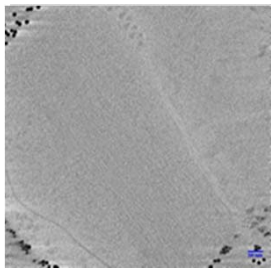




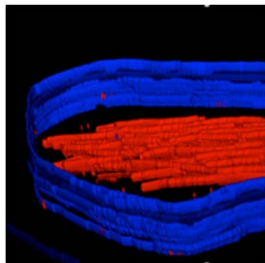
超高压電子顕微鏡を用いた培養細胞のクライオ観察などにより、数 μm の厚さを持つ生体試料について、その詳細な微細構造を明らかにできます。生体試料を急速凍結により非晶質の氷中にミリ秒の時間オーダーで閉じ込めて、天然に近い構造を観察することができます。具体的な再構成法としては、電子線トモグラフィー法と単粒子解析法について、適した電子顕微鏡画像収集を支援します。電子線トモグラフィー法を利用すれば、細胞などのナノメートルレベルの立体構造を明らかにすることができます。また、単粒子解析法を用いれば、比較的大きな生体高分子複合体の構造を原子レベルで明らかにすることも可能です。



培養細胞の電子線トモグラフィーによる三次元再構成結果。糸状仮足内のアクチンバンドルなどを観察することができる。



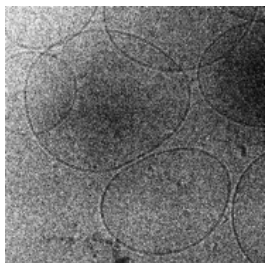
物質・生命科学超高压電子顕微鏡。用いる電子線の高い透過能のために、厚さ数マイクロメートルに及ぶ厚膜試料を高い空間分解能で観察できる。



上の再構成像から、膜とアクチンバンドルの位置を同定し、それを模式的に示した図。膜が青でアクチンバンドルが赤で示されている。



電子直接検出カメラ(Gatan社製K2 ISカメラ)。このカメラを用いることで、解像度の良い動画が撮影でき、像移動を補正した分解能が良い画像が得られる。



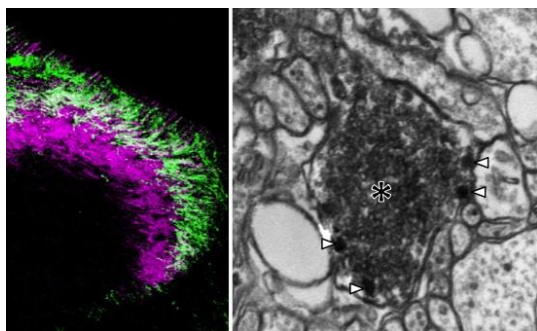
クライオ観察によりリポソームの大きさやその内包物などの確認も行う事ができる。その他、水溶液中での状況を確認できる。



急速凍結装置。湿度をコントロールして、微量の溶液でも乾燥せずに凍結することができる。また、装置を用いることで氷の厚さなどの再現性が増す。



GFP標識、および二重標識の免疫電子顕微鏡（電顕）支援を行う。GFP等の蛍光タンパク質に対する免疫電顕の技術支援を行う。また、二重免疫電顕を用いて、標的分子の微細構造レベルでの細胞内局在を観察する技術支援を行う。支援可能な動物種は、脊椎動物全般。ただし、GFP以外の抗原に対しての標識が必要な場合は、ウエスタンブロット・光学顕微鏡等で抗体の特異性をバリデーション済みの抗体持参が条件。あるいは、GFP等が遺伝子導入されたモデル動物、GFPを発現する細胞株等が必要。この場合、何れも光学顕微鏡レベルで蛍光シグナルが増感なしで観察可能であることが条件。その他の蛍光タンパク質やモデル植物については応相談。



