

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24687007

研究課題名(和文) 生体顕微マルチスケールマッピング：高圧凍結技法の高度化と広域超微形態解析法の開発

研究課題名(英文) Construction of multi-scale mapping system of plant tissues and cells prepared by high-pressure freezing and TEM techniques

研究代表者

豊岡 公徳 (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・上級研究員

研究者番号：10360596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、モデル植物試料を瞬時に固定する高圧凍結技法を改良・高度化を行い、広域かつ高解像度の透過電顕像を自動撮影し、繋ぎあわせるシステムを構築した。そして、取得した植物組織や植物培養細胞の高解像広域透過電顕像を用いて、オルガネラ自動認識システムを開発するとともに、環境変化に伴う細胞内オルガネラの超微形態変化とその増減について論文にまとめ、国際及び国内雑誌に発表した。さらに、様々な植物組織・細胞の広域透過電顕像を拡大縮小標示できるウェブサイト“電顕アトラス”を構築し、公開した。

研究成果の概要(英文)：Transmission electron microscopy (TEM) is important for high-resolution ultrastructure observation for organelles, cells and tissues. However, it is unsuitable for comprehensive analyses. I constructed “Electron microscope atlas” to achieve an exhaustive ultrastructural analysis of organelles in model plants by using high-pressure freezing (HPF) and TEM techniques. To take wide and high-resolution TEM images, plant organs and culture cells were frozen by HFP machine and then fix. After embedded in resin, large ultra thin sections were put on a hole grid. Using our developed auto-TEM image acquisition system, I obtained several giga-pixel images of plant organs and culture cells. Moreover, I clarified the ultrastructural and distribution changes of organelles in culture cells, and developed a web-based 2D map “Electron microscope atlas” that can be zoomed and searched.

研究分野：超微形態学

キーワード：電子顕微鏡 オルガネラ マッピング 電子地図 高圧凍結技法

1. 研究開始当初の背景

近年、蛍光イメージングの台頭に伴い、遺伝学やオミックス解析で見出した遺伝子に GFP 等のタグを付加し、蛍光顕微鏡下で形態や局在を容易に推定できるようになった。しかし、透過電顕(TEM)による形態観察がほとんど行われなくなったため、各組織にどのような形態のオルガネラが存在し、実際にどのように分布しているか不明瞭である。それらオルガネラの実像を知るためには、出来る限り生きた状態に近い超微細構造レベルで、高解像度かつ広域 TEM 解析するシステムが必要である。

2. 研究の目的

本研究では、(1)高圧凍結技法と超薄切片法を高度化し、高解像度で広域の TEM 像を撮影し電算機上に再構築する基盤技術と、(2)マルチスケール性を維持した高解像度 TEM 像上の細胞内構造物に位置情報を記録する基盤技術を開発する。そして、(3) 高解像度広域 TEM 像を用いて、発生過程や環境刺激前後のオルガネラの超微形態や分布を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

超微形態解析を専門とする研究員・技師らが TEM 解析を行ない、画像解析を専門家が研究協力者として電子地図化とプログラム開発を行なった。本研究は、植物個体および植物培養細胞を用いて、常法の高圧凍結技法と TEM 観察に加え、次の研究項目に重点をおき遂行した。(1)高圧凍結技法および超薄切片作製法の高度化、(2)高解像度広域デジタル TEM 像自動撮影システムの構築、(3)電子地図系プログラム開発・オルガネラ自動認識システム開発、(4)発生過程または環境刺激後のオルガネラ分布・細胞内微細構造の比較、(5)外部 Web 公開、の流れで研究を進めた。

