

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21370094

研究課題名（和文） ライブクレムを基盤とする分子特異的ナノイメージング法の開発

研究課題名（英文） Development of molecular specific nano-imaging technology based on live CLEM

研究代表者

原口 徳子 (HARAGUCHI TOKUKO)

独立行政法人情報通信研究機構・未来 ICT 研究所・上席研究員

研究者番号：20359079

研究成果の概要（和文）：

独自に開発してきたライブクレム法をさらに発展させ、接着性細胞以外にも適応できる、汎用性の高い分子特異的ナノイメージング法の開発を行った。本研究により、浮遊性細胞である分裂酵母や出芽酵母、遊走性の高いテトラヒメナ細胞に適応できるライブクレム法を確立した。また、蛍光画像と電顕画像との位置合わせの精度を格段に上げる方法を考案した。

研究成果の概要（英文）：

This research aims to develop an imaging technology, so called “Live CLEM”, applicable to non-adherent cells including yeasts and ciliates. In this study, we have established the Live CLEM technology that can be applied to the study of floating cells such as *S. cerevisiae* and *S. pombe* as well as of swimming cells such as *Tetrahymena*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞構造・機能、蛋白質、生体分子、バイオイメージング

1. 研究開始当初の背景

蛍光顕微鏡法は、特定の分子を蛍光で染め分けて観察するという点で分子特異性が高いイメージング法であり、生きた細胞内の特定の分子の動態を観察する方法として、生命科学に欠かせない優れた解析法である。しかし、この方法は、見ている目的分子しか見えないという欠点も持っている。さらに、膜構造を直接観察することが苦手であり、そのため、膜構造と目的分子との位置関係が分かりにくいという欠点もあった。この問題を解決するために、当研究代表者は、生細胞蛍光イ

メージングと電子顕微鏡観察を組み合わせたライブクレム法（live CLEM: live cell imaging associated correlative light-electron microscopy）を開発してきた。しかし、従来のライブクレム法は、接着性の培養細胞に対して作られた方法であり、酵母のような浮遊性の細胞や、テトラヒメナのような自発的に動き回る細胞（遊泳性細胞）には応用できなかった。また、蛍光画像と電子顕微鏡画像の位置合わせの精度が低い点が問題であった。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、幅広い細胞サンプルに対して適応できる、蛍光イメージングと電子顕微鏡観察の両方の長所を活かした新しい分子特異的ナノイメージング法の開発を行うものである。具体的には、現在の方法では解析できない浮遊性の細胞（血液細胞、分裂酵母など）や遊泳性の細胞（繊毛虫テトラヒメナなど）に対しても、ライブクレム法を適用できる方法を確立する。その上で、蛍光像と電頭像の位置合わせの精度を向上させる。そのため、内部標準となる物質を細胞内に導入し位置合わせを行う。さらに、蛍光を利用した電子顕微鏡染色法の開発を行い、位置合わせの精度を格段に上げる。これらの研究によって、分子特異的ナノイメージング法の確立を目指す。

3. 研究の方法

浮遊細胞の例として、酵母の一種である出芽酵母と分裂酵母を用いた。また、遊泳性の細胞として原生動物である繊毛虫テトラヒメナを用いた。これらの細胞が蛍光観察と電頭観察の途中で移動しないように、物理的に固定する必要がある。出芽酵母と分裂酵母では、カバーガラスの表面をコンカナバリンAやレクチンでコートして細胞を物理的に固定する方法や、アガロースなどのポリマーに包埋する方法などを検討した。遊泳性のテトラヒメナでは、接着剤でガラス面に接着させる方法やアガロースに包埋させる方法などを検討した。この条件で蛍光顕微鏡を使ってライブセル観察を行ったのち、様々な条件で化学固定を行った。試料をエポキシ樹脂で包埋し、蛍光観察した同一細胞を電子顕微鏡で観察した。様々な条件で、この観察を繰り返し、画質と位置精度が最も高い方法を選択した。位置精度を向上させるために、細胞内にビーズを入れて内部標準とする方法を検討した。蛍光-電頭両用プローブとして、両用に使える特殊な蛍光タンパク質や、両方のプローブを結合させた特異的抗体を用いた方法を検討した。