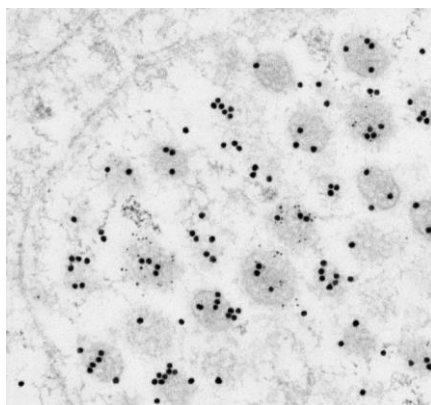
げっ歯類の脊髄におけるペプチド性神経終末（緑）に対する包埋前免疫電顕像（アスタリスク）。矢頭は陽性小胞を示す。



透過型電子顕微鏡
（Hitachi H-7650）



ウルトラミクロトーム2台
（Leica UC7; Reichert
ULTRACUT-E）



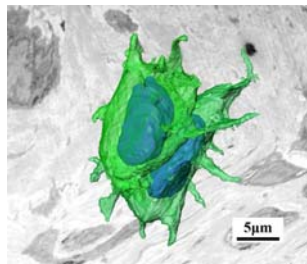
げっ歯類の下垂体後葉における多重免疫電子顕微鏡像の一例。免疫陽性反応が、それぞれ5nmと15 nmの金粒子により標識され、区別することができる。



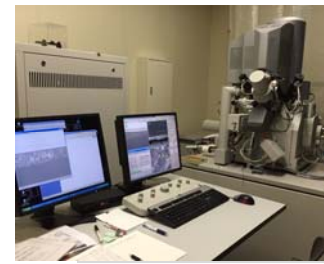
自動凍結置換システム
（Leica EM AFS2）



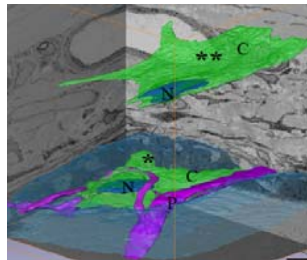
FIB/SEM tomographyをはじめとする、新機軸電顕FIB/SEMをもちいた研究の支援を目指す。本法では、エポンブロック表面の試料の広範囲にわたる高分解能平面画像が得られると共に、その中の特定の領域の三次元微細構造解析を可能とする連続画像が取得できる。未だ開発途上である要素も多く、画像の取得、さらには得られた画像の解析に独自の新機軸展開の余地を残す。本支援では、申請者らが期待するゴールを詳細に検討した上で、しかるべき着地点を見出し、技術支援を行う。FIB/SEMの特性を考慮して、SBF-SEM法など、本支援プラットフォーム内の他の支援プロジェクトの利用も視野に、コンサルテーションにおいて対象とする試料のサイズ、固定・ブロック染色法等を検討する。



FIB/SEM tomographyを用いた、出生後1週ラットの腱骨付着部に存在する細胞の三次元再構築像。幼若なコラーゲン線維束間に不規則な突起を伴った楕円形の細胞が認められる。
Three-dimensional ultrastructural analysis of development at the supraspinatus insertion by using focused ion beam/scanning electron microscope tomography in rats. J Orthop Res. 2015



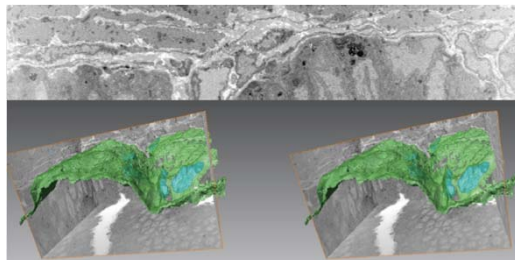
FIB/SEM (Quanta 3D FEG, F.E.I.): ブロック表面の組成コントラスト像 (BFI: block face imaging) 観察ができるFE-SEM。その鏡体内に装着されたfocused gallium ion beam (FIB) により精密超薄切削が可能である。切削とBFI撮影の繰り返しにより半自動で連続高解像画像が取得できる。



