

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860128

研究課題名(和文) 先進的な3Dイメージング技法によるゴルジ装置の全体像とその多様性の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the 3D structure and morphological diversity of the Golgi apparatus by modern 3D imaging technique

研究代表者

甲賀 大輔 (Koga, Daisuke)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30467071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、array tomography法を新たに開発した。この手法を用いることで、これまで解析が困難であった空間的に複雑な形状を呈するゴルジ装置の3D全体像の解析が可能となった。その結果、ゴルジ装置の3D形状は多様であり、細胞種によって様々であることがわかった。また、この小器官が一つの連続した構造体であり、細胞質の広領域を占めることも示すことができた。さらに、蛍光イメージングとオスミウム浸軟法を組み合わせた相関顕微鏡観察法により、去勢後の性腺刺激ホルモン産生細胞のゴルジ装置の形態変化の解析を行った。

研究成果の概要(英文)：The present study developed a novel three-dimensional (3D) imaging technique combining array tomography and osmium impregnation methods. This novel method was applied to analysis of the 3D shape of the entire Golgi apparatus, which exhibits a spatially complex structure. The results clearly demonstrate that complete Golgi apparatus structures are both diverse in shape and cell type-dependent, with each apparatus appearing as a single mass located within a large cytoplasmic region. In addition, morphological changes of the Golgi apparatus were analyzed in gonadotropes before and after castration by correlative light and scanning electron microscopy paired with a combination of immunofluorescence imaging and osmium maceration methods.

研究分野：解剖学

キーワード：ゴルジ装置 相関顕微鏡観察法 Array tomography 3D再構築法

## 1. 研究開始当初の背景

ゴルジ装置は、Camillo Golgi(1898)によって神経細胞体の中に銀で染まる網状構造、すなわち内網装置 (apparato reticolare interno)として発見された。その後、光学顕微鏡(光顕)の観察から、この装置がすべての細胞に存在することが示唆された。さらに、透過電子顕微鏡(透過電顕)の誕生により、ゴルジ装置は数層の扁平な槽(cistern)が何層も積み重なった層板構造を呈し、この装置が空胞(vacuoles)、層板(lamellae)、小胞(vesicles)の三者の集合体であることが明らかになった。また、酵素細胞化学的研究や免疫細胞化学的研究から、ゴルジ装置にシスとトランスの極性(polarity)が存在し、細胞内の物質輸送の中継点としての重要な役割が明らかになってきた。一方、近年の電顕トモグラフィーによるゴルジ装置の立体(3D)構造解析で、ゴルジ装置の微細構造の複雑さが示されるようになった。しかし、観察可能領域が切片の厚み(1 $\mu$ m 厚程度)に制限され、この小器官の全体構築像の解明に至っていない。そこで本研究では、この限界を克服する新たな 3D イメージング技法を開発し、多様な細胞のゴルジ装置の形態解析を試みた。

## 2. 研究の目的

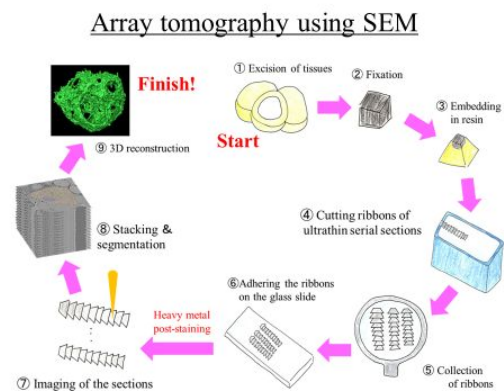
ゴルジ装置が細胞の機能に果たす重要性に比して、その構造の多様性と複雑性については不明な点も多い。そこで本研究は、先端的な 3D 技法を駆使して、光顕レベルと電顕レベルを結び付けたゴルジ装置の 3D 微細構造解析を行う。具体的には、ゴルジ装置の良く発達したラット下垂体性腺刺激ホルモン産生細胞、隣外分泌細胞、精巢上体管細胞を用い、超薄連続切片の走査電子顕微鏡(SEM)像を 3D 再構築する新しい手法を確立し、この小器官の 3D 形態を明らかにする。さらに蛍光イメージング像と

