超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告

〔目次〕

192 192 193 194 195
192 193 194 195
192 193 194 195
193 194 195
193 194 195
194 195
194 195
194 195
195
195
197
198
199
200
200
200

1. Electron tomography of Purkinje cell dendrite to understand organization of spines from dendrites in rodents

Jee-Woong Kim, Se Jeong Lee, Tatsuo Arii¹, Keiji Imoto¹, Im Joo Rhyu (Department of Anatomy, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea, ¹NIPS)

The density of dendritic spine of Purkinje cell in cerebellum has been reported in many articles based on different experimental methods. The data based on serial TEM images reported the density of $70 \sim 110$ spines/10µm, whereas studies based on stereo-paired analysis of HVEM reports $20 \sim 40$ spines/10µm. The stereo-paired image covers 2 and a half dimension only and the stereo image are constructed virtually in the visual cortex. Recently, organization of the spines on the dendrites of Purkinje cell has been reported helical ordering pattern. We ran electron tomography to understand organization pattern and dendritic spine density at higher resolution with HVEM.

Golgi preparation. The Golgi block was embedded in Epon-Araldite mixture and 100 micro meter section was observed under the light microscope. The well stained Purkinje cell dendritic tree was cut in to 4 μ m section and was observed under the high voltage electron microscope. Straight forward dendrite was selected and tilting series of +/-60° was obtained. The virtual block was constructed from tilting series images with IMOD. The contour of the dendritic tree on the virtual slice was segmented manually. The spine emanating pattern of the mice Purkinje cell could be observed on the reconconstructed 3 dimensional image on the IMOD model view window. Further fine touch and analysis are under way.

The cerebellum of rats and mice were perfused for rapid

2. 神経系培養細胞における細胞骨格や膜タンパク質などの3次元構造解析

遠藤泰久・吉村亮一・西田倫希・伏木大輔・久加亜由美(京都工芸繊維大学) 有井達夫(生理学研究所)

神経回路の形成には、セマフォリンやネトリンなどの ガイド分子が軸索先端の成長円錐を忌避や誘因反応によ って誘導することが知られている。しかしながら、それ らの軸索ガイド分子を受容する受容体の細胞レベルでの 詳細な局在化機構や動態はほとんど明らかでない。本研 究では軸索忌避因子であるセマフォリンの受容体である ニューロピリンの成長円錐における局在について、超高 圧電子顕微鏡による3次元構造解析を試みた。

ホルムバール支持膜を張った金メッシュを70%エタノ ールで滅菌後、コラーゲンコートを施し、神経系培養細 胞 NG108 と接触忌避をおこす平滑筋培養細胞 SM-3 を DMEM 培地で3日間混合培養した。4%パラフォルムア ルデヒド固定後、抗ニューロピリン抗体によりABC-HRP 法で免疫染色し、DAB、硫酸ニッケルアンモニウムで発 色した。1%オスミウム酸で後固定し、エタノール系列で 脱水し、二酸化炭素-臨界点乾燥を行った。試料をカー ボン蒸着後,超高圧電子顕微鏡(H-1250M 加速電圧 1000kV)により,同一視野を-60度から+60度まで2度 刻みの傾斜連続写真を撮影し,IMODにより成長円錐に おけるニューロピリン免疫反応部位の3次元画像解析を 行った。

その結果,軸索ガイド分子受容体であるニューロピリンは,成長円錐の細胞膜に一様に存在するのではなく, 成長円錐の中央部に高密度に分布していることがわかった(図)。また成長円錐からは多数の糸状仮足が伸長しているが,その一部にも強い反応が認められた。固定後に 界面活性剤(トライトン X-100)で処理し,抗体の細胞 膜透過性を高めた試料では,ニューロピリンの免疫反応 は,成長円錐の基底部近くの細胞質に多数の小胞に存在 していて,それらは細胞骨格にそって見られた。

これらの結果から,軸索ガイド分子受容体であるニュ ーロピリンは神経突起の細胞質中では微小管などの細胞 骨格にそって小胞として輸送され,成長円錐などの特定 の部位の細胞膜に挿入されて,ガイド分子受容の機能を はたすと考えられる。