FIB/SEM tomographyを用いた、ラット骨膜におけるPerforating fibre(紫)の三次元再構築像。Perforating fibre及びこれに近接する細胞や結合組織中の線維芽細胞の観察が可能である。P, perforating fibre. C, cytoplasm. N, cell nucleus. Bar scale: 5µm.
Anchoring structure of the calvarial periosteum revealed by focused ion beam/scanning electron microscope tomography. Sci Rep. 2015



Ultramicrotome: FIB/SEMによるBFI画像取得のためにはブロック表面に試料が露出していることが必須であり、また、観察領域決定のために平面像の観察が必要となる。通常エポン包埋された試料表面の面出しおよびトリミングを行うためにultramicrotomeをもちいる。



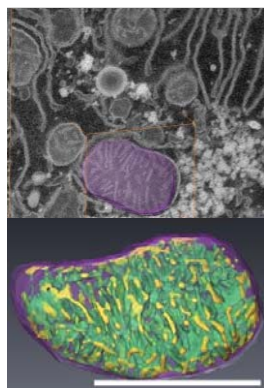
精囊上皮下の間質細胞の三次元再構築像(ステレオペア)。1枚の切片像では長い突起を有すると解釈されてきた間質細胞(緑)であるが、再構築像では極めて薄く、平坦なシートであることが認められる。
細胞工学「1枚の写真館」2015



Amira/Avizo 画像解析ワークステーション: FIB/SEMで得られた連続高解像画像のセグメンテーションおよび三次元再構築を実行し、解析するための画像処理用ワークステーション

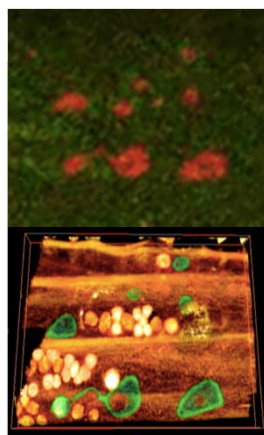


蛍光顕微鏡で観察したその場を電子顕微鏡で観察する手法は光-電子相関観察(Correlative light electron microscopy:CLEM)と呼ばれ、特定の時空間で生じる生命現象の構造的背景を電子顕微鏡レベルで明らかにする解析手法である。本支援では最新のFIB-SEM三次元構造解析法を応用したVolume-CLEM技術を用い、蛍光顕微鏡下にライブイメージングされた培養細胞のCLEM観察を支援する。現時点ではルーチンで可能な技術ではないため、試料作成からデータ取得に至る事前の十分な打合せが必要です。



高空間分解能

ここで提供するFIB-SEMトモグラフィーでは、約 $10\mu\text{m}$ 角の領域を約 $5\text{nm} \times 5\text{nm} \times 10 \sim 15\text{nm}$ のボクセルサイズで取得する。サンプル画像の分解能であればミトコンドリアのクリステの立体構造を解析できる。