SEM 像の相関顕微観察法や SEM によるゴルジ装置の極性観察法も開発し、ゴルジ装置の複雑な構造の中の極性(シス・トランス)を明らかにし、細胞の機能に関連したゴルジ装置の形態的多様性について明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) Array tomography 法の開発

本研究では、ゴルジ装置の 3D 全体像を解析するための array tomography 法を新たに開発した。オスミウム染色を施した組織をエポキシ樹脂に包埋後、80-100nm 厚の連続切片(300-500 枚)を切削し、ガラススライド上に貼付した。さらに切片はウラン・鉛による電子染色を施し、目的の細胞を SEM により観察した。観察した連続像を基に、細胞、ゴルジ装置、核などの小器官を 3D 再構築した(Koga et al., Microscopy,2016)。

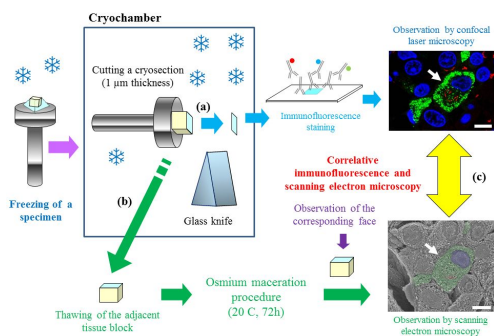


### Array tomography 法のフローチャート

### (2) 蛍光イメージングと SEM 像の相関顕微鏡観察法の開発

オスミウム浸軟法は、ゴルジ装置などの細胞小器官の 3D 表面微細構造を再構築することなく観察することができる手法である。しかしながら、この手法は固定や浸軟処理にオスミウム酸を使用するため、免疫組織化学染色の応用が困難であった。そこで本研究では、この問題を解決するため、凍結切片法とオスミウム浸軟法を効果的に組み合わせた新たな

な手法を開発した。徳安の凍結切片法に準じて準超薄凍結切片を作製後、ゴルジ装置や小胞体、ホルモンなどの目的分子の抗体を用い、蛍光免疫組織化学染色を行った。一方、切片切削後の隣接ブロックは解凍後、オスミウム浸軟処理を施した。最後に、蛍光免疫染色切片と隣接オスミウム浸軟ブロックを対比観察した(Koga et al., J Histochem Cytochem, 2015)。



蛍光イメージングとSEM像の相関顕微鏡観察法のフローチャート

### (3) SEMによるゴルジ装置の極性観察法の開発

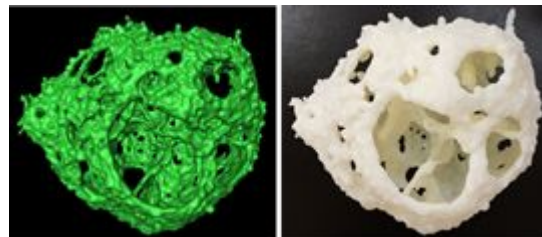
ゴルジ装置のシス染色法として古くから知られているオスミウム染色法とオスミウム浸軟法を組み合わせた手法を開発した。オスミウム染色した組織にオスミウム浸軟処理を施すことで、オスミウム浸軟像にゴルジ装置の極性を示すことが可能となった(Koga et al., J Microsc, 2016)。

## 4. 研究成果

### (1) ゴルジ装置の3D全体像の解析

新たに開発したarray tomography法を用い、ラット精巣上体管上皮主細胞、膵臓外分泌細胞、下垂体性腺刺激ホルモン産生細胞のゴルジ装置の3D全体像の解析を行った。精巣上体管上皮主細胞では、ゴルジ装置は核上部に位置し、その形状はチューリップの花弁のようであった。また、膵臓外分泌細胞のゴルジ装置は、核上部に位置し、複雑なりボン状の