4. 研究成果

(1) ライブクレム法の確立

① 分裂酵母のライブクレム法

これまでライブクレム観察が不可能だった浮遊性細胞の分裂酵母に対して、細胞が動かないように固定 (immobilize) する方法を検討した。カバーガラスの表面をコンカナバリンAでコートすることにより、蛍光生細胞イメージングだけでなく、その後の処理でも

移動したりせず、電子顕微鏡観察が可能であることが分かった。この方法を用いて、減数分裂期の分裂酵母細胞の核膜を解析した。減数第二分裂の後期では、核タンパク質 (GFP-NLS) が細胞質に流出する見かけの核膜崩壊が、わずか6分間だけ起こることが蛍光顕微鏡を用いたライブ観察から分かった。この細胞を、電子顕微鏡観察したところ、核膜の物理的な崩壊が起こっていないことが

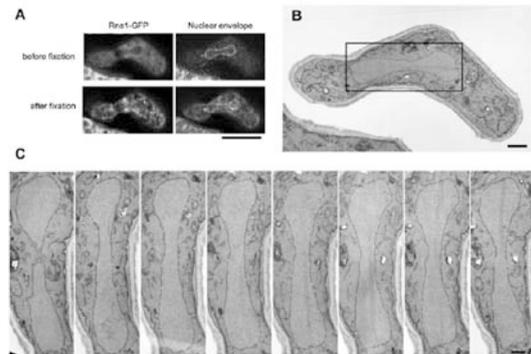


図1 分裂酵母のライブクレムイメージング

分かった (図1)。このようなライブクレム観察が決め手となり、分裂酵母では、これまで発見されていない特殊な分裂様式として、物理的な核膜崩壊を伴わないバーチャルな核膜崩壊が起こることを証明することができた (Asakawa et al, Curr. Biol., 2010)。また、増殖期の分裂酵母にも応用し、核膜タンパク質である Ima1 と Lem2 の欠失によって、核膜内膜の構造が異常になることを報告した (Hiraoka et al, Genes Cells, 2011)。

② 出芽酵母のライブクレム法

分裂酵母と同様の方法を、出芽酵母に適用できるか検討した。その結果、出芽酵母でも、分裂酵母と同様、カバーガラスの表面をコンカナバリンAでコートすることにより、細胞をガラス表面に固定することができ、ライブ

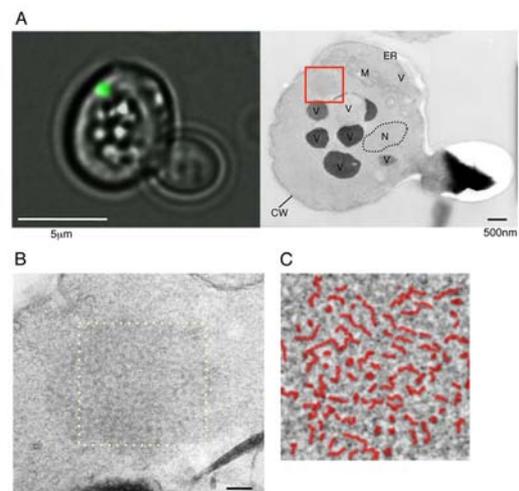


図2 出芽酵母のライブクレムイメージング

クレム観察できることが分かった。この方法を使い、プリオンタンパク質 Sup35 の GFP 融合タンパク質が細胞内で凝集体をつくる様子を、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で観察し、細胞内のプリオン凝集体の超構造を明らかにした (Kawai-Noma et al, *J. Cell Biol.*, 2010) (図 2)。

③テトラヒメナのライブクレム法

遊泳性の細胞として繊毛虫のテトラヒメナ細胞を用いて、ライブクレム法が行える条件を検討した。様々な細胞の固定化法を検討した結果、生殖のために接合した細胞では、アガロースゲルに包埋することによって、蛍光顕微鏡による比較的長時間のライブ観察が可能であることが分かった。さらに、この細胞は、アガロース包埋した状態でも、化学固定や、オスミウム染色やエボン包埋が可能で、電子顕微鏡観察することも可能であった。これらの方法を使って、テトラヒメナ細胞のように遊泳性細胞にも適応できるライブクレム法を確立した (論文準備中)。

