

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2017～2019  
 課題番号：17K07477  
 研究課題名(和文) 高圧凍結技法と相関アレイトモグラフィーで植物細胞内膜系の3次元超微形態を捉える  
  
 研究課題名(英文) 3D ultrastructural analysis of plant endomembrane with high pressure freezing and correlative array tomography  
  
 研究代表者  
 豊岡 公德 (Toyooka, Kiminori)  
  
 国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級技師  
  
 研究者番号：10360596  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高圧凍結技(HPF)法と光電子相関顕微鏡(CLEM)法を組み合わせた蛍光タンパク質(FP)標識オルガネラの超微形態観察法の開発を進め、植物の組織・細胞における細胞内膜系をアレイトモグラフィー(AT)法で、FP標識した細胞内膜系の微細構造を特定することを目的とした。その結果、化学固定した樹脂包埋切片中のFP標識細胞小器官を退色防止剤で蛍光回復するCLEM法を開発し、最新HPF装置で植物に適したHFP法を確立した。超薄切片を用いて高感度共焦点顕微鏡とAT搭載走査電顕と組み合わせるCLEM法を技術検討し、固定・樹脂耐性FP標識を用いることで細胞内膜系オルガネラの微細構造を捉える可能性を得た。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

CLEM法及び凍結技法は組織・細胞内の蛍光標識した超微細構造を限りなく生きた状態で可視化する技術として、これからの研究に重要である。本研究により、これら技術を発展させた。電顕メーカーとともにCLEMシステムを改良するとともに、蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡で試料中の蛍光を効率よく感度良く検出し、電顕で観察するために微細構造を保持する試料調製を開発した。また、最新の高圧凍結装置を用いて生物の超微形態を保持する試料調製法を確立した。これらの技術は、植物だけでなく動物や微生物など幅広い基礎研究及び応用研究に活用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to develop an ultrastructural observation for fluorescent proteins (FP)-labeled organelles by combining high-pressure freeze technique (HPF) and correlative light & electron microscopy (CLEM), and to identify the ultrastructure of FP-labeled intracellular membrane systems by array tomography (AT). As obtained results, we developed the CLEM method, which recovers the fluorescence of FP-labeled organelles in chemically fixed resin-embedded sections using antifade reagents, and established the HFP method suitable for plants by using the latest HPF equipment. The CLEM method, which combines a high-sensitivity confocal laser scanning microscope and an AT-equipped scanning electron microscope using ultra-thin sections, has been studied and the possibility of capturing the microstructure of intracellular membrane organelles has been obtained by using a fixed-resin-resistant FPs.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：高圧凍結技法 エンドソーム アレイトモグラフィー 光電子相関顕微鏡 CLEM 電子顕微鏡 植物細胞オルガネラ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 植物細胞は光学顕微鏡では一見どれも同じように観えるが、透過電子顕微鏡(TEM)で観ると組織・細胞ごとにオルガネラの形態は多様かつ複雑で、ひとつとして同じものはない。近年、トランスクリプトームなど網羅的な遺伝子解析により機能未知な多数の遺伝子が見出され、その機能を明らかにするために、目的遺伝子に蛍光タンパク質をつなげ蛍光ライブイメージングや蛍光色素、阻害剤を用いた解析により、その分子の細胞内局在や動態を容易に観察できるようになった。これにより、植物細胞内の細胞内膜系関連分子が見出され、ER ボディ、ゴルジ体、トランスゴルジ網(TGN)、分泌小胞クラスター(SVC)、エンドソーム、多胞体(MVB)、液胞前区画など様々な細胞内膜系の存在が明らかとなった。しかし、蛍光タンパク質が局在する細胞内膜系、特に構造変化に富むエンドソームや液胞前区画など細胞内膜系の超微形態は明らかでない。

(2) 我々はこれまで、TEM 観察を中心とした形態学的手法により、タンパク質の細胞内輸送機構と分解機構について研究してきた。高圧凍結/凍結置換法(HPF/FS)を取入れた TEM 解析と蛍光イメージング解析を行い、電顕解析でないと捉えることのできない現象を見出してきたが、超微形態像だけの組織・細胞・オルガネラの特定には限界があり、遺伝子発現と超微形態をつなぐ解析技術の開発が必要であった。我々は最新の電界放出型走査電子顕微鏡(Field-Emission SEM: FE-SEM)と蛍光イメージング技術を組み合わせた光電子相関顕微鏡法(Correlative light-electron microscopy: CLEM)の開発を進め、一部のオルガネラの超微形態の CLEM 解析に成功するとともに、同一試料を迅速かつ正確に CLEM 観察可能な“MirrorCLEM システム”を日立ハイテック社と共同で開発し、製品をリリースした。ただし、植物は動物細胞より何倍も速い原形質流動があり、深層組織にある細胞内膜系を捉えるためには、HPF/FS 法により瞬時に固定し、切片として組織を形態観察する必要があり、HPF/FS と CLEM を組み合わせた解析法(HPF/FS-CLEM)の開発が必要であった。さらに平面では形態を把握しきれないため、CLEM を組合せた連続切片走査電子顕微鏡法(相関アレイトモグラフィー)で3次的に解析する必要があった。