具体的には、(1)試料は、各培養ステージのタバコ培養細胞 BY-2 株およびシロイヌナ

ズナ器官(根端、茎頂分裂組織、胚)を用いた。高圧凍結装置(Leica EM-PACT)で凍結し、凍結置換装置内で凍結置換した。その後、エポキシ樹脂に包埋後、ウルトラマイクロトーム EM-UC7 で組織全体が入る大きさで厚さ 80 nm の超薄切片を作製した。ホルムバル膜を張った単孔グリッドに載せ、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色し、汎用透過電顕(JEOL JEM-1400)で撮影を行った。(2) 使用した透過電顕 JEM-1400 は縦 5 枚×横 5 枚のデジタル写真を撮影し、結合するシステムを標準装備するが、高倍率で撮影すると狭い領域しか撮影できない。そこで、外部制御コンピューターにより電顕本体 X-Y ステージと CCD カメラなどを自動制御するプログラムおよび撮影した写真を自動で繋ぎあわせる結合プログラムを画像解析の専門家がプログラミングし、当方と日本女子大・永田教授らとともに様々な植物試料の広域 TEM 像の取得を試みつつ、改良を進めた。(3)取得した広域 TEM 像を Web ブラウザ上で容易に閲覧可能なシステムを構築するために、市販のソフトウェアやオープンソースを試した。(4)取得したタバコ培養細胞の広域 TEM 像を用いて、各ステージにおけるオルガネラを定量するとともに、形態を比較した。(5)取得した広域 TEM 像を外部に WEB 公開するために、ファイル形式やデータを置くサーバー、そのセキュリティーなどの公開条件を検討した。

4. 研究成果

(1)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(図 1 左)。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(図1右)。本プログラムを組み合わせ、3万枚超えの電顕写真の自動撮影・自動結合に成功した(図2)。さらに改良を行い、利便性を向上させたシステムを「広域TEM像自動取得システム」と名付け、様々な植物試料の広域TEM像を取得した。

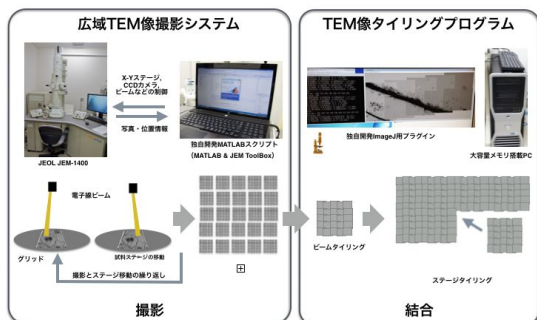


図1

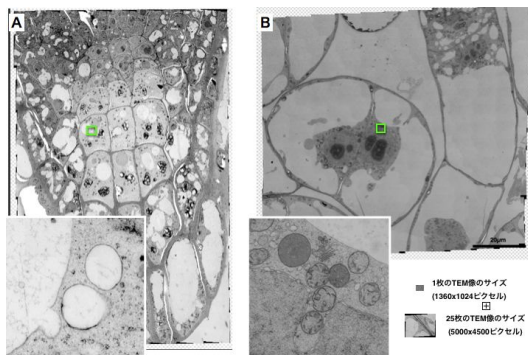


図2

(2)撮影したタバコ培養細胞の広域TEM像を用いて、増殖期と定常状態期の細胞内小器官の定量し、増減や超微細形態の変化を明らかにし、学会発表するとともに国際雑誌 Plant Cell Physiol 及び Plant Signaling & Behav. に掲載された(図3)。また、シロイヌナズナ根端に ER body 様の未同定の構造体を見出し、学会発表した。

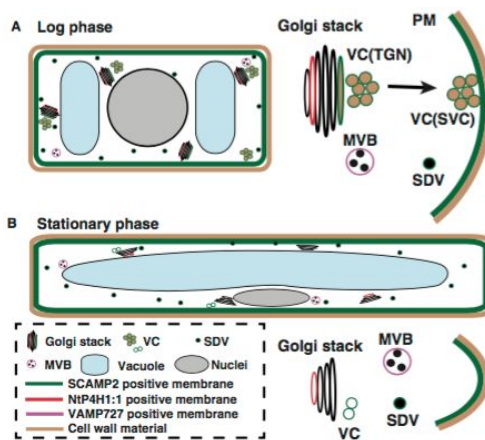
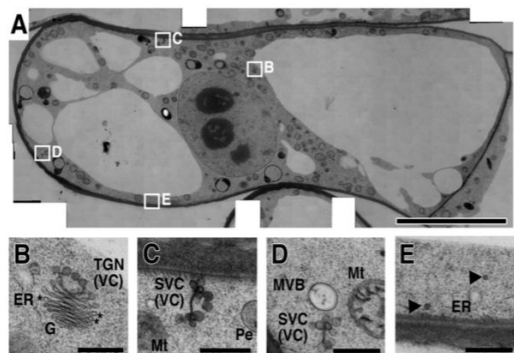