(2) 位置合わせ精度の改善

蛍光画像と電子顕微鏡画像の位置合わせの精度を向上させるために、位置合わせの指標となる人工的なプラスチックビーズ (直径 1 マイクロメートル程度) を細胞に導入し、その方法の是非を検討した。この方法は、蛍光像と電顕像の位置合わせが容易になる利点はあるが、入れたビーズによって細胞機能が変わるといった難点もあることが分かった。この問題を回避するために、蛍光-電顕両用プローブを用いる方法を検討した。蛍光色素 (Alexa594) と金粒子の両者が結合している抗体を用いた方法や、両用プローブとなるタンパク質を用いた方法を検討した結果、位置合わせの精度を上げるのに、両者共、有効であることが分かった。一方、両用タンパク質を用いたライブ観察は非常に困難であることが分かった。

(3) ライブクレムの応用

本研究課題で確立したライブクレム法を、ヒト細胞に応用し、遺伝子デリバリー試薬の効果を検討した結果を論文で報告した (Hirose et al, *Mol. Ther.*, 2012; Kobayashi et al, *J. Gene Med.*, 2012)。

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 31 件)
[原著論文]

- ① S. Kobayashi, Y. Hattori, H. Osakada, M. Furuhashi, K. Toma, Y. Maitani, Y. Hiraoka, T. Haraguchi. Early entry and deformation of macropinosomes correlates with high efficiency of decaarginine-PEG-lipid-mediated gene delivery. *The Journal of Gene Medicine*. 14:262-271. doi:10.1002/jgm.2615 (2012) 査読有
- ② H. Hirose, T. Takeuchi, H. Osakada, S. Pujals, S. Katayama, I. Nakase, S. Kobayashi, T. Haraguchi, S. Futaki. Transient Focal Membrane Deformation Induced by Arginine-rich Peptides Leads to Their Direct Penetration into Cells. *Molecular Therapy*. 20:984-993. doi:10.1038/mt.2011.313 (2012) 査読有
- ③ H. Asakawa, Y. Hiraoka, T. Haraguchi. Physical breakdown of the nuclear envelope is not necessary for breaking its barrier function. *Nucleus*. 2:523-526. doi:10.4161/cib.4.3.14808 (2011) 査読有
- ④ Y. Hiraoka, H. Maekawa, H. Asakawa, Y. Chikashige, T. Kojidani, H. Osakada, A. Matsuda, T. Haraguchi. Inner Nuclear Membrane Protein Imal is Dispensable for Intranuclear Positioning of Centromeres. *Genes to Cells*. 16:1000-1011. doi:10.1111/j.1365-2443.2011.01544.x (2011) 査読有
- ⑤ H. Asakawa, Y. Hiraoka, T. Haraguchi. Nuclear translocation of RanGAP1 coincides with virtual nuclear envelope breakdown in fission yeast meiosis. *Communicative & Integrative Biology*. 4:4312-4314. doi:10.4161/cib.4.3.14808 (2011) 査読有
- ⑥ H. Asakawa, T. Kojidani, C. Mori, H. Osakada, M. Sato, D.-Q. Ding, Y. Hiraoka, T. Haraguchi. Virtual breakdown of the nuclear envelope in fission yeast meiosis. *Current Biology*. 20:1919-1925. doi:10.1016/j.cub.2010.09.070 (2010) 査読有
- ⑦ S. Kawai-Noma, C.-G. Pack, T. Kojidani, H. Asakawa, Y. Hiraoka, M. Kinjo, T. Haraguchi, H. Taguchi, A. Hirata. In vivo evidence for the fibrillar structures of Sup35 prions in yeast cells. *J. Cell Biol.* 190:223-231 doi:10.1083/jcb.201002149 (2010) 査読有
- ⑧ S. Kobayashi, T. Kojidani, H. Osakada, A. Yamamoto, T. Yoshimori, Y. Hiraoka, T. Haraguchi. Artificial induction of

autophagy around polystyrene beads in nonphagocytic cells. *Autophagy*. 6:36-45. doi:10.4161/auto.6.1.10324 (2010) 査読有

(収録論文)