形態を呈していた。一方、性腺刺激ホルモン産生細胞では、ゴルジ装置は細胞の中心部に位置し、その形状は球体という特殊な形状であることがわかった。これらの結果から、ゴルジ装置の3D全体像は細胞種によって多様であること、また、ゴルジ装置は一つの連続した構造体であることも示すことができた(Koga et al., Microscopy, 2016)。

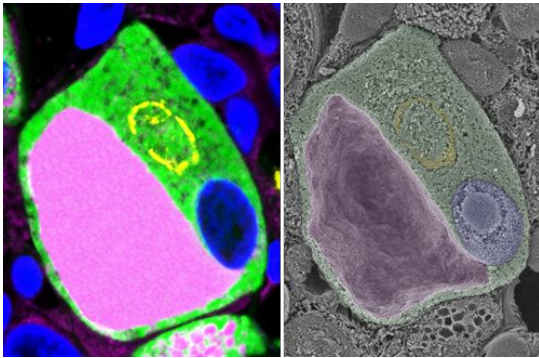


性腺刺激ホルモン産生細胞ゴルジ装置の3Dモデル：左)3D再構築像；ゴルジ装置の形状が球体であることが理解できる。右)3Dプリントモデル；再構築した像を3Dプリントすることで、ゴルジ装置3D形態のさらなる理解が期待できる。

### (2) 機能変化に伴う性腺刺激ホルモン産生細胞ゴルジ装置の3D微細構造解析

下垂体前葉は、多種類のホルモン産生細胞が混在する複雑な組織であり、各前葉ホルモン産生細胞の同定には、免疫組織化学手技が必要不可欠である。そこで本研究では、新たに開発した蛍光イメージングとオスミウム浸軟SEM観察法を組み合わせた相関顕微鏡観察法を用い、性腺刺激ホルモン産生細胞のゴルジ装置の3D微細構造の形状と、去勢後の機能変化に伴うゴルジ装置の形態変化を詳細に解析した。その結果、蛍光イメージングとSEM観察像の相関観察により、性腺刺激ホルモン産生細胞のゴルジ装置が球体であることを証明することができた。また、去勢後早期にみられる性腺刺激ホルモン産生細胞の形態変化(ゴルジ装置の分散、小胞体膜の集積、ミトコンドリアの拡張)を分子の局在と合わせて解析することもできた(Koga et

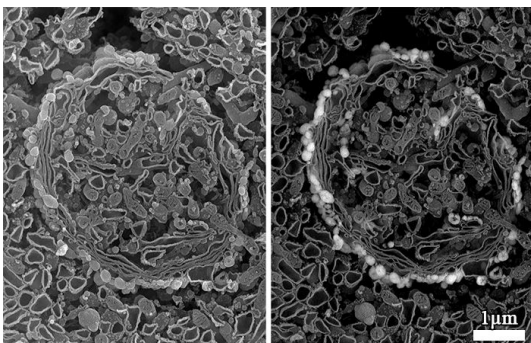
al., J Histochem Cytochem, 2015; Koga et al., BioMed Res, 2017)。



蛍光イメージングとSEM像の相関顕微鏡観察(去勢後3M後の性腺刺激ホルモン産生細胞):左)蛍光イメージング像;緑(性腺刺激ホルモン産生細胞)、黄(ゴルジ装置)、桃(小胞体)、青(核)。右)隣接ブロックSEM像:蛍光像とSEMオスミウム浸軟像の相関観察法により、去勢後の性腺刺激ホルモン産生細胞の形態変化を分子の局在と合わせて解析することができた。

### (3) SEMによるゴルジ装置の極性観察

オスミウム染色法とオスミウム浸軟法を組み合わせた手法を用い、精巣上体管上皮主細胞、下垂体前葉細胞、脊髄神経節細胞のゴルジ装置の極性(シス側)をSEM観察により同定することができた。ゴルジ装置の極性を知ることは、細胞の極性や分泌経路を解明する上で重要である。今後はこの手法を用い、SEMにより様々な細胞のゴルジ装置の極性を明らかにし、細胞の機能とゴルジ装置の形態的關係を明らかにしていきたい。



