のクライオ電子顕微鏡法開発と電顕・光顕相関同時観察法開発による細胞・組織のタンパク局在研究

キーワード：電子顕微鏡 バイオイメージング 電子線励起 光電子相関顕微鏡 転移性がん細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)電子顕微鏡は、電子線の波長のサブという短さから高い解像度を誇り精細な構造の観察を可能にする。しかし、サンプルは通常真空中に置かれるため、観察可能なものは通常の温度では脱水サンプルに限られる。このサンプル処理は、場合によっては細胞を歪ませる恐れがある。そのため、気体中・水中での観察を可能にする電子顕微鏡の開発が模索された。我々が開発した大気圧走査電子顕微鏡(ASEM)は3.5cm ディッシュがサンプルホルダーである。底には極めて薄い電子線透過膜が張っており、その上のサンプルの容易な電顕観察を実現した。一方、ノーベル賞を受賞した超解像度蛍光顕微鏡は、蛍光観察の解像度を改善したが背景蛍光が小さくしなければならぬなどの制約もあり、一般に解像度も光の波長から大きくは離れられない。

(2)我々は ASEM による解析及び同一サンプルの共焦点顕微鏡や超解像度蛍光顕微鏡による解析との比較から、神経シナプスの微細な構造解析、乳酸菌やマイコプラズマの水中での鮮明な形態観察、組織中のがん細胞の転移の検出と画像解析等を進めて来た。しかし、電顕である ASEM は複数標的の染め分けはできなかった。

一方、ASEM の電子線は蛍光も励起可能である。上部の光顕にて集光して出力を画像化すれば、通常の電顕並の解像度の蛍光像が期待され、標的の染め分けも実現できる。すなわち上記装置群それぞれの弱点が解消された顕微鏡と成り得、ASEM を用いた細胞内の微細構造解析が飛躍的に進むと見込まれる。これまで、従来の電子線染色法をアレンジしてサンプルを染め、撮影した ASEM 画像を解析して来た経緯において、ASEM のさらなる可能性を実感している。ASEM による電子線蛍光観察に必要な EM-CCD カメラを購入し、蛍光の検出を可能にしているが、実際の細胞観察までには更なる研究を要するため、本課題の提案に至った。

2. 研究の目的

本研究では、大気圧走査電子顕微鏡(ASEM)にて様々な蛍光の観察とラベル系の開発を行い、水中で細胞の生理機構・がん細胞や病原微生物の高分解能での微細構造解析を容易にすることを旨とする。

我々が新規に開発した大気圧走査電子顕微鏡(ASEM)は、3.5cm ディッシュ底面の SiN 薄膜上のサンプルの水中での観察が可能である。ラベル系を開発して、電子線に励起された蛍光の観察実現によって細胞内の微細構造やタンパク相互作用の解析が容易になると見込まれる。さらに、本手法を微生物やがん細胞へ適用することで疾病研究への幅広い応用を可能にする。

本研究を基に、次期の研究によって、観察

可能な蛍光種の増加や、臨床の病理解析への応用などの発展を見込む。

3. 研究の方法

(1)「a) 蛍光物質ごとの電子ビームに対する特性の解析」及び「b) 細胞などの抗体ラベル条件を検討しラベル系を開発することによる微細局在解析」を、並行して進める。

(2)前者 a) は Alexa, Q-dot 等の蛍光ビーズについて、EM-CCD を搭載した ASEM にて電子線による励起蛍光を観察し、電子線密度やビームごとの蛍光強度と退色を測定することで、物質ごとの最適条件を検討する。蛍光フィルターレベルで、蛍光の「色」も確認する。蛍光ビーズであれば、EM-CCD でもこの程度の調査は可能と期待している。

(3)後者 b) は培養神経細胞、微生物について、検疫ラベル法を開発し、現行の ASEM による微細解析を進める。それぞれについて、免疫染色による ASEM 電顕像及び従来の蛍光顕微鏡像の比較・相関解析を進め、電子線励起による効果的な観察対象や方法についても模索する。転移がん細胞を用いて、ASEM 観察に最適な細胞の前処理方法を検討し、マーカーとなる微細構造候補を検討し、その電子線による可視化方法を探る。

4. 研究成果

(1)大気圧走査電子顕微鏡(ASEM)は、下から電子線を走査し、同時に蛍光ラベルを上から光学照射と光学検出により観察できる。さらに、照射を電子線だけにすれば、励起された蛍光を観察できる。そのため、高効率で励起される蛍光物質を発見すれば、励起蛍光の観察も期待できる。酸化亜鉛・タンパク質蛍光3種・qDot4種類を CCD により撮影した。EGFP と GFP 等の蛍光タンパクでは蛍光観察できなかったが、ZnO 粒子では数 micro meter の粒子が観察できた。qDot は4種共にアグリゲーションを形成する傾向が出て、電子線励起蛍光が弱かった。