- ① 小林昇平、糀谷知子、小坂田裕子、森 知栄、荒神尚子、平岡 泰、原口徳子 人工ビーズを用いた細胞の外來異物認識機構の解析、医学生物学電子顕微鏡技術学会誌 26 :21-22. (2012) 査読無
- ② 原口徳子 核の構造と機能のダイナミックス 医学生物学電子顕微鏡技術学会誌 25 :25-26. (2011) 査読無

(日本語総説)

- ① 小林昇平、原口徳子 人工ビーズを用いてオートファジーを視る 顕微鏡 (日本顕微鏡学会 学会誌)、45: 78-82. (2010) 査読無
- ② 原口徳子 ライブからライブ CLEM へー蛍光顕微鏡法と電子顕微鏡法との融合ー蛋白質・核酸・酵素 54: 1784-1791. (2009) 査読無

[学会発表] (計 117 件)

(国際)

- ① T. Haraguchi, M. Iwamoto, F. Bunai, T. Koujin, H. Osakada, C. Mori, T. Kojidani, Y. Hiraoka. The Nuclear Pore Complex Determines Nuclear Differentiation in Ciliate *Tetrahymena thermophila*. EMBO workshop "Mechanisms of Nucleocytoplasmic Trafficking" (Nov. 9. 2011) Jerusalem Hills, Israel
- ② T. Haraguchi, T. Koujin, H. Osakada, T. Kojidani, S. Kobayashi, M. Nakano, H. Masumoto, V. L. Larionov, W. C. Earnshaw, Y. Hiraoka. The Nuclear Envelope Structures are Required for Maintenance of the Micronucleus Formed by Loss of Centromere Functions of a Human Artificial Chromosome. Nuclear envelope disease and chromatin organization. (Jul. 14. 2011) Robinson College, Cambridge, UK
- ③ T. Haraguchi, M. Iwamoto, F. Bunai, T. Koujin, H. Osakada, C. Mori, T. Kojidani, Y. Hiraoka. The Nuclear Pore Complex Determines Nuclear Differentiation in Ciliate *Tetrahymena thermophila*. International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities (Jan. 24. 2011) The Westin Awaji Island, Japan (招待講演)
- ④ T. Haraguchi, T. Koujin, T. Kojidani, H. Osakada, F. Bunai, M. Iwamoto, S. Kobayashi, H. Asakawa, Y. Hiraoka. Live CLEM: A new approach for observing

molecular dynamics in high resolution 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology 2009 (Sep. 17. 2009) Centennial Hall, Kobe University, Japan (招待講演)

- ⑤ T. Haraguchi, T. Koujin, T. Kojidani, H. Osakada, S. Kobayashi, M. Iwamoto, F. Bunai, H. Asakawa, Y. Chikashige, Y. Hiraoka. Live CLEM: A New Approach for Observing Molecular Dynamics in High Resolution. The 9th NIBB-EMBL Symposium "Functional Imaging from Atoms to Organisms" (Apr. 20. 2009) Okazaki Conference Center, Japan. (招待講演)

(国内)

- ① 原口徳子 Live CLEM 第 18 回細胞生物学ワークショップ (2011 年 11 月 24 日) 北海道大学、北海道
- ② 原口徳子、糀谷知子、浅川東彦、森知栄、小坂田裕子、小林昇平、平岡泰 蛍光・電子顕微鏡両用プローブを用いた分子特異的ナノイメージング法の開発 医学生物学電子顕微鏡技術学会 第 27 回学術講演会 (2011 年 5 月 14 日) 四国大学交流プラザ、徳島県
- ③ 原口徳子 最先端の顕微鏡法で細胞分裂を見る 兵庫県立須磨東高校 インスパイア・ハイスクール事業 第 2 回 特別授業 (2010 年 12 月 20 日) 兵庫県立須磨東高校、神戸市
- ④ 原口徳子 Live CLEM 第 16 回細胞生物学ワークショップ (2010 年 11 月 25 日) 北海道大学、札幌市
- ⑤ 原口徳子 電顕光顕統合イメージングとしてのライブクレム法とその応用 平成 22 年度生理学研究所研究会「電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用ー電顕・光顕による統合イメージング」(2010 年 10 月 5 日) 岡崎コンファレンスセンター、愛知県
- ⑥ T. Haraguchi, T. Koujin, T. Kojidani, H. Osakada, S. Kobayashi, M. Iwamoto, F. Bunai, H. Asakawa, Y. Hiraoka. Live CLEM: An approach for observing molecular dynamics in high resolution. 日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会 (2010 年 5 月 26 日) 名古屋国際会議場、愛知県 (招待講演)
- ⑦ 原口徳子、荒神尚子、小坂田裕子、糀谷知子、小林昇平、中野めぐみ、舛本寛、V. Larionov, W. C. Earnshaw, 平岡泰 人工染色体のセントロメア機能低下に伴って形成される微小核の細胞内動態と核膜構造 第 32 回日本分子生物学会年会 (2009 年 12 月 12 日) パシフィコ横浜、神奈川県
- ⑧ 原口徳子 Live CLEM 第 14 回細胞生物学ワークショップ (2009 年 11 月 26 日) 北海道大学、札幌市
- ⑨ 原口徳子、荒神尚子、糀谷知子、小坂田裕子 Live CLEM 法 第 34 回組織細胞化学講