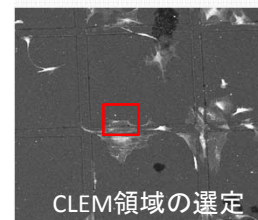
Volume-CLEM

ミトコンドリア蛍光顕微鏡像(上)と同領域のFIB-SEMを用いた三次元再構築像

全く同じ場所をより高分解能で、周囲の情報も含めて、捉えられている。



CLEM用試料



CLEM領域の選定



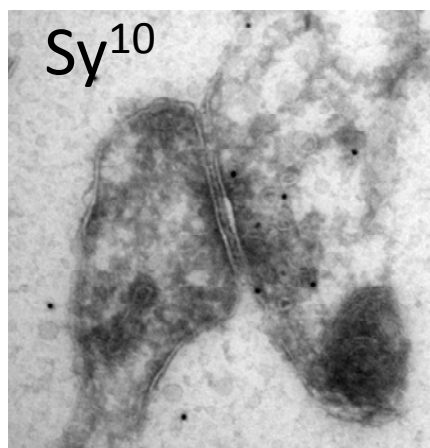
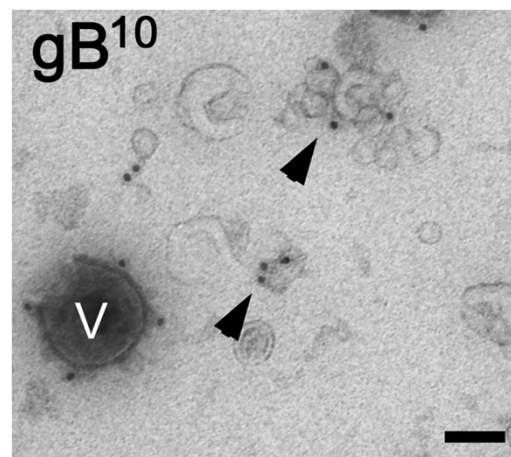
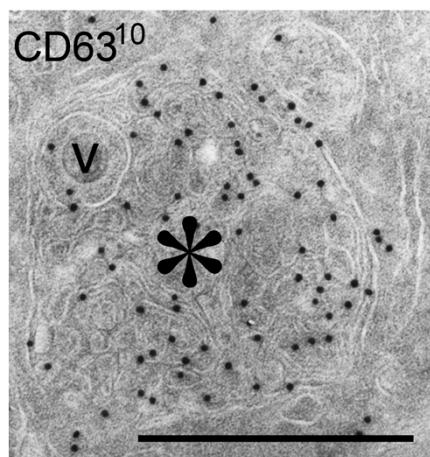
FIB-SEM装置での撮影

基本的な流れ:

観察対象は培養細胞に限定します。光顕観察及び試料作成の途中までは各施設にて実施してください。

提供される試料作製のプロトコルに従い細胞は指定のディッシュ上で培養、各施設でライブイメージングと固定、もしくは固定後に蛍光顕微鏡で観察したものを、樹脂に包埋して下さい。得られたサンプルをCLEM観察に必要なデータとともに送りいただき、FIB-SEMで観察します。データはアライメントを行った状態のVolumeデータとして提供します。

徳安法(凍結超薄切片法)の大きな利点は、試料作成が比較的簡便で、二重(多重)染色が可能で、膜オルガネラの観察に適することです。金コロイドと蛍光標識二次抗体の併用により、電顕観察標本の光顕レベルのマッピングが可能です。また、各種蛍光プローブの蛍光が試料に保持されていることも利点です。近年の技術開発により、単層培養細胞をペレットにせずに試料作成することが可能となり(flat-embedding procedure)、培養神経細胞などでの利用が可能となりました。なお、支援にあたりましては、光学顕微鏡レベルの解析結果を含む抗体の特異性についての情報を提供できることを条件とさせていただきます。



HHV6感染細胞
のmultivesicular
bodyにおける
CD63の局在

HHV6感染細胞上清
中のウイルス粒子・
エクソソームのホー
ルマウント標本にお
けるglycoprotein B
の局在

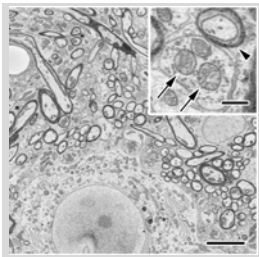
単層培養細胞を用いた徳安法
による樹状突起スパインの
シナプス(シナプトフィジン)



利用する設備：

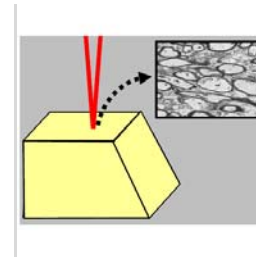
ウルトラクライオミクローム3台(Leica UCT/FC6、UC6/FC6、UC7/FC7)。うち1台(UC6/FC6)は蛍光実体顕微鏡による切削試料の蛍光観察も可能です。