### 2. 研究の目的

本研究では形質転換シロイヌナズナを用いて、以下の項目を研究開発し、現象を明らかにすることを目的とした。

(1) 植物の細胞内膜系の超微形態を捉えるために、植物組織に適した HPF/FS-CLEM の開発・改良を行う。

(2) 各器官・組織における蛍光タンパク質標識した細胞内膜系、特にエンドソームの超微形態を特定する。

(3) さらに相関アレイトモグラフィーにより細胞内膜系の3次元超微形態を明らかにする。

具体的には、TGN や SVC、エンドソームを蛍光タンパク質標識したシロイヌナズナ形質転換体の芽生えを用いて、高圧凍結装置により凍結・凍結置換後、樹脂に包埋する。ウルトラミクロトームにより超薄切片を作製しカバーガラスに載せ、共焦点レーザー顕微鏡(LSM)により、蛍光像を取得する。その後、電子染色を行い、MirrorCLEM を搭載した FE-SEM で蛍光を放つ部分の電顕像を取得することで、分子が局在する同一箇所超微形態を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 化学固定または HPF/FS 固定した樹脂包埋試料の効率的な蛍光検出法

通常の化学固定で良好な結果を得ている ER ボディ GFP 及びペルオキシソーム GFP 強発現株の芽生え(発芽 7-10 日の根、葉)を用いて、試料を HPF 用試料キャリアーに入れ、Leica EM PACT (2018 年以降は Leica EM ICE)を用いて、2100bar の加圧下、液体窒素で瞬時に凍結し、グルタルアルデヒドを入れたアセトン溶液中で-80 度から常温まで凍結置換(FS)した(佐藤ほか 2018)。LR-White 樹脂に 55℃ で熱重合包埋し、出るだけ早く準超薄切片を作製した。ダイヤモンドナイフを用いてウルトラミクロトーム(Leica EM UC7)にて準超薄切片を作製し、カバーガラスに貼付け、LSM(Zeiss LSM700)を用いて蛍光撮影を行った(豊岡、Plant Morph. 2016)。その際、何種類かの退色防止剤などに切片をマウントし、蛍光を確認した。H30 年度からは、新たに導入した高感度検出器を搭載した共焦点レーザー顕微鏡 Zeiss LSM880 Airyscan および Leica TCS SP8 WLL を用いて、さらに薄い切片 100-200nm 厚の切片からの蛍光検出を検討した。

(2) 細胞内膜系オルガネラの CLEM 解析

申請者らは LSM で撮影した部位と同一箇所を FE-SEM で撮影し、正確かつ容易に画像が重ね合わせることができる CLEM 解析システム MirrorCLEM を開発した。LSM で低倍から高倍率の蛍光像を撮影し、MirrorCLEM を用いて、1 枚の光顕像マップを作成した。一方、蛍光を撮像した切片は、退色防止剤を洗い流したあと、酢酸ウラニルおよび鉛溶液で電子染色を行った。その後、オスミウムコーター(真空デバイス HPC-1SW)を用いて、オスミウムコートした。MirrorCLEM 専用治具にこのスライドガラスをセットし、光顕像マップと 3 点アライメントを行い、日立ハイテック FE-SEM SU8220 を用いて相関像を撮影した。このシステムを用いて、化学固定、または、HPF/FS 固定した形質転換体シロイヌナズナの準超薄切片(200-500nm)とその蛍光像を相関解析することで、蛍光を放つドットの超微形態を調べた。また、超薄切片を透過電顕(TEM)用グリッドに載せ、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光を撮像後、同グリッドを電子染色して TEM(日立ハイテック HT7800)に搭載した MirrorCLEM で相関像を撮影した。

### (3) 相関アレイトモグラフィー法を組み合わせた 3次元再構築

蛍光像と電顕像を 3次元で重ね合わせるために、蛍光タンパク質標識したオルガネラを持つシロイヌナズナ芽生えの葉または根をホルムアルデヒド・グルタルアルデヒドで固定し、共焦点レーザー顕微鏡 Leica TCS SP8 WLL で連続断面像を撮像し、3次元構築した。電顕像の 3次元再構築は、樹脂包埋ブロックをカバーガラスまたはスライドガラスに連続切片を載せ、FE-SEM (日立ハイテク SU 8220) を用いて、切片の同一箇所を数十枚手動で撮像した。その電顕写真を画像解析ソフトの Image-Pro Premier 3D (Media Cybernetics 社) を用いて、アライメントを行い、セグメンテーションを行い、3次元再構築を行った。令和 2 年度後半では、日立ハイテク SU8240 に搭載された連続切片撮像システムを用いて、同一箇所を自動撮影する方法を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 化学固定または HPF/FS 固定した樹脂包埋試料の効率的な蛍光検出法

#### 化学固定 CLEM 法の開発・改良

グルタルアルデヒドなど固定剤・包埋樹脂の自家蛍光を抑え、かつ、蛍光タンパク質の蛍光を残したまま、電顕観察に支障のない程度に微細構造を保って固定・脱水・包埋することが効率的に蛍光を検出するために重要である。我々は GFP によりラベルしたペルオキシソームと ER ボディが観察可能なシロイヌナズナ形質転換体を用いて、通常の化学固定による樹脂包埋切片観察で良好な結果を得ている。その際、アルカリ溶液で切片を処理することにより GFP 蛍光が復帰すること (Xiong et al., Nature Communication 2014) を確かめているが、化学固定した樹脂包埋切片中の FP 標識細胞小器官を退色防止剤でアルカリ溶液より容易に蛍光回復することで蛍光/電顕観察する CLEM 法を見出していた。退色防止剤 Slowfade (Thermo fisher 社) や GFP/RFP Booster (Chromotek 社) など試薬を用いて蛍光強度を強めて観察した。6 種類の退色防止剤を試した結果、ナカライテスク Fluoro keeper や Thermo Fisher の Slowfad など蛍光復帰に高い効果があった。様々な蛍光タンパク質標識形質転換植物を試してみた結果、一部のものは良く保たれ、効果がないものもあった。容易で簡便あることから、試す効果は高いと思われる。これらの成果は、アメリカ顕微鏡学会 (M&M)、国際顕微鏡会議 (IMC19) や日本顕微鏡学会などで発表するとともに、国際誌に掲載された (Toyooka and Narikawa, Microscopy 2019)。

SEM 観察の際に、アクリル系樹脂は電子線による樹脂切片の収縮の可能性があるため、電子線に強いエポキシ系の樹脂で GFP 蛍光や形態の保存に優れた樹脂を探し出すことも検討した。日新 EM 社より、pH が中性に近い開発中のエポキシ樹脂を分与頂き、蛍光タンパク質の蛍光が維持されるか、検討した。その結果、形態は保持できたが、蛍光は維持することができなかった。

#### HPF/FS 固定 CLEM 法の開発・改良

当初、HPF 固定に用いていた高圧凍結装置 Leica EM-PACT が故障し、10 年以上前に購入した機器のため、修理が不可能であったため、最新の高圧凍結装置 Leica EM ICE を導入した。以前と凍結形式が少し異なる HPF 装置出会ったため、試料の加工法や溶媒など植物に適した HPF 法を検討し、良好な超微細形態を保持する試料調製法を確立した。これらの方法をまとめた総説は、日本植物形態学会の和文誌 Plant Morphology に掲載された (佐藤ほか, 2019)。

予備実験で、HPF/FS を行い樹脂包埋すると蛍光が消失する結果となっていた。そこで、グルタルアルデヒド-アセトン中に 2% 水を加え、LR-white 包埋し、ダイヤモンドナイフを用いてウルトラマイクロトームにより 500nm の準超薄切片を作製し、カバーガラスに貼付け、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光撮影を行った。その結果、ER Body-GFP と Pe-GFP は HPF-CLEM は蛍光が保たれることがわかった。

#### CLEM システムの開発・改良

日立ハイテク社とともに、光顕で撮影した部位と同一箇所を FE-SEM で撮影し、正確かつ容易に画像が重ね合わせることができる CLEM 解析システム MirrorCLEM の改良を進め、ソフトウェアのグラフィックユーザーインターフェイスを改良し、利便性を向上させた。さらに TEM でも CLEM 可能な MirrorCLEM システムを開発・上市した。100-200nm の超薄切片を TEM 用グリッドに載せ、共焦点レーザー顕微鏡等で撮像後、MirrorCLEM で Hitachi HT7800 等の TEM を制御することで、光顕と電顕の同一箇所を高分解能で撮像できるようにした (豊岡, Hitachi SI News 2020)。

### (2) 細胞内膜系オルガネラの CLEM 解析

筆者らが作製した SCAMP2-YFP や SYP41-YFP 形質転換体シロイヌナズナを用いて、樹脂包埋しても細胞内膜系の蛍光が再検出できるような条件を検討した。しかしながら、消失した蛍光は退色防止剤で復帰しなかった。そこで、GFP は低 pH で蛍光が消失しやすいため、低 pH に強い赤色蛍光タンパク質 RFP で標識したエンドソーム (ARA6-RFP) および TGN (VAMP721-RFP) 形質転換体シロイヌナズナを用いて検討するとともに、RFP 結合 SCAMP2 形質転換体作製し、分泌に関与する小胞塊の可視化を進めた。RFP 結合 SCAMP2 形質転換タバコ培養細胞を用いて、分泌に関与する小胞塊の CLEM 解析を進めた。

通常の化学固定で良好な CLEM の結果を得ている ER ボディ GFP 及びペルオキシソーム GFP 発

現株、エンドメンブレン系分子の SCAMP2-YFP や ARA6-RFP 形質転換体シロイヌナズナの芽生えを用いて、高圧凍結固定・凍結置換を行った。しかし、化学固定で蛍光が保つことができない蛍光タンパク質標識オルガネラは、高圧凍結でもできないこともわかった。そこで、赤色蛍光タンパク質 RFP で標識したゴルジ体やエンドソームなどのエンドソーム系のコンストラクト作製および形質転換体の作製を進めた。ネイティブプロモーター下で発現するシロイヌナズナ形質転換体を作製し、安定に発現する 3 世代までの株を得た。この株を用いて、高圧凍結し CLEM するための条件検討を進めた。一方、RFP 結合 SCAMP2 形質転換タバコ培養細胞を用いて、分泌に関する小胞塊の CLEM 解析を進めたが、高圧凍結固定の前に通常の化学固定で CLEM を行なったが蛍光は保存できなかった。本助成が終わる頃にオスミウム固定およびエポキシ樹脂に耐性を持つ緑色蛍光タンパク質 mEOS-EM が Nature Method に掲載され、赤色蛍光タンパク質が和光純薬から販売された。これらの蛍光タンパク質のプラスミドを入手し、現在、SCAMP 等のエンドソーム系オルガネラのマーカータンパク質に結合させたシロイヌナズナ形質転換体作製を進めている。

### (3) 相関アレイトモグラフィ法を組み合わせた 3 次元再構築

電顕像の 3 次元再構築は、樹脂包埋ブロックをカバーガラスまたはスライドガラスに連続切片を載せ、電子染色およびオスミウムコーティング後、FE-SEM (日立ハイテク SU 8220) を用いて、切片の同一箇所を数十枚手で撮像した。また、広域撮像システムを用いて、高倍率で数百枚電顕像を撮像する方法を検討した。ヒストダイヤモンドナイフを用いて、1~2mm 角の樹脂切片を作製し、電子染色およびオスミウムコーティング後、FE-SEM に搭載された広域撮像システム Zigzag を用いて撮影し、つなぎ合わせた。シロイヌナズナ茎頂および根端の連続切片を用いた同一箇所の撮影および広域撮像に成功した。これらの結果は日本顕微鏡学会の和文誌に総説をまとめ発表する(豊岡ほか, 顕微鏡 2020)とともに、日本植物形態学会の和文誌 Plant Morphology に掲載された(豊岡ほか, 印刷中)。その電顕写真を画像解析ソフトの Image-Pro Premier 3D (Media Cybernetics 社)を用いて、アライメントを行い、セグメンテーションを行い、3 次元再構築を行い、良好な結果を得られた。令和 2 年度後半では、日立ハイテク SU8240 に搭載された連続切片自動撮像システム ACAT を用いて、同一箇所を自動撮影する方法を試し、葉緑体の 3D 撮像および 3 次元立体構築に成功している。

蛍光像を減衰させずに撮像するには前固定直後に撮像して電顕像を 3 次元で重ね合わせる方が蛍光を保てる。そこで、蛍光タンパク質標識したオルガネラを持つシロイヌナズナ芽生えの葉または根をホルムアルデヒド・グルタルアルデヒドで固定し、共焦点レーザー顕微鏡で連続断面像を撮像し、3 次元構築する方法を検討した。前固定した試料を英数字グリッドがプリントされたカバーガラス上のアガロースゲルに包埋し、Leica TCS SP8 で 3 次元撮影後、オスミウム固定・脱水を行い、エポキシ樹脂に包埋した。そして、超薄切片を作製して位置合わせを行おうとしたが、XY 方向には位置合わせは可能であったが、Z 方向への位置合わせが困難を極めた。この結果から、連続切片から蛍光を検出した後、FE-SEM で微細構造を撮像し、重ね合わせて 3 次元再構築する方法がベストであることがわかった。引き続き、SCAMP2 や ARA6 などエンドソームに局在するタンパク質にオスミウム固定およびエポキシ樹脂に耐性を持つ緑色蛍光タンパク質 mEOS-EM を持つシロイヌナズナ形質転換体を作製し、ホルムアルデヒド・グルタルアルデヒドで前固定、オスミウムで後固定後に、エポキシ包埋する。この樹脂ブロックから連続切片を作製し、高感度共焦点レーザー顕微鏡で蛍光を撮像後、電子染色して FE-SEM の連続切片自動撮像システムで撮像する。そして、3 次元的に重ね合わせる相関アレイトモグラフィ法で MVB や TGN などのエンドソームの微細構造を捉えていく予定である。

### <引用文献>

- 豊岡公徳 : *Plant Morph.*, **28**, 15-21 (2016)
- Toyooka K., Shinozaki-Narikawa N.: *Microscopy*, **68**, 417-421 (2019)
- 佐藤繭子, 若崎真由美, 後藤友美, 豊岡公徳 : *Plant Morph.*, **31**, 25-29 (2019)
- 豊岡公徳, *Hitachi Scientific Instrument News*, **63**, 5533-5538 (2020)
- 豊岡公徳, 若崎真由美, 宮彩子, 佐藤繭子: *顕微鏡*, **55**, 7-12 (2020)
- 豊岡公徳, 若崎真由美, 武田紀子, 佐藤繭子 : *Plant Morph.* (印刷中)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計27件（うち査読付論文 26件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 16件）

1. 著者名 Kusano Miyako, Fukushima Atsushi, Tabuchi-Kobayashi Mayumi, Funayama Kazuhiro, Kojima Soichi, Maruyama Kyonoshin, Yamamoto Yoshiharu Y., Nishizawa Tomoko, Kobayashi Makoto, Wakazaki Mayumi, Sato Mayuko, Toyooka Kiminori, Osanai-Kondo Kumiko, Utsumi Yoshinori, Seki Motoaki, Fukai Chihaya, Saito Kazuki, Yamaya Tomoyuki	4. 巻 182
2. 論文標題 Cytosolic GLUTAMINE SYNTHETASE1;1 Modulates Metabolism and Chloroplast Development in Roots	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1894 ~ 1909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1104/pp.19.01118">https://doi.org/10.1104/pp.19.01118</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koga Hiroyuki, Doi Yuki, Hashimoto Kei, Toyooka Kiminori, Tsukaya Hirokazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Dimorphic Leaf Development of the Aquatic Plant <i>Callitriche palustris</i> L. Through Differential Cell Division and Expansion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.00269	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kashimoto Tomonori, Miyake Keita, Sato Mayuko, Maeda Kaisei, Matsumoto Chikahiro, Ikeuchi Masahiko, Toyooka Kiminori, Watanabe Satoru, Kanesaki Yu, Narikawa Rei	4. 巻 20
2. 論文標題 Acclimation process of the chlorophyll <i>d</i> -bearing cyanobacterium <i>Acaryochloris marina</i> to an orange light environment revealed by transcriptomic analysis and electron microscopic observation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 2953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2019.11.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakabayashi Ryo, Mori Tetsuya, Takeda Noriko, Toyooka Kiminori, Sudo Hiroshi, Tsugawa Hiroshi, Saito Kazuki	4. 巻 92
2. 論文標題 Metabolomics with <sup>15</sup> N Labeling for Characterizing Missing Monoterpene Indole Alkaloids in Plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 5670-5675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b03860	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugai Koreyuki, Inoue Hiroshi, Inoue Chie, Sato Mayuko, Wakazaki Mayumi, Kobayashi Kappei, Nishiguchi Masamichi, Toyooka Kiminori, Yamaoka Naoto, Yaeno Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 High Humidity Causes Abnormalities in the Process of Appressorial Formation of <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 45 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens9010045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato Shota, Ozasa Kazunari, Maeda Mizuo, Tanno Yuri, Tamaki Shun, Higuchi Takeuchi Mieko, Numata Keiji, Kodama Yutaka, Sato Mayuko, Toyooka Kiminori, Shinomura Tomoko	4. 巻 101
2. 論文標題 Carotenoids in the eyespot apparatus are required for triggering phototaxis in <i>Euglena gracilis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1091 ~ 1102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toyooka Kiminori, Shinozaki-Narikawa Naeko	4. 巻 68
2. 論文標題 Efficient fluorescence recovery using antifade reagents in correlative light and electron microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 417 ~ 421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfz029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito-Inaba Yasuko, Sato Mayuko, Sato Mitsuhiro P., Kurayama Yuya, Yamamoto Haruna, Ohata Mizuki, Ogura Yoshitoshi, Hayashi Tetsuya, Toyooka Kiminori, Inaba Takehito	4. 巻 180
2. 論文標題 Alternative Oxidase Capacity of Mitochondria in Microsporophylls May Function in Cycad Thermogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 743 ~ 756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.19.00150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Usui Keiko, Kadono Nanako, Furuichi Yuki, Shiraga Keiichiro, Saitou Takashi, Kawasaki Hiroshi, Toyooka Kiminori, Tamura Hiroomi, Kubo Akiharu, Amagai Masayuki, Matsui Takeshi	4. 巻 94
2. 論文標題 3D in vivo imaging of the keratin filament network in the mouse stratum granulosum reveals profilaggrin-dependent regulation of keratin bundling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 346 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2019.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugiyama Yuki, Nagashima Yoshinobu, Wakazaki Mayumi, Sato Mayuko, Toyooka Kiminori, Fukuda Hiroo, Oda Yoshihisa	4. 巻 10
2. 論文標題 A Rho-actin signaling pathway shapes cell wall boundaries in Arabidopsis xylem vessels	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 08396-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08396-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Naramoto Satoshi, Jones Victor Arnold Shivas, Trozzi Nicola, Sato Mayuko, Toyooka Kiminori, Shimamura Masaki, Ishida Sakiko, Nishitani Kazuhiko, Ishizaki Kimitsune, Nishihama Ryuichi, Kohchi Takayuki, Dolan Liam, Kyozyuka Junko	4. 巻 17
2. 論文標題 A conserved regulatory mechanism mediates the convergent evolution of plant shoot lateral organs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3000560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3000560	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiwatashi Takuma, Goh Honzhen, Yasui Yukiko, Koh Li Quan, Takami Hideyuki, Kajikawa Masataka, Kirita Hiroyuki, Kanazawa Takehiko, Minamino Naoki, Togawa Taisuke, Sato Mayuko, Wakazaki Mayumi, Yamaguchi Katsushi, Shigenobu Shuji, Fukaki Hidehiro, Mimura Tetsuro, Toyooka Kiminori, Sawa Shinichiro, ..., Ishizaki Kimitsune	4. 巻 29
2. 論文標題 The RopGEF KARAPPO Is Essential for the Initiation of Vegetative Reproduction in Marchantia polymorpha	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3525 ~ 3531.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2019.08.071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakata Miyuki T., Sato Mayuko, Wakazaki Mayumi, Sato Nozomi, Kojima Koji, Sekine Akihiko, Nakamura Shiori, Shikanai Toshiharu, Toyooka Kiminori, Tsukaya Hirokazu, Horiguchi Gorou	4. 巻 7
2. 論文標題 Plastid translation is essential for lateral root stem cell patterning in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 28175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.028175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hamada Takahiro, Yako Mako, Minegishi Marina, Sato Mayuko, Kamei Yasuhiro, Yanagawa Yuki, Toyooka Kiminori, Watanabe Yuichiro, Hara-Nishimura Ikuko	4. 巻 131
2. 論文標題 Stress granule formation is induced by a threshold temperature rather than a temperature difference in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 216051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.216051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Cui Yong, Cao Wenhan, He Yilin, Zhao Qiong, Wakazaki Mayumi, Zhuang Xiaohong, Gao Jiayang, Zeng Yonglun, Gao Caiji, Ding Yu, Wong Hiu Yan, Wong Wing Shing, Lam Ham Karen, Wang Pengfei, Ueda Takashi, Rojas-Pierce Marcela, Toyooka Kiminori, Kang Byung-Ho, Jiang Liwen	4. 巻 5
2. 論文標題 A whole-cell electron tomography model of vacuole biogenesis in <i>Arabidopsis</i> root cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 95 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-018-0328-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitagawa Munenori, Tomoi Takumi, Fukushima Tomoki, Sakata Yoichi, Sato Mayuko, Toyooka Kiminori, Fujita Tomomichi, Sakakibara Hitoshi	4. 巻 60
2. 論文標題 Abscisic Acid Acts as a Regulator of Molecular Trafficking through Plasmodesmata in the Moss <i>Physcomitrella patens</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 738 ~ 751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -



1. 著者名 Sugiyama Yuki, Nagashima Yoshinobu, Wakazaki Mayumi, Sato Mayuko, Toyooka Kiminori, Fukuda Hiroo, Oda Yoshihisa	4. 巻 10
2. 論文標題 A Rho-actin signaling pathway shapes cell wall boundaries in Arabidopsis xylem vessels	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 08396-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08396-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakabayashi Ryo, Hashimoto Kei, Toyooka Kiminori, Saito Kazuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Keeping the shape of plant tissue for visualizing metabolite features in segmentation and correlation analysis of imaging mass spectrometry in Asparagus officinalis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Metabolomics	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11306-019-1486-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugiyama Y, Wakazaki M, Toyooka K, Fukuda H, Oda Y	4. 巻 27
2. 論文標題 A novel plasma membrane-anchored protein regulates xylem cell-wall deposition through microtubule-dependent lateral inhibition of Rho GTPase domains	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 2522-2528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.059">https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.059</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Atarashi K, Suda W, Luo C, Kawaguchi T, Motoo I, Narushima S, Kiguchi Y, Yasuma K, Watanabe E, Tanoue T, Thaiss CA, Sato M, Toyooka K, Said HS, Yamagami H, Rice SA, Gevers D, Johnson RC, Segre JA, Chen K, Kolls JK, Elinav E, Morita H, Xavier RJ, Hattori M, Honda K.	4. 巻 358
2. 論文標題 Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation" Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammationx	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 359-365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aan4526	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Itouga M, Hayatsu M, Sato M, Tsuboi Y, Kato Y, Toyooka K, Suzuki S, Nakatsuka S, Kawakami S, Kikuchi J, Sakakibara H	4. 巻 12
2. 論文標題 Protonema of the moss <i>Funaria hygrometrica</i> can function as a lead (Pb) adsorbent	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0189726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0189726	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Li W, Nguyen KH, Chu HD, Ha CV, Watanabe Y, Osakabe Y, Leyva-Gonzalez MA, Sato M, Toyooka K, Voges L, Tanaka M, Mostofa MG, Seki M, Seo M, Yamaguchi S, Nelson DC, Tian C, Herrera-Estrella L, Tran LP.	4. 巻 13
2. 論文標題 The karrikin receptor KAI2 promotes drought resistance in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1007076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1007076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakata, TM, Sato M, Wakazaki M, Sato N, Kojima K, Sekine A, Nakamura S, Shikanai T, Toyooka K, Tsukaya H and Horiguchi G	4. 巻 7
2. 論文標題 Plastid translation is essential for lateral root stem cell patterning in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio028175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.028175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 佐藤 繭子, 成川-篠崎 苗子, 豊岡 公德	4. 巻 8
2. 論文標題 植物と微生物の攻防を電子顕微鏡で捉えるには?	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 植物科学の最前線 (BSJ-Review)	6. 最初と最後の頁 29-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 佐藤 繭子, 後藤 友美, 豊岡 公德	4. 巻 52
2. 論文標題 植物の免疫電子顕微鏡法	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 98-103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 豊岡公德	4. 巻 63
2. 論文標題 MirrorCLEM : シームレスな光-電子相関顕微鏡システム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hitachi Scientific Instrument News	6. 最初と最後の頁 5533-5538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 豊岡 公德, 若崎 真由美, 宮 彩子, 佐藤 繭子	4. 巻 55
2. 論文標題 切片SEM観察法の植物試料への応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 7-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 豊岡 公德
2. 発表標題 切片SEM観察法の植物試料への応用
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第75回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiminori Toyooka
2. 発表標題 Fluorescence Detection of Fluorescence-labeled Organelles In-resin Section using Antifade Reagents in Correlative Light and Electron Microscopy
3. 学会等名 Microscopy & Microanalysis 2019 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊岡 公德
2. 発表標題 走査電顕を用いた組織・細胞の新しい捉え方
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiminori Toyooka
2. 発表標題 Development of rapid and accurate CLEM system and application for tissues and cells of plant and animal
3. 学会等名 3D Electron Microscopy of Organelles and Macromolecules (EMOM) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 豊岡 公德
2. 発表標題 光-電子相関顕微鏡システムの開発と生物試料への応用
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮彩子、佐藤繭子、成川苗子、前田躍、許斐麻美、星野吉延、豊岡公德
2. 発表標題 光電子相関顕微鏡法を用いた植物メリステムの形態観察
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第74回学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮彩子、佐藤繭子、若崎真由美、豊岡公德
2. 発表標題 シロイヌナズナ根端分裂組織のQCの形態的特徴
3. 学会等名 日本植物形態学会 第29回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊岡公德、成川苗子、宮彩子、佐藤繭子、前田躍、許斐麻美、星野吉延
2. 発表標題 高分解能走査電顕を用いた細胞内小器官の光電子相関顕微鏡解析
3. 学会等名 第74回日本顕微鏡学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊岡公德
2. 発表標題 光-電子相関顕微鏡法(CLEM):再生医療研究への応用に向けて
3. 学会等名 第74回日本顕微鏡学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮彩子、佐藤繭子、齋藤夕子、前田躍、許斐麻美、星野吉延、豊岡公德
2. 発表標題 メリステムの超微形態を光電子相関顕微鏡法を用いて捉える
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤繭子、豊岡公德
2. 発表標題 高圧凍結技法を用いた藻類・植物の電子顕微鏡解析
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kiminori Toyooka, Naeko Narikawa, Ayako Miya, Mayuko Sato, Yaku Maeda, Mami Konomi, Yoshinobu Hoshino
2. 発表標題 Development of rapid and accurate correlative light and electron microscopy for fluorescence-labeled organelles using light microscopes and FE-SEM
3. 学会等名 19th International Microscopy Congress (IMC19) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤繭子、若崎真由美、宮彩子、武田紀子、豊岡公德
2. 発表標題 植物試料切片を用いたYAG-BSE走査電顕観察法の検討
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第43回関東支部講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊岡公德
2. 発表標題 光電子相関顕微鏡法の開発とその応用：蛍光タンパク質の局在をFE-SEMで捉える
3. 学会等名 第147回電子顕微鏡技術研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 豊岡公德, 成川苗子, 佐藤繭子, 前田躍, 羽根田茂, 星野吉延, 許斐麻美, 川俣茂
2. 発表標題 生物試料の光電子相関顕微鏡法：光顕で観察した同一切片をFE-SEMで捉える
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第73回学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本恵, 成川苗子, 佐藤繭子, 岡本龍史, 豊岡公德
2. 発表標題 シロイヌナズナ根端における ERボディ様構造体の超微形態解析
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toyooka K., Narikawa N., Sato M., Maeda Y., Haneda S., Hoshino Y., Konomi M., Kawamata K.
2. 発表標題 Effective Detection of Fluorescence-labeled Plant Organelles in Resin Section using MirrorCLEM with FE-SEM
3. 学会等名 M&M 2017 Microscopy & MicroAnalysis (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 豊岡公德
2. 発表標題 光電子相関顕微鏡法 (CLEM) の基礎と応用
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 SEM分科会主催SCANTECH2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 豊岡公德, 成川苗子, 佐藤繭子, 前田躍, 羽根田茂, 許斐麻美, 川俣茂, 星野吉延
2. 発表標題 樹脂包埋組織切片中のGFP蛍光を捉える効果的な光電子相関顕微鏡法の検討
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第60回記念シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kiminori Toyooka
2. 発表標題 Development of rapid and accurate correlative light and electron microscopy for fluorescence-labeled organelles using FE-SEM
3. 学会等名 広島大学理学部主催国際シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アライメントシステム及び位置合わせ用シール	発明者 前田躍・星野吉延・ 豊岡公德	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、197708	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件



〔その他〕

理研CSRS 質量分析・顕微鏡解析ユニット 顕微鏡解析室  
<http://bioem.riken.jp>

アルカロイドを標的としたメタボローム解析手法を開発 - 薬用資源の効率的な発掘に期待 -  
[https://www.riken.jp/press/2020/20200423\\_4/index.html](https://www.riken.jp/press/2020/20200423_4/index.html)

根の葉緑体を作るのに窒素同化鍵酵素が重要であることを発見 ~ イネグルタミン合成酵素アイソザイムの巧妙な使い分けを明らかに ~  
<http://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p202002171400.html>

細胞の職業選択を決めるスイッチの発見  
[https://www.kobe-u.ac.jp/research\\_at\\_kobe/NEWS/news/2020\\_04\\_22\\_01.html](https://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2020_04_22_01.html)

植物がクローン繁殖体をつくる仕組みをコケで解明 重要遺伝子 " KARAPPO " を発見  
[https://www.kobe-u.ac.jp/research\\_at\\_kobe/NEWS/news/2019\\_10\\_11\\_01.html](https://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2019_10_11_01.html)

裸子植物ソテツの花が発熱するしくみの一端を解明 - ミトコンドリアの特徴的な形態と呼吸鎖バイパス経路の働きが発熱に関与 -  
<http://www.miyazaki-u.ac.jp/newsrelease/edu-info/post-294.html>

鉛吸着材に使えるコケの新たな生物機能を発見  
[http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180117\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180117_1/)

口腔常在菌の中には、異所性に腸管に定着すると免疫を活性化するものがある  
<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/files/2017/10/20/171020-1.pdf>

セルロース合成の " 足場 " 増やす遺伝子を発見  
[https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2017/08/research-highlights\\_ja/20170811.html](https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2017/08/research-highlights_ja/20170811.html)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	佐藤 繭子  (Sato Mayuko)		
研究協力者	篠崎一成川 苗子  (Shinozaki-Narikawa Naeko)		
研究協力者	宮 彩子  (Miya Ayako)		
研究協力者	若崎 眞由美  (Wakazaki Mayumi)		
研究協力者	武田 紀子  (Takeda Nriko)		