(2)次に、抗体ラベルする系を開発した。軸索区画化は脊髄等で観察され、脳の初期発生に重要と考えられている。神経初代培養細胞で糖鎖と微小管に対する免疫ラベリング条件を試行錯誤で決定して、軸索区画化を観察したところ、区画化には細胞骨格の特殊な構造と、異なる細胞骨格間での細胞輸送を媒介するタンパク質群の機能が重要であることを西原研究室との共同研究により見つけた。さらに、区画化が起こった時の抗原の蓄積は多角形状に起こることを発見し高分解能で観察した。結果は、scientific Reports に発表した。

(3)また、炎症性疾患を引き起こすアクネ菌で、アクネ菌バイオフィルムの細胞外構造を

支える微細構造を観察し、そこには DNA 繊維が含まれることを免疫ラベルで示した。バイオフィームは細菌集団を包み込み守るゼリーの様な構造であり、内側の細菌にはも抗体も抗生剤も効き難い。肺炎やリュウマチなど慢性疾患の原因でもある。心臓ペースメーカーから単離されたアクネ菌のバイオフィームを産総研が開発した大気圧走査電顕 ASEM で水中観察したところ、この観察が難しいバイオフィームが可視化された。抗 DNA 抗体を用いて免疫ラベルして観察することで、DNA 繊維が含まれることを示した。これら DNA は、バイオフィーム中で細胞死を起こした菌体に由来すると考えられ、アポトーシスの様な機構が想像される。結果は、Frontier in Microbiology 誌に発表された。本研究は、今後、バイオフィームが関係する感染症の治療法開発などに、貢献すると思われる。

(4)細菌の線毛が抗生物質耐性遺伝子を種を超えて伝搬する機構が知られている。この現象に關与する線毛を ASEM を用い観察した。突然の多剤耐性菌の世界的な拡散は、ドイツと近隣国での 2011 年の病原性大腸菌の集団感染の例にも見られる様に深刻な問題である。接合線毛(性線毛)による抗生剤耐性遺伝子の乗ったプラスミドの受け渡しが、伝搬における鍵の一つであるが観察が難しかった。ASEM により、この線毛は観察され、さらに複数種の性線毛の可視化に成功した。これらの結果は、Frontier in Microbiology 誌に出版した。将来、感染症対策に貢献すると思われる。

(5)単原子光源の He イオン顕微鏡によるバイオサンプル観察・免疫電顕法を確立し、2nm 分解能を得た。ヘリウムイオン顕微鏡は、一原子光源から出る極めて細いヘリウムイオンビームによるスキャンと、短い波長という高分解能に有利な面を合わせ持つ。しかし、これまでは、物性材料中心に應用が進められており、生物試料への適應は稀であった。金粒子標識抗体で細胞をラベルすることで、金ラベル間で測定して 2nm 分解能が得られることが示された。さらに、イオンビーム励起蛍光の観察にも成功した。本成果は、IJMM 誌に発表された。本顕微鏡法は、生物試料だけでなく、半導体など物性分野への広い應用が期待される。

今後、本検討で好成績だった蛍光粒子を基にさらなる探索を進め、タンパク質や様々の生体物質を本研究で開発した条件で高効率でラベルすることで組織・細胞・細菌の観察とそれらの生理機構の解明と疾病研究への應用を進めて行きたい。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 23 件)

K.Okuda, R.Nagahori, S.Yamada, S.Sugimoto, C.Sato, ...Y.Mizunoe. (9名 5番目) The Composition and Structure of Biofilms Developed by Propionibacterium acnes Isolated from Cardiac Pacemaker Devices. Front Microbiol, 査読有 ,9, 182(1-12), 2018, doi.org/10.3389/fmicb.2018.00182

M.Poidevin, M.Sato, I.Altinoglu, M.Delaplace, C.Sato, Y.Yamaichi. Mutation in ESBL Plasmid from Escherichia coli O104:H4 Leads Autoagglutination and Enhanced Plasmid Dissemination. Front Microbiol. 査読有 ,9,130 (1-11), 2018, doi.10.3389/fmicb.2018.00130

T.Kinoshita, C.Sato, T.J.Fuwa, S.Nishihara. Short stop mediates axonal compartmentalization of mucin-type core 1 glycans. Scientific Reports, 査読有 , 7, 41455, 2017, doi. 10.1038/srep41455

T.Yamazawa, N.Nakamura, M.Sato, C.Sato. Secretory glands and microvascular systems imaged in aqueous solution by atmospheric scanning electron microscopy (ASEM). Microsc Res Tech, 査読有 , 79(12), 1179-1187, 2016 doi.10.1002/jemt.22773