図. NG108 細胞の成長円錐における軸索ガイド分子受容体ニューロピリンの3次元画像。

3. 電気シナプスを形成した網膜及び脳ニューロンの樹状突起の構造

ギャップ結合は、細胞間チャネルを形成し、ニューロ ンでは電気シナプスとして働く。サブユニット・コネキ シンには、4つの膜貫通ドメインがあって、N末とC末 は細胞内にあり、1つの細胞内ループと細胞間ドッキン グに必要な細胞外ドメインが2つある。電気シナプスは コネキシン36(Cx36)から構成され、ニューロン群で同期 した興奮を引き起こし(Hidaka 等, 2004)、神経回路網 の発生過程で出現し、ニューロンの機能分化の研究で注 目されている。ニューロン間での電気シナプスの働きを 解明するために、コネキシン36に対する特異的な抗体を 作成することが必要である。コネキシン36の細胞内ルー プに対する抗体(Cx36細胞内抗体:Hidaka 等, 2004)に 加えて、今回、藤田保健衛生大学総合医科学研究所免疫 学研究室の黒澤と赤堀らが開発した方法を用いて、ギャ ップ結合の細胞外ドメインに対する抗体(Cx36細胞外抗

日 髙 聰(藤田保健衛生大学医学部生理学教室)

体)の作成に成功した(Hidaka 等,投稿準備中)。Cx36 細胞外抗体を生きている細胞に投与反応した実験から, 細胞間チャネルの形成や代謝の過程を解析した。

ニューロン間での電気シナプスの形成を解明するため に、ギャップ結合に対するCx36細胞内抗体とCx36細胞 外抗体との免疫反応性を、超薄切片で同定すると共に、 5µmの厚さの切片を1,000kVの加速電圧の超高圧電子顕 微鏡下で解析した。細胞ペアの突起間にあるギャップ結 合が両方の抗体によって染色された(図1と2)。超薄切 片では、我々のCx36細胞内抗体(Hidaka等,2004)は、 大きなギャップ結合の細胞膜直下の細胞内にある裏打ち 構造を強く染色した(図2)。ギャップ結合によっては、 一方の細胞内部分だけが染色された場合があった (hemichannel 様の構造)。一方、5µmの厚さの切片を作 成し、超高圧電子顕微鏡を用いて、ギャップ結合におけ る Cx36 細胞外抗体の免疫反応性から, ギャップ結合の 立体構造を解析した。細胞間の接触部位の close membrane apposition の形態を呈する部位に Cx36 細胞外 抗体の免疫反応性があることが分かった(図1,矢印)。 これらの微細構造の免疫反応性と,ギャップ結合におけ る Cx36 細胞内抗体と Cx36 細胞外抗体との免疫反応性の, 共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いた解析結果とを検 討した所, Cx36 細胞外抗体による細胞間染色の厚さは, ギャップ結合形成の度合いを反映している事が示唆され た。 文献

- Hidaka, S. et al., (2004) Journal of Neuroscience, 24 (46): 10553-10567.
- 日 高 聡 (2006)日本顕微鏡学会誌「顕微鏡」
 41 (2): 117-119.
- Hidaka, S. (2008) Journal of Integrative Neuroscience, 7 (1): 29-48.



 図 1:細胞間の相互接触部位。厚さ 5µm 切片の 1,000kV 加速電圧の超高圧電子顕微鏡像。
 ギャップ結合コネキシン 36 の細胞外ドメ インに対する抗体を用いて染色し,試料ス テージの-16 度傾斜を行うことによって, close membrane apposition 形態の接触領 域が見える(矢印)。

図 2:細胞間のギャップ結合の微細形態の,超薄切 片での電子顕微鏡像。コネキシン 36 の細胞 内ループに対する抗体を用いた染色によっ て,細胞膜直下の細胞内にある裏打ち構造が 強く染色されている。

準薄切連続切片の超高圧電顕観察で明らかになったイソアワモチ背眼にみられる レンズ細胞(感杆型光受容細胞)の軸索様構造

片桐 展子(弘前学院大学·看護学部)

片桐 康雄(弘前学院大学·看護学部)

有井 達夫(生理研超高圧電顕)

イソアワモチ(軟体動物・腹足類)の背眼は,網膜に 繊毛型光受容細胞がある。さらに,背眼の中央部に位置 するレンズは1~十数個の細胞から成り,レンズ細胞は レンズと感杆型光受容細胞の両機能をもつ。レンズの構 成は個々のレンズで複雑に異なる。レンズ細胞の興奮伝 達機構を解明するために、レンズ細胞に蛍光色素や HRP を注入後、固定するなど諸方法を試みた。しかし、どの ような試料作成方法を用いても、レンズ細胞の特異な形 態的特徴に因って、軸索を同定するには連続切片の観察 が必要となり、準薄切連続切片を HVTEM で観察してき た。レンズ細胞の大きさは 100µm を越え巨大であるが、 軸索は 1~3µm と細い (ことが予想される)。隣接のレン ズ細胞は互いに嵌合し、レンズ周囲には線維状の結合組 織細胞や筋細胞が存在し、軸索か突起が識別できなかっ たのである。