この支援活動では様々な生物試料から樹脂包埋試料を作製し、ミクローム組み込み式走査型電子顕微鏡 (SBF-SEM)を用いて数十～数百 μm におよぶ比較的広い領域から連続断面画像を取得します。そして得られたデータから任意の構造を抽出することで、3次元的超微形態情報を取得し、細胞突起などの複雑な構造の追跡や体積・表面積といった立体的なパラメーターの解析を可能にします。SBF-SEMによるデータ取得はスループットが高く、またこの支援では導電性をもつ特殊な樹脂を用いることで、従来はイメージングが困難であった小さく薄いサンプルからも質の高いデータを取得できる特徴があります。

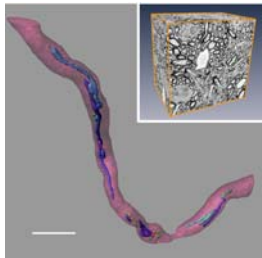


SBF-SEMの画像の一枚。細胞やオルガネラの形態がよく見える。矢頭：有髄軸索。矢印：ミトコンドリア。

Bar: 5 μm 、500nm(inset)



SBF-SEMではダイヤモンドナイフによる切削後、試料表面から走査型電子顕微鏡によるイメージングを行い、連続断面画像を取得します。



3次元再構築像の一例。マウス小脳のデータからブロック状の観察組織全体(inset)と有髄軸索(紫)を再構築し、表示した。

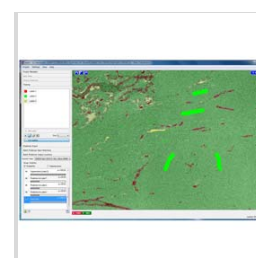
Bar: 5 μm



SBF-SEMの実際の写真。走査型電子顕微鏡(inset)内部にミクロームが取り付けられており、薄切しながら観察することで、連続断面画像を取得します。

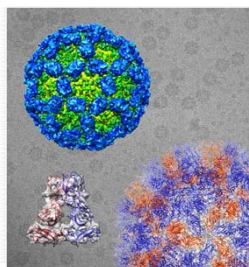


3次元再構築像の一例。マウス大脳皮質の神経細胞の核(赤色)および細胞体(緑色)を抽出し、再構築した。



画像解析画面の一例。特定の構造を抽出することで、3次元再構築像の表示や立体的パラメーターの解析を可能にします。

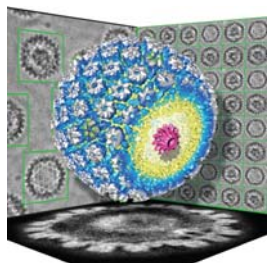
位相差クライオ透過電子顕微鏡 (JEOL 2200FS+Zernike Phase plate) を用いた研究支援を行う。解析手法としては、高分解能電顕像の撮影に加えて、単粒子解析、電顕トモグラフィーにより、試料の三次元構造解析を行う。支援の内容としては、試料作製から、画像データ収集、画像処理、立体再構成、セグメンテーション、ムービー等の作成までを含む。担当者と相談の上、必要な部分の支援を行う。



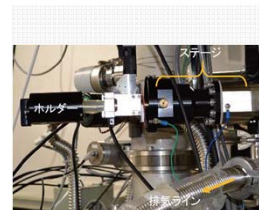
クライオ電顕単粒子解析による
サポウィルスの8Å分解能構造
とホモロジーモデリング
(Miyazaki et al. J. Virol. 2016)



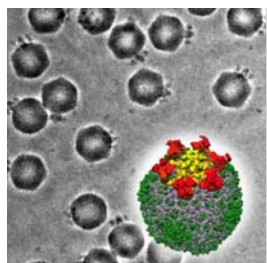
クライオ透過電子顕微鏡 (JEOL 2200FS+Gatan 914 cryo-specimen holder)。生の生物試料の高分解能電顕像を記録する。



位相差クライオ電顕単粒子解析によるヘルペスウイルスのポータル構造
(Rochat et al. J. Virol. 2010)