S.Sugimoto, K.Okuda, R.Miyakawa, M.Sato, K.Arita-Morioka, ...C.Sato. (10名 10番目)Imaging of bacterial multicellular behaviour in biofilms in liquid by atmospheric scanning electron microscopy. Sci Rep, 査読有 , 6:25889, 1-13, 2016 doi.10.1038/srep25889

T.Ogura, H.Nishiyama, M.Suga, C. Sato. Development of an in-solution observation method using atmospheric scanning electron microscopy (ASEM). Synthesiology, 査読有 , 8(4), 162-173, 2016 http://www.aist.go.jp/pdf/aist_e/synthesiology_e/vol8_no4/vol08_04_p162_p173.pdf

K.Itoh, Y.Akimoto, T.J.Fuwa, C.Sato, A.Komatsu, S.Nishihara. Mucin-type core 1 glycans regulate the localization of neuromuscular junctions and establishment of muscle cell architecture in Drosophila. Dev Biol, 査読有 , 412,114-127, 2016 doi.10.1016/j.ydbio.2016.01.032

T.Ochiishi, M.Do, K.Yamasaki, K.Hirose, ...T.Ebihara, H.Shimura. (10名 9番目)Development of new fusion proteins for visualizing amyloid-

oligomers in vivo. Sci Rep. 査読有,
16,6:22712,2016,
doi. 10.1038/srep22712.

〔学会発表〕(計 36 件)

佐藤 主税. 親水環境での電子顕微鏡観察:
クライオ透過電顕と大気圧走査電顕.
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集
会. 2018

佐藤 主税. 電子顕微鏡による親水環境
での観察: Cryo-TEM と ASEM. 第 13 回先
端表面技術展・会議. 2018.

佐藤 主税. Cryo-TEM と大気圧走査電顕
(ASEM)による親水環境での観察: タンパ
ク質・細胞・組織を中心として. 第 67
回 UV/EB 研究会. 2017

佐藤 主税. TEM と SEM による組織・細
胞・タンパク質の親水環境での観察. 第
37 回日本骨形態計測学会. 2017

C.Sato. Observation of tissues in
solution using atmospheric SEM:
Applicability for quick
intraoperative cancer diagnosis. 21th
World Congress on Advances in Oncology
and 19th International Symposium on
Molecular Medicine, 2016

佐藤主税. 電子顕微鏡による親水環境で
の組織・細胞・分子の構造観察. 第 58
回歯科基礎医学会学術大会. 2016

C. Sato. TEM and ASEM of Proteins and
Cells in Ice and Water. The 2nd
East-Asia Microscopy Conference
(EAMC-2), 2015

C.Sato. Observation of breast cancer
metastasis and symbiotic bacteria in
stomach mucosa immersed in aqueous
solution by atmospheric scanning
electron microscopy (ASEM). 20th
World Congress on Advances in Oncology
and 18th International Symposium on
Molecular Medicine, 2015

C. Sato. Wide Area Observation of
Fully Hydrophilic Tissue Achieved by
Sliding It on the Dish of the
Atmospheric Scanning Electron
Microscope (ASEM), M&M2015, 2015

T.Ebihara. The Atmospheric Scanning
Electron Microscope (ASEM) observes
the Cultured Fluorescent
Neuron, M&M2015, 2015

Mentily Nassirhadjy. Quick
Observation of Tissues in Solution by
Atmospheric Scanning Electron
Microscopy (ASEM), M&M2015, 2015

佐藤主税. 気圧電子顕微鏡 ASEM による
組織の水中迅速観察: 癌術中診断への応
用の可能性. 日本顕微鏡学会第 71 回学
術講演会. 2015

Tomoko Okada. Cadherin 17 plays an
important role in breast cancer

metastasis to bone marrow, アメリカ
癌学会, 2015

〔図書〕(計 2 件)

C.Sato, T.Kinoshita, N.Mentily,
M.Sato, S.Nishihara, T.Yamazawa,
S.Sugimoto. Correlative

lightelectron microscopy in liquid
using an inverted SEM (ASEM). Chapter
10 in "Correlative Light and Electron
Microscopy III", edited by Thomas
Muller-Reichert, Paul Verkade,
Elsevier, pp187-213, 2017

C.Sato, M.Suga. Observations in
Liquids using an Inverted SEM. Chapter
5 in "Liquid Cell Electron Microscopy",
edited by Frances Ross, University
Press, pp106-126, 2016
<https://doi.org/10.1017/97813163337455>

〔その他〕

ホームページ等

<http://staff.aist.go.jp/ti-sato/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 主税 (SATO, Chikara)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生
命工学領域・研究グループ長
研究者番号: 00357146

(2) 研究分担者

海老原 達彦 (EBIHARA, Tatsuhiko)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生
命工学領域・研究グループ付
研究者番号: 00344119

岡田 知子 (OKADA, Tomoko)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生
命工学領域・総括研究主幹
研究者番号: 30344146