SEMによるゴルジ装置の極性観察(性腺刺激

ホルモン産生細胞):左)二次電子像;球体のゴルジ装置が観察される。右)反射電子像:オスミウムで染色されたシス槽が強い信号として観察できる(Koga et al., J Microsc, 2016)。

## 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 11 件)

Koga D, Bochimoto H, Kusumi S, Ushiki T, Watanabe T: Changes in the three-dimensional ultrastructure of membranous organelles in male rat pituitary gonadotropes after castration. Biomed Res. 38: 1-18. (2017) 査読有

Koga D, Ushiki T and Watanabe T: Novel scanning electron microscopy methods for analyzing the 3D structure of the Golgi apparatus. Anat Sci Int. 92: 37-49. (2017) 査読有

Nakao M, Waki T, Sasaki M, Anders JL, Koga D, Asakawa M: Brachylaima ezohelicis sp. nov. (Trematoda: Brachylaimidae) found from the land snail Ezohelix gainesi, with a note of an unidentified Brachylaima species in Hokkaido, Japan. Parasitol Int. 66: 240-249. (2017) 査読有

Kariya T, Ueta H, Xu XD, Koga D, Ezaki T, Yu E, Kusumi S, Kitazawa Y, Sawanobori Y, Ushiki T, Issekutz T, Matsuno K: Direct evidence for activated CD8+ T cell transmigration across portal vein endothelial cells in liver graft rejection. J Gastroenterol. 51: 985-998. (2016) 査読有

Koga D, Bochimoto H, Watanabe T and Ushiki T: Backscattered electron image of osmium-impregnated/macerated tissues as a novel technique for identifying the cis-face of the Golgi apparatus by high-resolution scanning electron microscopy. J. Microscopy. 263: 87-96. (2016) 査読有

**Koga D**, Kusumi S, Ushiki T: Three-dimensional shape of the Golgi apparatus in different cell types: serial section scanning electron microscopy of the osmium-impregnated Golgi apparatus. *Microscopy*. 65: 145-157. (2016). 査読有

**Koga D**, Kusumi S, Bochimoto H, Watanabe T, Ushiki T: Correlative Light and Scanning Electron Microscopy for Observing the Three-Dimensional Ultrastructure of Membranous Cell Organelles in Relation to their Molecular Components. *J. Histochem. Cytochem.* 63: 968-979. (2015) 査読有

**Koga D**, Kusumi S, Shodo R, Dan Y and Ushiki T: High resolution imaging by scanning electron microscopy of semithin sections in correlation with light microscopy. *Microscopy*. 64: 387-394. (2015) 査読有

Kusumi S, **Koga D**, Kanda T and Ushiki T: Three-dimensional reconstruction of serial sections for analysis of the microvasculature of the white pulp and the marginal zone in the human spleen. *Biomed Res.* 36:195-203. (2015) 査読有

Watanabe T, Bochimoto H, **Koga D**, Hosaka M and Ushiki T: Functional Implications of the Golgi and Microtubular Network in Gonadotropes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 385: 88-96. (2014) 査読有

**甲賀大輔**, 久住聡, 牛木辰男: 連続切片 SEM法とゴルジ装置の3D構造解析への応用. *顕微鏡*. 49: 171-175. (2014) 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

**甲賀大輔**: SEM 試料作製法の基礎: 第 73 回日本顕微鏡学会学術講演会(招待講演)、2017 年 5 月 30-6 月 1 日、札幌コンベンションセンター

**甲賀大輔**, 久住聡、牛木辰男、渡部剛: 免疫組織化学染色切片とオスミウム浸軟組織

の相関顕微鏡法: 第 73 回日本顕微鏡学会学術講演会(シンポジウム講演)、2017 年 5 月 30-6 月 1 日、札幌コンベンションセンター

**甲賀大輔**, 久住聡、柴田昌宏、渡部剛: 連続切片 SEM 法による内分泌細胞ゴルジ装置の 3D 構造解析: 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017 年 3 月 28-30 日、長崎大学