図3

(3)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するために、様々なプログラムの組み合わせ、拡大縮小表示可能な安定したウェブサイト「電顕アトラス」を構築した。さらに、電顕アトラスを外部公開できるようにサーバーをセットアップし、外部公開してスマートフォンやタブレットから接続テストを繰り返し行い、共同研究者らに公開した(図4)。

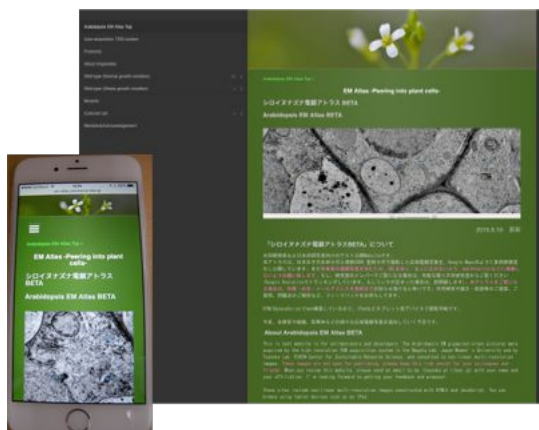


図4

(4)取得した植物細胞の広域TEM像を用いて、東京大学 桧垣博士らとともに細胞小器官の自動認証プログラムの構築を進め、根端におけるゴルジ体やデンプン顆粒などの自動抽出に成功し、論文にまとめ国際雑誌 Nature Communication に掲載された。

本研究は、日本植物生理学会、日本顕微鏡学会、日本植物形態学会など国内学会で毎年発表するとともに、公開シンポジウムや国際会議等で報告した。

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 26 件)

