

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657051

研究課題名（和文） オミックス情報を融合した電子顕微鏡像生命動態基盤の開発

研究課題名（英文） Development of electron microscopy atlas: Fusion with omics and electron microscopic data

研究代表者

豊岡 公徳 (TOYOOKA KIMINORI)

独立行政法人理化学研究所・機能開発研究グループ・上級研究員

研究者番号：10360596

研究成果の概要（和文）：

本研究は、透過電子顕微鏡(TEM)により生物試料切片を広範囲・高解像度像を自動撮影・自動結合するシステムを構築し、高解像度TEM像上の組織・細胞におけるオルガネラの超微形態と分布、関連情報を閲覧可能なTEM像アトラス構築を目指した。高圧凍結試料を用いて数千～数万枚のTEM像を自動撮影・自動結合するプログラムを開発した。アノテーションを付けたオルガネラに、オミックス情報を加えられるようにし、自動認証プログラムおよび公開用サーバー構築を行った。

研究成果の概要（英文）：

Transmission electron microscopy (TEM) is important for high-resolution ultrastructure observation for organelles, cell and tissues. However, it is unsuitable for comprehensive analyses. I constructed TEM atlas to achieve an exhaustive ultrastructural analysis of organelles in model plants by using high-pressure freezing (HFP) and TEM techniques. To take wide and high-resolution TEM pictures, Arabidopsis roots and BY2 cells were frozen by HFP machine and then fix. After embedded in resin, large ultrathin sections were put on a hole grid. Then we took TEM pictures by auto-digital TEM recoding system. I succeed in records more than 30 thousand images. We developed auto-photomerge program for TEM pictures and several thousands of pictures were automatically merged. Using these wide-high resolution pictures, I have developed a web-based 2D map that can be zoomed and searched.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：電子顕微鏡、高圧凍結技法、電子地図、オルガネラ、超微形態

1. 研究開始当初の背景  
電子顕微鏡(TEM)を用いて動植物のオルガネ

ラの形態やタンパク質の局在を解析すると、  
組織・細胞ごとにその様子は全く異なる。し

かし、現在のトランスクリトームやプロテオーム等のオミックス解析は、組織・細胞・オルガネラレベルの小さなレイヤー（階層）ではなく、個体・器官レベルの大きなレイヤーにおける平均的な検出データを用いて議論している場合が多い。近年、分析機器の高速化・高感度化に従い、オミックス解析が個体・器官レベルから組織、細胞、オルガネラレベルへと移行しつつある。それゆえ、それら情報を位置づける小さなレイヤー、すなわち、組織・細胞・オルガネラレベルの網羅的な解析が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、高圧凍結技法を取り入れた透過型電子顕微鏡 (TEM) により広範囲の高倍率・高解像度像を自動撮影するシステムを構築する。そして、オミックス情報を含めたマッピングシステムを取り入れた画像マップを構築し、公開することを目的とする。具体的には、シロイヌナズナまたはタバコ培養細胞の高解像度広領域の電子顕微鏡像を撮影し、拡大縮小可能でかつアノテーション可能なウェブベースのデータベースの構築を目指した。

## 3. 研究の方法

モデル植物のシロイヌナズナの根端およびタバコ培養細胞を用いて、1. 高圧凍結超薄切片作製法の高度化、2. 高倍率広域デジタルTEM写真の自動撮影システムの構築、3. 電子地図化APIの実装・アプリケーション開発、4. アノテーション・分布定量化、5. 免疫TEM等によるオルガネラ同定、6. Web公開、の流れで研究を進めた。

## 4. 研究成果

シロイヌナズナまたはタバコ培養細胞を

用いて高圧凍結した後、固定液と樹脂の条件検討を行い、組織・細胞の形態が保持され面積の大きい超薄切片を効率よく作製する方法を開発した。東京大学朽名博士・日本女子大永田准教授らと外部 PC により TEM の CCD カメラと X-Y ステージ等を制御して、自動撮影するプログラムを開発した。そして撮影した数千～数万枚の TEM 像を自動につなぎ合わせるプログラムを開発した。本プログラムを組み合わせて、3 万枚の電顕写真の自動撮影・自動結合に成功した。さらに、つなぎ合わせた高倍率広域デジタル写真を Web ブラウザで表示可能なシステムを構築し、拡大縮小等の表示テストを行いながら、オルガネラにアノテーションを加えられるようにした。また、ポップアップメニューや文字検索によりオルガネラ的位置を表示できるように改良を加え、各オルガネラの遺伝子やプロテオミクス、蛍光イメージングの動画などのオミックス情報のリンクを加えられるようにした。さらに、東京大学桧垣博士らと電顕像におけるオルガネラの自動認証プログラムの構築を進め、根端におけるデンプン顆粒の自動抽出に成功した。シロイヌナズナ根端に未同定の構造体を見出した。TEM 像アトラスを公開できるようサーバーをセットアップし、所内内部サーバーに公開しテストするとともに、様々なサンプルに末端 PC からアノテーションを付けられるシステムとデータベースを構築した。

本研究は、日本植物生理学会と日本顕微鏡学会で毎年発表するとともに、非公開ミーティングや公開シンポジウム等で報告した。現在、本研究に関して論文をまとめている。

## 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 9 件)

1. Kawafune, K., Sato, M. Toyooka, K., Nozaki, H. (2012) Ultrastructure of the rickettsial endosymbiont "MIDORIKO" in the green alga *Carteria cerasiformis* as revealed by high-pressure freezing and freeze-substitution fixation. *Protoplasma* (in press)(査読有り)

2. Yamauchi, D., Tamaoka, D., Hayami, M., Takeuchi, M., Karahara, I., Sato, M. Toyooka, K., Nishioka, H., Terada, Y., Uesugi, K., Takano, H., Kagoshima, Y., Mineyuki, Y. (2012) Micro-CT observations of the 3D distribution of calcium oxalate crystals in cotyledons during maturation and germination in *Lotus miyakojimae* seeds. *J. Electron Microscopy* (in press) (査読有り)

3. Kanaya T, Hase K, Takahashi D, Fukuda S, Hoshino K, Sasaki I, Hemmi H, Knoop KA, Kumar N, Sato M, Katsuno T, Yokosuka O, Toyooka K, Nakai K, Sakamoto A, Kitahara Y, Jinnohara T, McSorley SJ, Kaisho T, Williams IR, Ohno H." (2012) The Ets Transcription Factor Spi-B Is Essential for the Differentiation of Intestinal Microfold (M) Cells." *Nature Immunology*, 13, 832-842 (査読有り)

4. Bunsupa S, Katayama K, Ikeura E, Oikawa A, Toyooka K, Saito K, Yamazaki M (2012) Lysine Decarboxylases Involved in the First Step of Quinolizidine Alkaloid Biosynthesis in Leguminosae Plants. *Plant Cell*. 24: 1202-1216 (査読有り)

5. Kobayashi K, Baba S, Obayashi T, Sato M, Toyooka K, Keränen M, Aro E, Fukaki H, Ohta H, Sugimoto K, Masuda T (2012) Regulation of Root Greening by Light and Auxin/Cytokinin Signaling in Arabidopsis *Plant Cell*. 24: 1081-1095 (査読有り)

6. Minamisawa, N., M. Sato, K.H. Cho, H. Ueno, K. Takechi, M. Kajikawa, K.T. Yamato, K. Ohyama, K. Toyooka, G.T. Kim, G. Horiguchi, H. Takano, T. Ueda, and H. Tsukaya. 2011. ANGUSTIFOLIA, a plant homolog of CtBP/BARS, functions outside the nucleus. *Plant J*. 68: 788-799 (査読有り)

7. Kobayashi, M., N. Kouzu, A. Inami, K. Toyooka, Y. Konishi, K. Matsuoka, and T. Matoh. 2011. Characterization of

Arabidopsis CTP:3-deoxy-D-manno-2-octulosonate cytidyltransferase (CMP-KDO synthetase), the enzyme that activates KDO during rhamnogalacturonan II biosynthesis. *Plant Cell Physiol*. 52: 1832-1843 (査読有り)

8. Nishimura, T., Toyooka, K. Sato, M., Matsumoto, S. Lucas, M.M., Strnad, M., Baluška, F., Koshihara, T. (2011) Immunohistochemical observation of indole-3-acetic acid at the IAA synthetic maize coleoptile tips. *Plant Signaling & Behavior* 6:2013-2022 (査読有り)

9. Akai M, Onai K, Kusano M, Sato, M., Redestig H, Toyooka, K., Morishita M, Miyake H, Hazama A, Checchetto V, Szabó I, Matsuoka K, Saito K, Yasui M, Ishiura M, Uozumi N\*. (2011) Plasma membrane aquaporin AqpZ protein is essential for glucose metabolism during photomixotrophic growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem*. 286: 25224-35 (査読有り)

[学会発表] (計 9 件)

1. 佐藤繭子, 朽名夏磨, 澤木史江, 若崎眞由美, 桧垣匠, 吉田拓弘, 櫻井哲也, 馳澤盛一郎, 持田恵一, 永田典子, 豊岡公德 「電顕アトラス: 高圧凍結技法を取り入れた広域電顕像撮影システムの開発」 第54回日本植物生理学会年会 2013.3.21 (岡山)

2. 佐藤繭子, 後藤友美, 松岡健, 豊岡公德 「V-PPaseの細胞内局在から見るタバコ根端分裂組織の液胞形成」 第68回日本顕微鏡学会年会 2012.5.15 (つくば)

3. 豊岡公德, 若崎眞由美, 朽名夏磨, 桧垣匠, 永田典子, 松岡健, 持田恵一, 佐藤繭子 「生体顕微マルチスケールマッピングシステム: 小胞クラスターの分布と構造」 第68回日本顕微鏡学会年会 2012.5.15 (つくば)

4. K. Toyooka, M. Wakazaki, N. Kutsuna, T. Higaki, N. Nagata, K. Mochida, K. Matsuoka, K. Shinozaki, M. Sato, "Electron microscopy atlas: The ultrastructure and distribution of vesicle

clusters” The 1st International Symposium  
on Plant Environmental Sensing, 19-21  
March 2012, Nara, Japan

5. 松岡健, 豊岡公德, 小胞輸送系での物質合成・輸送関連タンパク質と脂質膜ドメイン, 日本植物生理学会第 53 回大会 シンポジウム 生化学と細胞生物学の融合による低分子集積生物学の構築に向けて, 2012. 03. 17 (京都)

6. 佐藤繭子, 後藤友美, 松岡健, 豊岡公德, タバコ根端組織における液胞型プロトンピロホスファターゼの細胞内局在, 日本植物生理学会第 53 回大会, 2012. 03. 17. (京都)

7. 豊岡公德, 若崎真由美, 吉田拓弘, 朽名夏麿, 桧垣匠, 永田典子, 松岡健, 櫻井哲也, 持田恵一, 佐藤繭子, 生体顕微マルチスケーリングマッピングシステムを用いた小胞クラスターの分布と超微形態解析, 日本植物生理学会第 53 回大会, 2012. 03. 17. (京都)

8. 豊岡公德, 後藤友美, 佐藤繭子, 松岡健 “物質輸送装置を捉える: ゴルジ以降の分泌に関与する小胞クラスター-SVC” 第 67 回日本顕微鏡学会年会 2011. 5.17 (福岡)

9. 佐藤繭子, 後藤友美, 豊岡公德 「高圧凍結技法を用いた植物液胞形成過程の微細構造解析」 第 67 回日本顕微鏡学会年会 2011. 5.17 (福岡)

[その他]

ホームページ等

[http://labs.psc.riken.jp/gdrg/Research1/PSC\\_bioimaging/Top.html](http://labs.psc.riken.jp/gdrg/Research1/PSC_bioimaging/Top.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

豊岡 公德 (TOYOOKA KIMINORI)

独立行政法人理化学研究所・機能開発研究グループ・上級研究員

研究者番号: 10360596

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

西川 繭子 (佐藤繭子) (NISHIKAWA MAYUKO)

独立行政法人理化学研究所・機能開発研究グループ・技師

研究者番号: 80550376

持田 恵一 (MOCHIDA KEIICHI)

独立行政法人理化学研究所・バイオマス研究基盤チーム・上級研究員

研究者番号: 90387960

研究協力者

永田 典子

日本女子大学理学部・准教授

朽名 夏麿

東京大学大学院新領域創成科学研究科・助教

桧垣 匠

東京大学大学院新領域創成科学研究科・助教

吉田 拓広

独立行政法人理化学研究所・ゲノム情報統合ユニット・テクニカルスタッフ

櫻井 哲也

独立行政法人理化学研究所・ゲノム情報統合ユニット・ユニットリーダー

若崎 真由美

独立行政法人理化学研究所・機能開発研究グループ・テクニカルスタッフ