

令和元年6月11日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15149

研究課題名(和文) 高速AFMを用いた筋組織の観察と解析

研究課題名(英文) Observation and analysis of muscle tissue by high-speed AFM

研究代表者

白倉 英治 (Usukura, Eiji)

名古屋大学・未来材料システム研究所・研究員

研究者番号：00643727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、高速AFMと徳安法を高速AFM観察向けに改良した手法を用いて骨格筋サルコメアと視細胞の観察に成功した。さらに、免疫細胞化学を併用することで、高速AFMと蛍光顕微鏡の相関観察の手法も確立できた。骨格筋のサルコメアの観察では、Mライン、Zディスクを確認することができた。加えて、ミオシンヘッドやMミオメシンと思われる分子も見ることができた。一方で、視細胞の観察では、外節と内節の特徴的構造を確認できた。また、ロドプシンに抗体染色をして蛍光顕微鏡を用いて、蛍光発色した領域を高速AFMで観察する相関観察を行った。興味深いことに、1次抗体と2次抗体の結合した構造物をAFM画像で見ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で行った徳安法と高速AFMを用いたサルコメアと視細胞の観察では、これまでに電子顕微鏡でしか踏み込めなかった組織切片の高分解能観察を実現できた。しかも、金属蒸着や高真空環境は必要とせず、生体分子本来の水環境条件下で観察を行えたことは重要である。そして、この観察手法は他の組織にも応用することができる。さらに、免疫細胞化学と組み合わせることで、高速AFMと蛍光顕微鏡の相関観察の可能性もしめすことができた。

研究成果の概要(英文)：We succeeded the observation of the sarcomere and the photoreceptor cell by the combination high speed AFM and Tokuyasu method improved for AFM. Moreover, the correlation observation between high speed AFM and fluorescence microscope was established by using immunocytochemistry.

In case of observation of sarcomere, M line and Z disk were confirmed clearly. Additionally, we thought that there were myosin head in the myosin filament and myomesin in the M line. On the other hand, specific structures of outer and inner segment were confirmed in case of photoreceptor cell. Furthermore, we tried to observe the rhodopsin with antibody staining for correlation between high speed AFM and fluorescence microscope. Interestingly, we detected many complexes by coupling a primary antibody and a secondary antibody on the outer segment.

研究分野：生物物理

キーワード：高速AFM 徳安法 組織 細胞 蛍光顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Atomic force microscopy(原子間力顕微鏡、AFM)はカンチレバーの先に結合した微細なプローブと試料の間に働く原子間力を指標としてこれが一定になるような距離を保ちつつ試料表面をなぞる。このため、光学顕微鏡と違い光の波長による分解能の制限を受けることはなく、数ナノメートルの分解能が期待できる。さらに電子顕微鏡のようにサンプルが真空環境である必要はなく空気中でも水中でも用いることが可能である。特に生物試料の場合、本来の生活環境である水環境中で観察することが重要であり、生物の持つ本来の形態や機能を明らかにするために必須である。特に近年はAFMのスキャンスピードと安定性が改良され、タンパク質の観察では安藤らの研究グループがアクチンフィラメントに沿ってミオシンV分子が移動している様子をリアルタイムで観察した研究結果(N. Kodera, et al., Nature, 2010, 468, 72-76)が注目を集めている。細胞レベルではエンドサイトーシスなど細胞表面で起こる現象を時間経過で観察した実験(M. Shibata et al., 2015, Sci Rep, 5, 8724)やアポトーシス(Kwon HK. et al., 2015, Sci Rep, 5, 15623)などの一つの細胞の形状時間変化を観察した実験などが報告されている。しかし、数ナノメートルの分解能を持つAFMならば細胞内骨格やオルガネラ、または組織の微細構造を観察することが期待できるが、上記に挙げた細胞観察はいずれも細胞表面のみを観察した例であり、組織に関しては筋原繊維を乾燥させた試料を観察した例しかなく、AFMで微細構造を見た報告はない