本研究では、幼動物の背眼に着目した。幼動物の背眼 はやや未熟であるが、小形で、基本的な形態は成体のも のと同じである。レンズは達磨形で背眼の中央に1個存 在、その外側表面は滑らかな輪郭を示し、周囲を線維状 の細胞が囲む。詳細な観察によって、細い軸索様突起が レンズ細胞の側面から直接出るのを認めた(図 A~D)。 細い軸索状構造はレンズ細胞の外周に沿って上行する。 背眼の形成は,表皮下に個々の未分化な細胞が集まって, その中にレンズ細胞が分化する。閉じた胞状の柄眼と異 なり,背眼は開放的な構造である(片桐ら 2003)。形成 過程からも,レンズ細胞が皮下に散在する皮膚光覚細胞 とその微細形態と光応答が類似することは興味深い。皮 膚光覚細胞では,軸索は細胞の側面から出て上行し,他 の皮膚光覚細胞の軸索と合流して神経束となる(Katagiri, et al. 1990)。背眼のレンズ細胞では,軸索の有無とその走 行はこれまで捕らえられなかったが,本報告でレンズ細 胞の軸索様構造を初めて提示できたと考える。



図 A~D. イソアワモチ幼動物の背眼内のレンズ細胞。A ではレンズ (L) の側面 (▽) から, 軸索様突起 が上方にのびる。B, C ではレンズ細胞体と重なり連続性が不明確になり, D ではレンズ細胞体から 離れる。

☆印はレンズを囲む線維性の結合組織細胞である。PL. 黒色メラニン顆粒を含む色素細胞層。

5. 超高圧電子顕微鏡を用いた新たな試料観察法の開発

超高圧電子顕微鏡は潜在的に細胞の中の細胞小器官の 立体構造を直接観察することのできる顕微鏡であるが, 観察上の最大の問題は観察しようとする対象にいかに高 電子密度を選択的に与えうるかという点にある。通常の 加速電圧を持つ電子顕微鏡による超薄切片の形態観察で はオスミウム,酢酸ウラニウム,鉛などの金属の修飾に より超薄切片内にある生体膜や細胞基質が程良い電子密 野田 亨 (藍野大学医療保健学部理学療法学科)

度を持つ明瞭な像を描出することに成功しているが, 1000kV以上の超高圧の加速電圧下で特定の細胞小器官 のみを立体的に捉える目的には適していない。これまで 超高圧電顕下で細胞小器官の立体像観察に成功している 例は主として光学顕微鏡用試料に対して用いられていた 硝酸銀やオスミウムを用いた特殊染色や酵素組織化学で 用いられていた鉛法の一部であった。従って,立体構造 の情報の得られる細胞小器官は限られていた。近年,免 疫組織化学の発達は目覚ましく,細胞を構成する無数の 蛋白に対する抗体が生み出され,抗体を用いた標識法が 確立した。光学顕微鏡で用いられていた酵素抗体法を電 子顕微鏡観察用に応用すれば,原理的には各細胞小器官 に分布する蛋白を高電子密度に標識することが可能とな る。しかし,AdamsのDAB反応の変法を含め,これまで の方法では多くは細胞レベルの標識にとどまり,超高圧 電顕下で個々の細胞小器官の明瞭な三次元像を得ること に成功していない。そこで我々は免疫組織化学,特に酵 素抗体法を基本にし,その最終反応産物の高電子密度化 を試みた。これまでゴルジ装置やミトコンドリアが高電 子密度に染色される Zinc-Iodide Osmium (ZIO) 染色法や Ferro/Ferri-cyanide-Osmium 染色法を酵素抗体法と組み合 わせたが, DAB 反応に続く Osmium black 形成に更なる 電子密度を与えることはできなかった。ただ ZIO 染色で はラットへの ZnSO4 の過剰腹腔内投与を行うと, 網膜視 細胞, 外節の ZIO 染色陽性の領域が拡大し, シナプス顆 粒の染色性が向上した。このことは ZIO 染色において Zn 自身が最終反応産物の形成, 又は染色機構にも何らかの 役割を担っているものと示唆された。現時点において酵 素抗体法の最終反応産物の高電子密度化はまだ達成され ていないが, まだいくつかの方法はまだ検討の余地を残 している。