**甲賀大輔**, 渡部剛: ゴルジ装置の 3D 構造解析: 平成 28 年度日本顕微鏡学会北海道支部講演会、2017 年 12 月 10 日、北海道大学

**甲賀大輔**, 久住聡、暮地本宙己、牛木辰男、渡部剛: SEM による準超薄切片の超薄像観察: 日本解剖学会第 62 回東北・北海道連合支部学術集会、2017 年 9 月 3-4 日、帯広畜産大学

**甲賀大輔**, 久住聡、暮地本宙己、渡部剛、牛木辰男: SEM による準超薄切片の超薄像観察: 第 72 回日本顕微鏡学会学術講演会、2016 年 6 月 14-16 日、仙台国際センター

**甲賀大輔**: 走査電子顕微鏡試料作製法: 第 72 回日本顕微鏡学会学術講演会(招待講演)、2016 年 6 月 14-16 日、仙台国際センター

**甲賀大輔**, 久住聡、暮地本宙己、牛木辰男、渡部剛: 最先端の 3D イメージング技法によるゴルジ装置の形態的多様性の観察: 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会(シンポジウム講演)、2016 年 3 月 28-30 日、ピックパレットふくしま

**甲賀大輔**, 久住聡、暮地本宙己、渡部剛: 準超薄切片の超薄像観察法(SEM 切片法)の開発と応用: 平成 27 年度日本顕微鏡学会北海道支部講演会(招待講演)、2015 年 12 月 12 日、北海道大学

**甲賀大輔**, 久住聡、暮地本宙己、渡部剛、牛木辰男: 蛍光免疫染色像とオスミウム浸軟 SEM 像の相関顕微鏡観察法の開発: 日本解剖学会第 62 回東北・北海道連合支部学術集会、2015 年 8 月 29-30 日、盛岡市観光文化交流センター

**甲賀大輔**：凍結割断による生物試料の観察：SCANTECH 2015(シンポジウム講演)、2015年9月11日、東京都市大学世田谷キャンパス

**甲賀大輔**、久住聡、牛木辰男：連続切片走査電子顕微鏡観察・3D再構築法によるゴルジ装置の立体構造解析：第71回日本顕微鏡学会学術講演会(シンポジウム講演)、2016年5月13-15日、国立京都国際会館

**Koga D**, Kusumi S and Ushiki T: Serial section scanning electron microscopy and its application for the morphological analysis of the Golgi apparatus: 第120回日本顕微鏡学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会合同大会(シンポジウム講演)、2015年3月21-23日、神戸国際会議場

**甲賀大輔**、牛木辰男：連続切片SEM法によるゴルジ装置の3D構造解析：生理学研究so研究会(招待講演)、2014年11月12-13日、生理学研究所

**甲賀大輔**、牛木辰男：走査電子顕微鏡による下垂体前葉細胞の3D微細構造解析：第18回日本内分泌病理学会学術総会(招待講演)、2014年11月1-2日、都道府県会館(東京都千代田区)

**甲賀大輔**、牛木辰男：バイオ研究におけるSEMの応用：SCAN TECH 2014(招待講演)、2014年9月12日、東京都市大学

**甲賀大輔**、久住聡、暮地本宙己、渡部剛、牛木辰男：蛍光イメージングと走査電子顕微鏡像の対比法：第70回日本顕微鏡学会学術講演会(招待講演)、2014年5月11-13日、幕張メッセ

**甲賀大輔**、久住聡、牛木辰男：連続切片走査電子顕微鏡・3D再構築法によるゴルジ装置の立体構造解析：第70回日本顕微鏡学会学術講演会(招待講演)、2014年5月11-13日、幕張メッセ

〔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〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

甲賀 大輔 (KOGA, Daisuke)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30467071