エアロック式位相板ホルダー。
電顕用位相板は、無染色試料に高い位相コントラストをつける。



バクテリオファージ ϕ 15 のクライオ位相差電顕像と立体再構成像
(Murata et al. Structure 2010)。

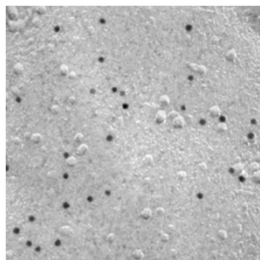


急速凍結装置 (FEI Vitrobot Mark IV)。生の生物試料を急速凍結する。



凍結割断レプリカ免疫標識法 (SDS-digested Freeze-fracture Replica Labeling: SDS-FRL) を用いた膜分子の局在解析を中心に、生体分子の分子発現分布と超微細形態解析の実験支援を行ないます。

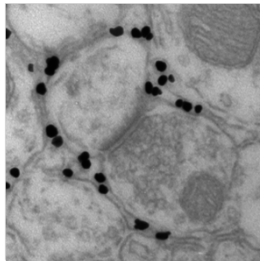
SDS-FRLは、標的分子の細胞膜上分布を裏打ちタンパク質の影響を受けずに可視化できる点で、既存の免疫電子顕微鏡法(プレエンベディング法やポストエンベディング法)より優れており、膜分子の2次元的な配置情報を高感度且つ定量的に取得できることが特色です。対象分子は、膜貫通ドメインを持つ分子の他、膜脂質修飾を受ける分子や膜脂質分子自体も解析可能です。この他、高圧急速凍結法による試料作製や超微細形態と免疫標識分布の3次元観察とその解析法についても支援します。



凍結割断レプリカ標識法による膜分子の局在解析。細胞膜上の2次元的な分布様式や発現密度、他の分子との共局在をナノレベルで定量的に解析できる。



高圧凍結装置 (HPM010)
未固定・固定のどちらの試料も微細構造を保持したまま凍結することができる。



包埋前(preembedding)免疫電子顕微鏡法による分子局在解析。膜分子に限らず可溶性分子の分布も可視化でき、細胞内微細構造との関係も検討可能。



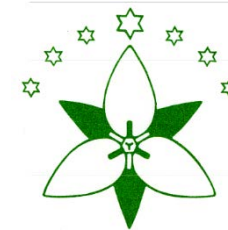
凍結割断レプリカ作製装置 (BAF060) 凍結試料を高真空下で割断し、露出部に炭素とプラチナを蒸着することで、レプリカ膜を作製する。



微細構造の3次元解析
連続超薄切片画像より、オルガネラや細胞の微細構造、分子標識の分布を3次元的に可視化、解析できる。



透過型電子顕微鏡 (H-7650)
100kVの加速電圧で超薄切片やレプリカ膜の超微細形態を観察でき、CCD画像を撮影できる。

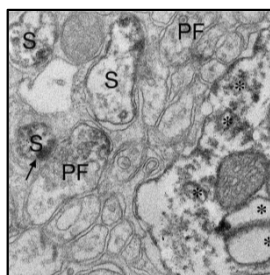


①特異抗体を用いた免疫電顕解析支援

包埋前免疫電顕および包埋後免疫電顕解析を支援する。依頼者が**特異性のある抗体**を保有し、電顕解析結果の**特異性検定のための材料**も合わせて提供できることを支援条件とする。

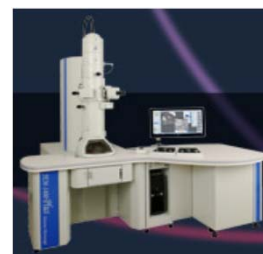
②組織化学で使用するためのポリクローナル抗体開発支援

購入や外部委託作成が困難な抗体の開発を支援する。依頼者が**特異性検定のための材料**(ノックアウト動物、ノックダウン組織・細胞、強制発現細胞など)を有し、**特異性検定を実施**できることを支援条件とする。



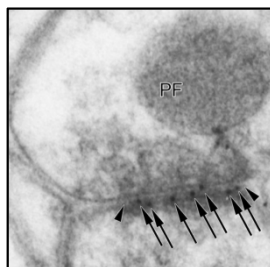
包埋前免疫電顕解析

感度に優れる汎用性の高い免疫電顕法で、金コロイド銀増感法とペルオキシダーゼ法により発現部位を検出する。



透過型電子顕微鏡

包埋前および包埋後免疫電顕の観察と画像取得を行うための顕微鏡。



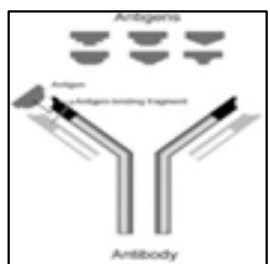
包埋後免疫電顕解析

感度で劣るが、定量的局在解析に優れる免疫電顕法。しばしば、シナプス後部分分子の検出には必須な検出法となる。



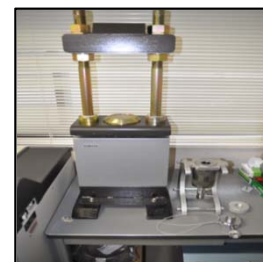
AFS凍結置換ユニット

包埋後免疫電顕解析の試料作成において、固定組織を凍結状態のままLowicryl樹脂に包埋し紫外線重合を行う装置。



特異抗体開発

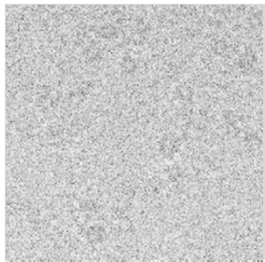
ウサギ・モルモットの抗原免疫と抗原アフィニティー精製により、組織化学(光顕、電顕)で使用可能な高品質抗体を開発する。



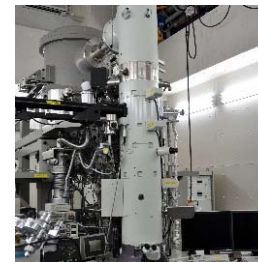
フレンチプレス破碎機

3リットル培養で得られた大腸菌を瞬時に破碎し、免疫用および精製用の発現タンパクを得るための装置。

クライオTEM／クライオSEMと、様々な凍結試料作製装置を連携して用いることにより、凍結試料作製からクライオEM観察までのクライオEMワークフロー支援を提供します。生きていた時に近い状態／流体状態の生物試料を電子顕微鏡で観察するために、幅広い凍結技法（急速凍結、高圧凍結、凍結切断、凍結切削など）により試料を調製し、電子線照射ダメージの少ないクライオTEM観察ができます。また、真空クライオトランスファーを用いて、凍結切断装置および凍結ウルトラミクロームとクライオSEMをリンクさせたシステムにより、凍結試料のSEM観察が可能です。凍結ウルトラミクロームを用いた場合、観察後の追加工で簡易的な連続断面観察もできます。



急速凍結法により非晶質氷に包埋したニコチン性アセチルコリン受容体を極低温TEMで観察した分子像。画像処理により分子の立体構造を解析できる。



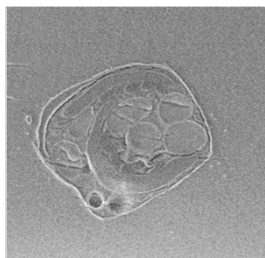
液体ヘリウム冷却試料ステージとΩ型エネルギーフィルターを搭載した加速電圧300KVの極低温電子顕微鏡。電子線照射ダメージの少ない観察が可能となる。



神経細胞を、高圧凍結し、凍結切削した凍結超薄切片をクライオTEM観察した“CEMOVIS”像。化学固定・脱水等の影響のない構造を観察できる。



液体窒素冷却試料ステージを組み込んだクライオ走査型電子顕微鏡。凍結切削・凍結切断した試料表面を、凍結状態のまま観察することが可能。



高圧凍結した珪藻を、凍結切削し、凍結切削した試料ブロックの表面を、クライオSEMで観察した。生きた状態に近い珪藻の横断面の観察ができる。



高圧凍結装置
約210MPaの高圧下で、液体窒素で試料を急速凍結することにより、比較的広範囲な非晶質氷凍結が可能となる。