6. 嗅球ニューロン・グリアの三次元構造解析

 ・価田 一徳(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)(現・川崎医科大学解剖学教室)
 清蔭 恵美 (Department of Anatomy & Neurobiology, University of Maryland)
 有井 達夫(生理学研究所脳機能計測センター形態情報解析室)

我々はこれまで、超高圧電子顕微鏡により嗅球のニュ ーロンとグリアの三次元構造解析を行っている。本年度 はラット嗅球の顆粒細胞層に存在する astrocyte について 三次元的な構造解析を行った。

顆粒細胞層には、細胞成分として主に顆粒細胞が存在 し、起源を同一とする複数の細胞が島状に配列している のが特徴である。この島状に集合している顆粒細胞は、 互いに接触し、時にギャップジャンクションを形成し、 細胞間の直接的な情報交換が示唆されている。我々はこ れまで、電顕超薄連続切片で嗅球を解析してきたが、よ り表層の僧帽細胞は直接的接触が認められるものの、顆 粒細胞間には数~十数 nm の薄い膜状の構造が介在する 観察所見を得ている。しかしこの膜構造の存在様式と意 義は不明である。我々は超高圧電子顕微鏡用に作製した ゴルジ染色及び各種抗体を用いた免疫染色標本の豊富な 蓄積があり、詳細に解析し、顆粒細胞層の単一の astrocyte のゴルジ染色像を得た。

観察の結果,細胞体近傍では径の大(免疫染色では GFAP 陽性部分)・小の突起,及び膜状の延長構造が隣 接する顆粒細胞を取り囲んでいる。(生理研年報 27; 186-187,2006)単一のastrocyteのゴルジ染色像を光顕連 続切片で切片越えに追跡すると,突起は更に細くなり,膜 状構造が顆粒細胞を取り囲んだ蜂の巣状構造が認められ る(図1)。更に2°あるいは5°毎で連続傾斜像を±60° 撮影し,それを電子線トモグラフィー法で三次元再構築 を行った結果,グリア膜は顆粒細胞体の大部分を覆って いるが,一部直接的なコンタクトを示す所見が得られた (図 2)。顆粒細胞を覆う膜は複数のグリアから由来する 可能性もあり,また顆粒細胞の表層と深層では astrocyte の形態も多様的である。このため,今後更に解析数を増 やし,顆粒細胞層におけるニューロンとグリアの三次元 構造とその関係について解析を続けたいと考えている。



図 1; ゴルジ染色による超高圧電子顕微鏡ス テレオ像(±8°)ゴルジ染色された astrocyte の膜状構造が顆粒細胞を取 り囲んでいる。Bar=10μm

図 2; 図 1 の astrocyte の連続傾斜像を超高 圧電子顕微鏡にて 5°毎に撮影し, 電 子線トモグラフィー法により三次元 再構築をおこない, 15°間隔で展開表 示した。

7. ステロイドホルモンとその受容体による神経細胞および神経膠細胞の 三次元構造に関する超高圧電子顕微鏡

小澤一史(日本医科大学大学院医学研究科生体制御形態科学分野)

私たちは特に副腎皮質ステロイドホルモンであるグル ココルチコイドとその受容体による、神経細胞および神 経膠細胞の機能形態変化調節について、これまでに様々 な角度から研究を進めてきている。その一環として、循 環コルチコステロイド状態の変動に伴って、神経細胞あ るいは神経膠細胞の超微細形態の変化について、特に超 高圧電子顕微鏡を用いて観察し、三次元構築の変化を観 察してきている。神経細胞においては、グルココルチコ イドと関連してストレス応答を考える上で重要な中枢神 経系の部位である海馬領域、特にグルココルチコイド受 容体が多数発現する錐体細胞層の CA1.CA2 領域や歯状 回の顆粒細胞における樹状突起の棘 (spines)の形状,密度 等に注目して観察を行っている,これらの神経細胞は, 例えば副腎摘出術を行い,血中のコルチコステロイド濃 度が減少すると,その影響を受け,棘の形状の縮小化, 密度の減少などの形態変化を引き起こし,一方,コルチ コステロイドの補充によって,この形態変化が正常状態 に回復する様子も明らかになっている。一方,神経膠細 胞では逆に,循環コルチコステロイド状態が減少すると 細胞の肥大,突起とその細かな分岐の増大が顕著に認め られ、コルチコステロイドの補充によってその肥大は収 まり、正常状態に戻るといった形態変化を示すことが明 らかになりつつある。つまり、コルチコステロイドの変 動に伴う形態学的反応性は、神経細胞と神経膠細胞では 逆の方向性を示す可能性を示唆するものである。