1. K. Toyooka, M. Sato, M. Wakazaki, K. Matsuoka., (2016) Morphological and quantitative changes in mitochondria, plastids, and peroxisomes during the log-to-stationary transition of the growth phase in cultured tobacco BY-2 cells. *Plant Signaling & Behavior*. 11:e1149669, (査読有) doi: 10.1080/15592324.2016.1149669.
2. 豊岡公德 (2016)「光-電子相関顕微鏡法: 蛍光タンパク質標識した細胞小器官を走査電子顕微鏡で捉える」日本植物形態学会誌 *Plant Morphology* (査読無) 印刷中
3. Toyosawa Y, Kawagoe Y, Matsushima R, Crofts N, Ogawa M, Fukuda M, Kumamaru T, Okazaki Y, Kusano M, Saito K, Toyooka K, Sato M, Ai Y, Jane JL, Nakamura Y, *Fujita N. (2015) Deficiency of Starch Synthase IIIa and IVb Alters Starch Granule Morphology from Polyhedral to Spherical in Rice Endosperm. *Plant Physiol*. 170: 1255-1270. (査読有) doi: 10.1104/pp.15.01232.
4. Cui S, Wakatake T, Hashimoto K, Saucet SB, Toyooka K, Yoshida S, Shirasu K. (2015) Haustorial Hairs Are Specialized Root Hairs That Support Parasitism in the Facultative Parasitic Plant *Phtheirospermum japonicum*. *Plant Physiol*. 170:1492-1503. (査読有) doi: 10.1104/pp.15.01786
5. Akita K, Kobayashi M, Sato M, Kutsuna N, Ueda T, Toyooka K, Nagata N, Hasezawa S, Higaki T. (2015) Cell wall accumulation of fluorescent proteins derived from a trans-Golgi cisternal membrane marker and paramural bodies in interdigitated Arabidopsis leaf epidermal cells. *Protoplasma*. (査読有) doi: 10.1007/2Fs00709-016-0955-1
6. Atarashi K, Tanoue T, Ando M, Kamada N, Nagano Y, Narushima S, (11名), Toyooka K, (13名), Honda K. (2015) "Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells." *Cell* (査読有) doi: 10.1016/j.cell.2015.08.058
7. Onda, Y. Hashimoto, K. Yoshida, T. Sakurai, T. Sawada, Y. Hirai, Y. M. Toyooka, K. Mochida, K. and Shinozaki, K. (2015) "Determination of growth stages and metabolic profiles in *Brachypodium distachyon* for comparison of developmental context with Triticeae crops", *Proc.B*, (査読有) doi: 10.1098/rspb.2015.0964
8. T. Higaki, N. Kutsuna, K. Akita, M. Sato, F. Sawaki, M. Kobayashi, N. Nagata, K. Toyooka, S. Hasezawa. (2015) Semi-automatic organelle detection on transmission electron microscopic images, *Scientific Reports* (査読有) doi: 10.1038/srep07794
9. Odahara, M., Masuda, Y., Sato, M., Wakazaki, M., Harada, C., Toyooka, K., and Sekine, Y. (2015) RECG Maintains Plastid and Mitochondrial Genome Stability by Suppressing Extensive Recombination between Short Dispersed Repeats. *PLOS Genetics* 11: e1005080 (査読有) doi: 10.1371/journal.pgen.1005080
10. 豊岡公德 (2015)「高圧凍結技法を用いた細胞内小胞輸送経路の解明」*医学生電顕技術誌* 28: 62-63 (査読無)
11. Toyooka K., Sato, M., Kutsuna N, Higaki T, Sawaki F, Wakazaki M, Goto Y, Hasezawa S, Nagata N, Matsuoka K, (2014) Wide-range high-resolution transmission electron microscopy reveals morphological and distributional changes of endomembrane compartments during log-to-stationary transition of growth phase in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol*. 55, 1544-1555 (査読有) doi: 10.1093/pcp/pcu084
12. Takahashi, T., Sato, M., Toyooka, K., Nozaki, H., (2014) Surface Ornamentation of *Cyanophora paradoxa* Cells as Revealed by Ultra-High Resolution Field Emission Scanning Electron Microscopy, *Cytologia* 79: 1-5 (査読有) doi: 10.1111/tpj.13067.
13. Xu B, Ohtani M, Yamaguchi M, Toyooka K, Wakazaki M, Sato, M., Kubo M, Nakano Y, Sano R, Hiwatashi Y, Murata T, Kurata T, Yoneda A, Kato K, Hasebe M, Demura T., (2014) Contribution of NAC Transcription Factors to Plant Adaptation to Land. *Science*. 2014; 343:1505-1508. (査読有) DOI: 10.1126/science.1248417
14. Yoshimoto, K., Shibata, M., Kondo M., Oikawa K., Sato, M., Toyooka K.,