2. 研究の目的

本研究では高速スキャン型原子間力顕微鏡(Atomic force microscopy, AFM)による水溶液環境下で筋組織の観察と微細構造解析を行う。具体的には、試料はアフリカツメガエルの大腿筋から骨格筋の筋原繊維を徳安法によって厚さ数百nmの組織切片として取得する。その組織切片を高速AFMを用いて水溶液中で観察し、サルコメアを中心とした微細構造を分子レベルで明らかにする。以前に、同様の高速AFMを用いて溶液環境下で細胞内骨格を観察し、アクチンフィラメントの重合方向が判別できる程の分解能を達成しており、今回の組織観察においても分子レベルでの解析が可能であると見込んでいる。

3. 研究の方法

骨格筋はうさぎの腸腰筋から取得し、視細胞はマウスの目から取得した。これらの組織を取得する手法と組織切片を得る徳安法はどちらもすでに確立された技術である。取得した組織は2% glutaraldehydeで1時間以上固定を行う。固定後、メスで1cm角のブロックに切り分けて1.8-2.3Mのショ糖と polyvinylpyrrolidone(PVP)を混合したショ糖溶液に2時間以上浸透させる。ショ糖溶液を浸透させた後、凍結切削を行う。液体窒素を用いて試料の温度を-80~-120まで下げて凍結させ、試料をトリミングによって整形した後にダイヤモンドナイフで0.5 μ m以下の厚みの組織切片を切削する。組織切片はループに高濃度のショ糖水溶液をすくい、液体窒素で凍った状態にしたもので回収する。その後、スライドガラスに載せて常温で溶解し、PBS溶液を用いて数時間かけてショ糖溶液を組織切片から抜く。組織切片からショ糖などが抜けたら、AFMによる観察あるいは免疫染色を行う。

4. 研究成果

我々は、徳安法を高速AFM観察向けに改良した手法を用いて骨格筋サルコメアを観察することに成功した。また、別組織の視細胞も同様の手法で観察することができた。さらに、蛍光顕微鏡と抗体染色を併用することで、高速AFMと蛍光顕微鏡の相関観察の手法も確立できた。

(1) 図1のように、骨格筋のサルコメアの観察では、Aバンド、Iバンドの区切りをはっきりと確認できた。また、Mライン、Zディスクの構造も確認することができた。アクチンフィラメントやミオシン

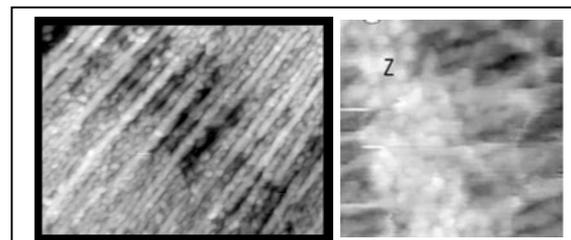


図1、(左)骨格筋サルコメアと(右)ZディスクのAFM画像。Mラインと構成分子が見えている。また、ミオシンフィラメントから出ているミオシンヘッドも確認できる。Zディスクではそこから伸びているフィラメントが一本ずつ視認できる。

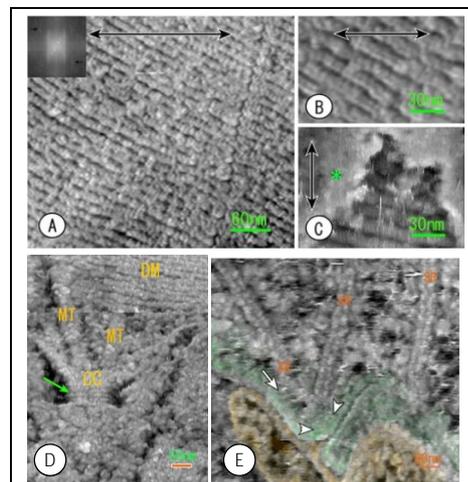


図2、視細胞の外節(A~C) 外節と内節の結合部分(D)、シナプスリボン(E)のAFM画像。

フィラメントも一本ずつ識別できる分解能で捉えている。加えて、ミオシンフィラメントから出ているミオシンヘッドやMラインを構成している3本線、その一つのみオメシンと思われる分子も見ることができた。

(2) 視細胞の観察では、図2のような外節のディスク、外節と内節の間の結合部分にあるマイクロチューブ、視細胞終末に存在するシナプスリボンの構造を確認できた。こうした構造はこれまでに電子顕微鏡でしか観察できなかったが、金属蒸着や高真空環境を必要としない、かつ水環境下で観察できたことは、今後の組織観察に高速AFMも選択肢として十分に挙げられる。

(3) 外節のロドプシンに抗体染色を施して蛍光顕微鏡で観察を行い、図3のように蛍光発色している領域を高速AFMで観察する相関観察を行った。興味深いことに、高速AFMでは1次抗体と2次抗体の結合した構造物を見ることができた。この実験によって高速AFMと蛍光顕微鏡の相関観察の手法を確立することができた。

引用文献

Usukura E, et al., Scientific reports, 7(1) 6462, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Usukura E, Narita A, Yagi A, Sakai N, Uekusa Y, Imaoka Y, Ito S, Usukura J
A Cryosectioning Technique for the Observation of Intracellular Structures and Immunocytochemistry of Tissues in Atomic Force Microscopy (AFM).
Scientific reports、査読あり、7(1) 6462、2017年
DOI : <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06942-1>

〔学会発表〕(計4件)

白倉 英治、AFM細胞生物学の最先端、live cell imagingから免疫細胞化学まで
〔招待有り〕、第124回日本解剖学会、2019年

白倉 英治、Cutting Edge of Atomic Force Microscopy (AFM) of the Cell: Live Cell imaging and Structure Analysis of Cytoskeletal Actin Filaments at High Resolution、
19th International Microscopy Congress、2018年

白倉 英治、A new approach for the direct visualization of the membrane cytoskeleton in cryo-electron microscopy: a comparative study with freeze-etching electron microscopy [招待有り]、2018年日本顕微鏡学、2018年

白倉 英治、A Cryosectioning Technique for the Observation of Intracellular Structures and Immunocytochemistry of Tissues in Atomic Force Microscopy.
2017 ASCB Annual Meeting、2017年12月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

Researchmap

https://researchmap.jp/uj_re_iibcb/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

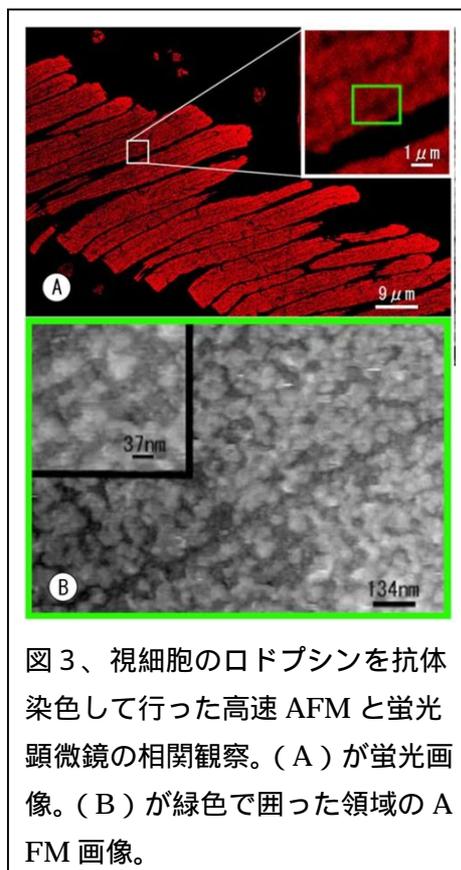


図3、視細胞のロドプシンを抗体染色して行った高速AFMと蛍光顕微鏡の相関観察。(A)が蛍光画像。(B)が緑色で囲った領域のAFM画像。

特になし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：臼倉 治郎

ローマ字氏名：Usukura Jiro

研究協力者氏名：成田 哲博

ローマ字氏名：Narita Akihiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。