神経細胞の棘は樹状突起において全方向性に存在し, 多くの他の神経の軸索を受け,シナプス形成に関わるこ とから,これらの棘の形状や密度の変化は,神経情報伝 達効率の変化に関わる可能性を強く示唆するものである。 こういった三次元的形状観察には,従来の二次元的超微 細形態を観察する透過型電子顕微鏡に比べはるかにダイ ナックで多数の情報を超高圧電子顕微鏡観察が与えてく れ,大きな成果を与えてくれる可能性が高い。また,神 経膠細胞も多方向性の複雑な突起を伸ばしており,これ らの観察には超高圧電子顕微鏡による三次元的解析が大 きな威力を発揮している。また,通常神経膠細胞,特に 星状神経膠細胞の観察では免疫組織化学的にそのマーカ ーとなる GFAP (glial fibrillary acidic protein)を用いての観 察が中心となるが,Golgi 鍍銀染色による星状神経膠細胞 の描出では GFAP 免疫染色にて描出される突起よりも詳 細な分岐構造も観察でき,その三次元的広がりを観察す ることが出来る。これまでの観察によるコルチコステロ イド環境の違いによる神経細胞と神経膠細胞の三次元的 微細構造変化では,それぞれの細胞が何らかの相互作用 を持ちながら対応している可能性も示唆されつつあり, 現在,トモグラフィー観察による詳細な解析と動画的観 察への応用も加えて,本研究の進展に努力している。

8. Three-dimensional analysis of ultra-structure of functionally identified neurons in the mouse olfactory bulb

Emi Kiyokage, Adam C. Puche, Michael T. Shipley (Department of Anatomy and Neurobiology,

Kazunori Toida (Department of Anatomy and Cell Biology, Institute of Health Biosciences,

The University of Tokushima)

Olfactory bulb neuronal precursors are provided from subventricular zone continuously. After reaching the olfactory bulb, these cells migrate radially to various layers of the olfactory bulb. Recent our report showed that 45 % of migrating cells use the blood vessels as a scaffold and interact with perivascular astrocytes end feet in the granule cell layer. We have been investigating the neuronal organization of the olfactory bulb by both structural and physiological analyses. In addition, we have started analyzing three-dimensional ultrastructures of association of migrating cells with local blood vessels and perivascular astrocytes in the subependymal layer (SEL) by high-voltage electron microscopy (HVEM). The mice olfactory bulbs were processed for Golgi impregnation and embedded in Epon-Araldite resin. Epon-embedded blocks were cut at 100 µm thick with a sliding microtome, and resections 5 µm thick were cut with a ultramicrotome. The specimens were observed at 1000kV with H-1250M HVEM, and photographs were taken by tilting the specimen stage from -60° to $+60^{\circ}$ by 2° step for electron tomography analysis.

We could observe three-dimensional structure of Golgi-stained processes of astrocyte and Golgi-unstained cells both surrounding blood vessels in the SEL by HVEM. From their location and shape, Golgi-unstained cells were considered to be migrating cells. HVEM confirmed structural closed relationship among astrocytes, blood vessels and migrating cells revealed by our previous EM examination. The blood vessels were surrounded by thin astrocyte sheet-like processes, and migratory cells were associated with the astrocyte end feet along blood vessels. As examined by conventional EM study, no migrating cells directly contacting endotherial cells have been observed. Further analyses by three-dimensional tomography have been carried out continuously to reveal more detailed finer structural relationship among astrocytes, migrationg cells, and blood vessels.

University of Maryland School of Medicine, MD, USA)

9. 哺乳類神経前駆細胞からの神経細胞生成過程の観察

小曽戸陽一,末次妙子(理化学研究所・発生再生科学総合研究センター) 樋田一徳,清蔭恵美(徳島大学大学院・神経情報医学部門・情報統合医学講座・形態情報医学分野) 有井達夫(生理学研究所・脳機能計測センター・形態情報解析室)

脊椎動物の中枢神経系神経細胞の前駆細胞である神経 上皮細胞は,発生期脳の脳室帯のアピカル表層で細胞分 裂を行う。脳発生の初期には、前駆細胞が増殖する対称 的な分裂、後には神経細胞を生み出す非対称的分裂(一 つの前駆(神経上皮)細胞から,前駆細胞および神経細 胞が生成)が一定の割合で見受けられる。近年のタイム ラプス顕微鏡観察により,細胞分裂期においては細胞体 と基底(basal)膜のコンタクトは大変細長い形状(直径 1µm 以下,長さ100µm 以上)となるものの,突起状の構 造体 (basal process)として保持されていることが示され た。しかしながら、細胞分裂の際に basal process がどの ように娘細胞に引き継がれるかについては不明な点が多 い。現在のところその極めて細長い構造から、細胞分裂 の際には分裂することはなくどちらかの娘細胞に不均等 に分配されるとの考えが通説である。Basal process の不 均等な分配が娘細胞の運命決定(増殖的あるいは神経生 成的) に働いているとの報告もなされていることから, 細胞分裂時の分配様式を知ることは胎児脳における神経 新生の仕組みを理解する上で重要であるといえる。

我々は、神経上皮細胞の basal process の形態学的情報

を正確に得るためには電子顕微鏡観察が必要であると考 え, 生理学研究所の超高圧電子顕微鏡 (H-1250M)による basal process の観察を行ってきた。我々はこれまでに、 胎生期のマウス脳における神経上皮細胞の basal process の微細構造を評価するための観察手法の確立を行い、ゴ ルジ染色法と超高圧電子顕微鏡を組み合わせることで basal process を可視化する方法が適していることを見出 し、この方法で多くのサンプルを観察した。この手法に より、分裂期細胞体から apical-basal 細胞極性軸に沿った basal process が、2本が平行、もしくは緩やかな螺旋状に 基底膜側方向に向かい伸長している形態が見出された。 このことは、細胞分裂期において basal process がその非 常に細長い構造にもかかわらず、細胞体分裂より前の段 階で分裂している可能性を示している。この観察結果は, 我々が走査型電子顕微鏡で見出した basal process の形態 と類似性が見られることから(図1),細胞分裂期の神経 上皮細胞の basal process は、少なくともある割合におい て分裂しているとの所見に至った。この結果は、胎生期 の神経前駆細胞からの神経細胞新生メカニズムを知る上 で、高い新規性を持つものである。



図1 発生中のマウス脳における細胞分裂期の神経上皮細胞の走査電子顕微鏡像 (a, a')および比較のた めの超高圧電子顕微鏡像 (b,「生理学研究所年報 28(2007)p.188-189」より抜粋)。a'は, a の白 四角部分の拡大像。矢印は,対となる2本の basal process が細胞体 (*)から伸長していることを 示している。Bar=1µm

10. 3-dimensional analysis of mitochondrial formation effected Bax inhibitor-1 in human cell

Seok-Won Jeong, Jee-Young Kwon, Young R. Seo (Dep. Pharmacology, Institute for Basic Medical Science, Medical Research Center, School of Medicine, Kyung Hee University)

Due to a number of human health problems such as neurodegenerative disease and cancer, a few studies relating apoptosis signaling pathway recently has been concerned. One of many apoptosis related genes, Bax inhibitor-1 (Bi-1) protein has been known to have the ability to suppress Bax-induced apoptosis in mammal cells. Though the Bi-1 was reportedly suggested to play a role in endoplasmic reticulum (ER)-mediated stresses, the function and localization of the Bi-1 protein has not been elucidated. At our recent study, we have confirmed the localization of Bi-1 associated with ER membrane using conventional electron microscopy. Furthermore, we also found the localization of Bi-1 in mitochondria as a novel aspect of Bi-1 for the role in apoptosis process. In this study, potential roles of Bi-1 protein in mitochondria-dependent apoptosis has been investigated employing a high voltage electron microscopy (HVEM), which has been effectively applied to study the three-dimensional structure. We have attempted to make a 3D-reconstruction of mitochondrial formation in BI-1 normal and BI-1 defective HT1080 cells using IMOD software. Our result might suggest a new approach to understand of BI-1 function on mitochondria in human cell line.

11. Fine structure of the mastigont system in Trichomonas vaginalis

Kyung Eun Lee, Ji Young Mun, Se Jin Park, Sung Sik HAN (School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University)

The flagellated protozoan *T. vaginalis* has been widely studied due to its medical significance and unique structure. The cellular components of *T. vaginalis* form a complicated 3-dimensional structure. We reconstructed the 3-dimensional structure of *T. vaginalis* from serial sections in order to observe the spatial structure of the whole cell and electron tomography to examine the structures of the cellular organelles in detail. The 3D reconstructed structure showed the mastigont structure and parabasal filament in the *T*.

vaginalis. From our 3D reconstruction of *T. vaginalis*, we found the presence of an additional striated fiber. Since the last thin filament, Pf3, was close to the adjacent filament and the two filaments appeared to be vertically parallel in the cross-view, it is likely that this filament seems the same filament as the adjacent filament shown in the 2D TEM image. *T. vaginalis* also has a Golgi complex supported by parabasal filament. We reconstructed Golgi complex to observe fine structure and found the fenestrate structure on Golgi complex.

12. 3-D Reconstruction of Plastid Crystalline Bodies during Development (II)

InSun Kim (Keimyung University)

High voltage electron microscopy has been employed to obtain 3-D reconstruction data from foliage plastids of the Sedum rotundifolium. Formation of the plastid crystalline bodies has been investigated at the sub-cellular level of the two different cell types. The plastid crystalline bodies in mesophyll and epidermal cells both exhibited paralleled and paracrystalline lattice structures, but the arrangement of elements consisting of the body were different at the onset. In the mesophyll plastids, 3-4 aggregates of tubular elements initially formed a cluster having different periodicity distances between elements within each aggregate (Fig. 1). During plastid development, these elements rearranged into evenly-spaced, approximately 17-19 nm, tubular bodies and became a homogenous structure. In the epidermal plastids, however, the crystalline bodies were distinguished by membranous nature. The elements of growing crystalline bodies were derived from the thylakoidal membranes of various orientations that were adjacent to the bodies. The periodicity distances between membranous elements were rather irregular at the beginning, but reached to about 10-12 nm soon due to appression of the newly joined membranes that were just added to the growing bodies. Thus, the plastid crystalline bodies examined in the two cell types demonstrated quite different origin and formation during development.



Fig 1. Plastid crystalline body exhibiting at least three different element orientations.

13. ナノ粒子の点鼻および気管内投与による曝露経路の検索

坂井 伸光,小寺 恵介,内山 巌雄 (京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻環境衛生学講座) 松井 康人 (東京大学総合研究機構ナノマテリアセンター) 坂本 浩隆,河田 光博 (京都府立医科大学解剖学教室生体構造科学部門)

【背景】粒子状物質が体内に入る最大の入口は、口と鼻からの吸入によるものである。中でも、嗅覚神経を介する曝露系の検索は、主に Oberdrster らにより研究が進められてきた。Mn ナノ粒子(直径 30 nm, 450 (µg/m³))を曝

露したところ,対照群と比較すると,ラットの嗅球で, Mn 濃度が約 2.5 倍に増加していることを報告している。 右の鼻を覆って曝露したところ,右の嗅球では対照群と 同じレベルであったが,左の嗅球では両鼻曝露時と同量

の値の増加を確認した。

【方法】金コロイド投与による,嗅球糸球体における粒子 の観察には,大学共同利用機関法人自然科学研究機構生 理学研究所の超高圧電子顕微鏡 (H-1250M)を用いた。 マウス (BALB/c, male, 10 weeks) に麻酔下で,左鼻に 金コロイド溶液 (粒径 5 nm, SIGMA 社) 10 µL をマイク ロピペットにて投与した。投与から 24 時間経過したマウ スを灌流固定し,30 分間の静置後に嗅球を摘出し,グル タルアルデヒドを含む固定液中浸漬固定した。嗅球を冠 状面にて二分割し,オスミウム酸で固定した。これをエ タノールにて脱水し,最終的にエポキシ樹脂に置換し, 恒温器で2日間重合した。このブロックを,ウルトラミ クロトームを用いて,厚さ 500 nm の嗅球の超薄切片を, 冠状面にて作成した。切片作成にはダイアモンドナイフ を使用した。これを電顕用のグリッドに置き,デシケー ター内で乾燥させ、最終試料とした。

【結果】嗅球の糸球体において,明確な金粒子の像は観察 できなかった。しかしながら,嗅神経の観察や,肺胞付 近における神経の観察をすることができた。後者におけ る神経像を図1に示す。

図中央の球状の肺胞上皮を取り囲むように,上部に2 つ下部に2つの肺胞が確認できる。図右下の肺胞と,中 央の大型の肺胞の間に,黒いライン状の神経線維が確認 できた。今回の実験では,神経内の輸送による投射先で の金の確認はできなかった。しかしながら,超高圧電子 顕微鏡を用いることで,これまでにない深部まで走行す る神経像を捉えることができた。次回の実験では,粒子 の投与量や粒径などを変化させることで,金ナノ粒子の 検出を目標とする。



図1 超高圧電子顕微鏡による肺胞周辺の神経のステレオ像,左右±8°の角度をつけて観察

《超高圧電子顕微鏡共同利用実験での業績リスト》

発表論文

- Mun JY, Arii T, Hama K, Han SS (2007) Rhabdomere formation in late pupal stage of *Drosophila melanogaster*; Observation using high-pressure freezing and freeze-substitution, and high-voltage electron microscopy. Korean J Electron Microsc 37, 35-42.
- 2. Mun JY, Park SJ, Han SS (2007) Improved ultrastructural preservation of retinal cells in Drosophila melanogaster.

Korean J Electron Microsc 37, 175-183.

- Nishida T, Arii T, Takaoka A, Yoshimura R, Endo Y (2007) Three-dimensional, computer-tomographic analysis of membrane proteins (TrkA, caveolin, clathrin) in PC12 cells. Acta Histochem. Cytochem. 40, 93-99.
- Nishida T, Nishikawa Y, Jinnai H, Arii T, Yoshimura R, Endo Y (2007) Ultrastructural localization of the neurotrophin

receptor (TrkA) in cultured rat pheochromocytoma PC12 Cells: three-dimensional image analysis by high voltage electron microscopy. Biomed Res. 2007 Jun ;28 (3):161-7 17625349.

学会報告

- Mun JY, Lee TH, Kim JH, Koo HS, Han SS (2007.2) Cryo-Electron Tomography of mitochondria : Threedimensional structure of Organization of Cristae and Membrane Contacts. 4th Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, ASMRM (Seoul, Korea).
- 日高 聰 (2007.3) 網膜アマクリン細胞間のギャップ 結合の生理機能特性。第84回日本生理学会大会(大阪)
- 3. 濱 清 (2007.3) グリア細胞,特に星状グリア細胞の 3 次元形態について。第112 回解剖学会総会(大阪)
- 4. 樋田一徳 (2007.3) 嗅球神経回路における遠心性調節 機構の構造解析。第112回日本解剖学会総会(大阪)
- Kim IS (2007.7) 3-D reconstruction of two different types of plastid crystalline inclusions in Crassulacean acid metabolism performing plants. International Symp. for the Commemorative 50th Botanical Society of Korea (Muju, Korea).
- Mun JY, Lee TH, Kim JH, SJ Park SJ, Koo HS, Han SS (2007.8) Deletedincancer1(DICE1) controls cristae morphology:Electron tomographic and ultrastructural analysis of the mitochondria in C.elegans. Microscopy & Microanalysis 2007 meeting (Fort Lauderdale, USA).

- Lee KJ, Jung JG, Arii T, Imoto K, Rhyu IJ (2007) Morphological changes in dendritic spines of Purkinje cells associated with motor learning. Neurobiol Learn Mem. 88, 445-450.
- 日高 聰 (2007.9) Cellular components in electrical synapses between retinal amacrine cells contributing to lateral interactions. Neuro2007, 第 30 回神経科学会(横 浜)
- 8. 日高 聰 (2007.10) 網膜ニューロン間電気シナプス のチャネル開口率の計測。第11回視覚科学フォーラ ム(岡崎)
- Lee KE, Kim JH, Jeong MK, Ryu JS, Han SS (2007. 10) Ultrastructures of Trichomonas vaginalis by electron tomography. 19th annual meeting of the Korean soc. molecular and cellular biology (Seoul, Korea).
- Mun JY, Lee TH, Kim JH, Jeong DH, Koo HS, Han SS (2007.10) A C.elegans homolog of the human mitofilin genes controls cristae morphology in muscle cell. 19th annual meeting of the korean society molecular and cellular biology (Seoul, Korea).
- Mun JY, Lee TH, Kim JH, Jeong DH, Koo HS, Han SS (2007.11) Three dimensional structure of mitochondria using cryo-fixation and electron tomography. Korean Microscopy conference (Daejeon, Korea).