- Shirasu K., Nishimura M., Ohsumi Y. (2014) Quality control of plant peroxisomes in organ specific manner via autophagy. *J. Cell Sci.* 127: 1161-1169 (査読有) doi: 10.1242/jcs.139709
15. Takahashi, T., Sato, M., Toyooka, K., Matsuzaki, R., Kawafune, K., Kawamura, M., Okuda, K., Nozaki, H., (2014) Five *Cyanophora* species delineated based on morphological and molecular data. *J. Phycology* 50: 1058-1069 (査読有) DOI: 10.1111/jpy.12236
16. 豊岡公德, 佐藤繭子, 朽名夏磨, 永田典子 (2014) 「高圧凍結技法を取り入れた広域透過電顕像自動取得システムの開発とその応用」 *Plant Morphology* 26, 3-8 (査読なし) doi.org/10.5685/plmorphol.26.3
17. Kobayashi K, Fuji S., Sato, M., Toyooka K., Wada H, (2014) Specific role of phosphatidylglycerol and functional overlaps with other thylakoid lipids in Arabidopsis chloroplast biogenesis. *Plant Cell Reports* 34:631-42 (査読有), doi: 10.1007/s00299-014-1719-z
18. Toyooka, K. Kang, B-H, (2014) Reconstructing plant cells in 3D by serial section electron tomography., *Methods Mol., Biol.* 1080, 159-170 (査読無) doi: 10.1007/978-1-62703-643-6_13
19. Yamauchi N., Goshō T., Asatsuma S., Toyooka K., Fujiwara T., Matsuoka K. (2013) Polarized localization and borate-dependent degradation of the Arabidopsis borate transporter BOR1 in tobacco BY-2 cells. *F1000Res.* 13;2:185. (査読有) doi: 10.12688/f1000research.2-185.v1.
20. Kobayashi K, Sasaki D, Noguchi K, Fujinuma D, Komatsu H, Kobayashi M, Sato, M., Toyooka K., Sugimoto K, Niyogi KK, Wada H, Masuda T. (2013) Photosynthesis of Root Chloroplasts Developed in Arabidopsis Lines Overexpressing GOLDEN2-LIKE Transcription Factors. *Plant Cell Physiol.* 54: 1365-1377 (査読有) doi: 10.1093/pcp/pct086
21. Osanai, T., Kuwahara, A., Iijima, H., Toyooka, K., Sato, M., Tanaka, K., Ikeuchi, M., Saito, K. and Hirai, M.Y. (2013) Pleiotropic effect of sigE overexpression on cell morphology, photosynthesis, and hydrogen production in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant J.*, 76: 456-465(査読有) doi: 10.1111/tpj.12310
22. Kawafune, K., Sato, M., Toyooka, K., Nozaki, H. (2013) Ultrastructure of the rickettsial endosymbiont "MIDORIKO" in the green alga *Carteria cerasiformis* as revealed by high-pressure freezing and freeze-substitution fixation. *Protoplasma* 250: 949-953 (査読有) doi: 10.1007/s00709-012-0469-4
23. Kobayashi, K., Narise, T., Sonoike, K., Hashimoto, H., Sato, N., Kondo, M., Nishimura, M., Sato, M., Toyooka, K., Sugimoto, K., Wada, H., Masuda, T., Ohta, H., (2013) Role of galactolipid biosynthesis in coordinated development of photosynthetic complexes and thylakoid membranes during chloroplast biogenesis in Arabidopsis. *Plant J* 73: 250-261 (査読有) DOI: 10.1111/tpj.12028
24. 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: 729-736 (査読有) doi: 10.1038/ni.2352.
25. Bunsupa S., Katayama K., Ikeura E., Oikawa A., Toyooka, K., *Saito K., and Yamazaki M. (2012) Lysine Decarboxylase Catalyzes the First Step of Quinolizidine Alkaloid Biosynthesis and Coevolved with Alkaloid Production in Leguminosae. *Plant Cell*, 24: 1202-1216. (査読あり) doi: 10.1105/tpc.112.095885
26. 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: 1081-955 (査読有) doi: http:// dx. doi. org/ 10. 1105/ tpc. 111. 092254
- 〔学会発表〕(計 14件)
橋本恵, 成川苗子, 若崎真由美, 佐藤繭子, 永田典子, 岡本龍史, 豊岡公德「小胞体から液胞への KDEL タンパク質の大量輸送に ER ボディが関与する〜ギガピクセルTEM像を用いて〜」第57回日本植物生理学会年回 2016年3月19日 岩手大(岩手県盛岡市)
- 豊岡公德「光顕と電顕で植物の成長を担うタンパク質の輸送・分解機構を明らかにする」日本女子大バイオイメージングセンターシンポジウム2015, 2015年12月5日 日本女子大(東京都文京区)
- Toyooka K., Hashimoto K, Narikawa N, Wakazaki M, Sato M, Nagata N, Okamoto T "Ultrastructural analysis of the ER bodies in the Arabidopsis root tip cells: Using Gigapixel images"

International microscopy workshop on plant sciences 2015, 2015年11月24日
兵庫県立大(兵庫県姫路市)

豊岡公德「光-電子相関顕微鏡法:蛍光タンパク質標識した細胞小器官を走査電子顕微鏡で捉える」日本植物学会第79回大会シンポジウム「形態学と生理学の融合に向けて-植物の形と現象の狭間を埋める研究の最前線-」2015年9月6日 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

Toyooka K, Sato M, Wakazaki M, Hashimoto K, Kobayashi M, Sawaki F, Kutsuna N, Nagata N. "Construction of Arabidopsis Electron Microscope Atlas" The 26th International Conference on Arabidopsis Research 2015年7月5-9日 Palais Des Congres (Paris, France)

豊岡公德, 佐藤繭子, 若崎真由美, 橋本恵, 小林恵, 澤木史江, 朽名夏磨, 永田典子「シロイヌナズナ電顕アトラス」の構築」日本顕微鏡学会第71回学術講演会 2015年5月13日 京都国際会館(京都府京都市)

豊岡公德, 佐藤繭子, 若崎真由美, 朽名夏磨, 永田典子, 松岡健「対数増殖期および定常状態期におけるタバコ培養細胞内オルガネラの超微形態変化」日本植物生理学会第56回大会 2015年3月16日 東京農大(東京都世田谷区)

豊岡公德, 佐藤繭子, 若崎真由美, 朽名夏磨, 永田典子, 松岡健「広域TEM像取得システムを用いたタバコ培養細胞のオルガネラ定量解析」日本植物形態学会 2014年9月11日 東京農大(東京都世田谷区)

豊岡公德「高圧凍結技法を用いた細胞内小胞輸送経路の解明」医学生物学電子顕微鏡技術学会 第30回学術講演会 2014年5月24日 大阪大(大阪府大阪市)

豊岡公德, 佐藤繭子, 朽名夏磨, 若崎真由美, 澤木史江, 桧垣匠, 馳澤盛一郎, 永田典子, 松岡健「広域TEM像取得システムと高圧凍結技法を用いた細胞内輸送系膜区画の超微形態解析」日本顕微鏡学会第70回学術講演会 2014年5月11日 幕張メッセ(千葉県千葉市)

豊岡公德, 佐藤繭子, 朽名夏磨, 若崎真由美, 澤木史江, 桧垣匠, 馳澤盛一郎, 永田典子, 松岡健「細胞増殖期および定常状態期における分泌系オルガネラの電顕アトラス解析」第55回日本植物生理学会年会 2014年3月18日 富山大(富山県富山市)

豊岡公德, 佐藤繭子, 朽名夏磨, 永田典子「高圧凍結技法を取り入れた広域透過電顕像撮影システムの開発とその応用」日本植物学会第77回大会シンポジウム 2013年9月13日 北海道大(北海道札幌市)

豊岡公德「電子顕微鏡法による新規細胞内小包輸送経路の解明」日本顕微鏡学会第69回学術講演会冠ワークショップ第六回 風戸賞受賞講演 2013年5月21日 ホテル阪急エキスポパーク(大阪府大阪市)

豊岡公德, 佐藤繭子, 朽名夏磨, 若崎真由美, 澤木史江, 桧垣匠, 馳澤盛一郎, 永田典子, 松岡健「細胞増殖期および定常状態期における分泌系オルガネラの電顕アトラス解析」第55回日本植物生理学会年会 2013年3月21日 岡山大学(岡山県岡山市)

持田恵一/豊岡公德:「生体顕微マルチスケールマッピングシステムの開発:透過電顕像とオミックス情報の融合」平成24年度ワークショップ「実験生物学と情報学的アプローチのシームレスな融合」 2012年6月13日 奈良先端技術大学院大学(奈良県奈良市)

[その他]

ホームページ: <http://bioem.riken.jp>

6. 研究組織

(1) 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・質量分析・顕微鏡解析ユニット・上級研究員
研究者番号: 10360596

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

研究協力者

佐藤 繭子 (SATO MAYUKO)
持田 恵一 (MOCHIDA KEIICHI)
永田 典子 (NAGATA NORIKO)
松岡 健 (MATSUOKA KEN)
馳澤 盛一郎 (HASEZAWA SEIICHIRO)
朽名 夏磨 (KUTUSNA NATUMARO)
桧垣 匠 (HIGAKI TAKUMI)
若崎 真由美 (WAKAZAKI MAYUMI)
橋本 恵 (HASHIMOTO KEI)