習会(2009年7月30日)徳島大学、徳島県
(招待講演)

[図書] (計2件)

- ① 原口徳子、荒神尚子、糀谷知子、小坂田裕子(分担執筆) Live CLEM法 組織細胞化学 2009 日本組織細胞化学会編 学際企画 P149-157. (2009)
- ② 小林昇平、原口徳子(分担執筆) 自己組織体としての細胞核 自己組織化ハンドブック NTS 出版 306-312. (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

- ① 名称: 電子顕微鏡観察用サンプルの作製方法及びキット

発明者: 原口徳子

権利者: 独立行政法人 情報通信研究機構

種類: 特許権

番号: 特願2011-008666

出願年月日: 平成23年1月19日

国内外の別: 国内

- ② 名称: Vrk1 蛋白質抗体とその製造方法、抗原、検知方法

発明者: 原口徳子、荒神尚子、平岡泰

権利者: 独立行政法人 情報通信研究機構

種類: 特許権

番号: 特願2009-155028

出願年月日: 平成21年6月30日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計1件)

- ① 名称: Vrk1 蛋白質抗体とその製造方法、抗原、検知方法

発明者: 原口徳子、荒神尚子、平岡泰

権利者: 独立行政法人 情報通信研究機構

種類: 特許権

番号: 特開2011-11987 (公開番号)

取得年月日: 平成23年1月20日(公開日)

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

http://www2.nict.go.jp/advanced_ict/bio/w131103/CellMagic/

(報道発表:6件)

- ① 読売新聞 (平成22年12月27日) 単細胞生物にサバイバルの知恵 栄養不足なら省エネ分裂
- ② 電波タイムズ (平成22年10月27日) 新たな細胞核の分裂様式を発見 NICT 情報伝達を行う「分子通信」への応用に期待
- ③ 日経産業新聞 (平成22年10月22日) 細胞核分裂 酵母、核膜破れず 情通機構 東大 生物進化 過程解明へ

④ 日刊工業新聞 (平成22年10月22日) 酵母菌の細胞核分裂 新プロセス発見 情通機構 「分子通信」実現へ

⑤ 日刊工業新聞 (平成21年11月30日付) オートファジー誘導 情通機構が新手法 HeLa 細胞にビーズ挿入

⑥ 日経産業新聞 (平成21年5月13日付) テトラヒメナ2種類の核 細胞が判別、原理解明 情通機構 IT技術に応用

(若手研究者育成のための蛍光顕微鏡実機講習会の主催:6件)

① 第18回細胞生物学ワークショップ、北海道大学、2011年11月20日~25日

② 第17回細胞生物学ワークショップ、(独)情報通信研究機構 未来ICT研究センター、2011年8月8日~13日

③ 第16回細胞生物学ワークショップ、北海道大学、2010年11月21日~26日

④ 第15回細胞生物学ワークショップ、(独)情報通信研究機構 未来ICT研究センター、2010年8月16日~21日

⑤ 第14回細胞生物学ワークショップ、北海道大学、2009年11月22-27日

⑥ 第13回細胞生物学ワークショップ、(独)情報通信研究機構 未来ICT研究センター、2009年8月17~22日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原口 徳子 (HARAGUCHI TOKUKO)

独立行政法人情報通信研究機構・未来 ICT 研究所・上席研究員

研究者番号: 20359079

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: