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

豊岡公徳¹, 佐藤繭子¹, 朽名夏磨², 永田典子³

¹ 独立行政法人理化学研究所 環境資源科学研究センター 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

² 東京大学 大学院新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 〒277-8562 千葉県柏市柏の葉 5-1-5

³ 日本女子大学大学院 理学研究科 〒112-8681 東京都文京区目白台 2-8-1

要旨：近年、蛍光イメージングの発展に伴い、組織・細胞・細胞小器官・分子の動態や局在を容易に推定できるようになった。しかし、各組織・細胞にどのような形態のオルガネラが存在し、どのような状態で分布しているか超微形態レベルでの実体を把握するには、未だに透過電子顕微鏡 (TEM) による観察が必須である。我々は、組織や細胞などの TEM 像を広域に渡って自動撮影するシステムと、撮影した TEM 像をつなぎ合わせ 1 枚の高解像度 TEM 写真を取得するプログラムを組み合わせた「広域 TEM 像自動取得システム」を開発した。本システムを用いて、植物組織や培養細胞などの数万枚の TEM 像を自動撮影し、結合させることで、ギガピクセルクラスの写真の取得に成功している。さらに、試料を瞬時に凍結する高圧凍結技法により、広域超薄切片の作製に取り組み、動的なオルガネラの分布を広域に渡り把握することに成功している。本稿では、広域 TEM 像自動取得システムの原理と、高圧凍結技法で作製した超薄切片から画像取得した結果を中心に紹介する。

Development of high resolution TEM image acquisition system by using high-pressure freezing method

Kiminori Toyooka¹, Mayuko Sato¹, Natsumaro Kutsuna², Noriko Nagata³

¹ RIKEN Center for Sustainable Resource Science, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, 230-0045 Japan

² Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Kashiwanoha, Kashiwa, 277-8562, Japan

³ Faculty of Science, Japan Women's University, Bunkyo-ku, Tokyo, 112-8681, Japan

Author for correspondence: K. Toyooka, toyooka@riken.jp

Summary: Transmission electron microscopy (TEM) is important for ultrastructure observation for organelles, cells and tissues. However, it is unsuitable for comprehensive analyses. We have constructed a high resolution TEM image acquisition system to take a giga-pixel electron micrograph. An auto-acquisition TEM system can control TEM system such as a X-Y stage, electron beam and a CCD camera by remote PC, and acquired continuous electron micrographs. We succeed in records more than 30 thousand images. We developed image-tiling program for TEM pictures, and several thousands of pictures were automatically merged. In this article, we describe the mechanism of high resolution TEM image acquisition system and the applications by using high-pressure freezing method.

Key words: transmission electron microscopy, high pressure freezing/freeze substitution, high resolution TEM image, auto-tiling

はじめに

共焦点レーザー蛍光顕微鏡など光学顕微鏡機器の急速な発達と、蛍光タンパク質や蛍光試薬などによる蛍光ライブイメージング技術の発展により、細胞小器官・分子の動態や局在、タンパク質の発現部位を容易に推定できるようになった。例えば植物細胞では、ミトコンドリアの融合・分裂 (Arimura et al. 2004)、小胞体由来の ER ボディ (Yamada et al. 2008)、ゴルジ装置の動態 (Kitajima et al. 2009) やゴルジ体由来の小胞クラスター (Toyooka et al. 2009) など次々と明らかになって来ている。さらに近年では、STED や SIM、PALM など超解像光学顕微鏡の開発により、XY 軸の空間分解能が数十 nm の蛍光イメージングができるようになってきた (Scheremelleh et al. 2010)。しかし、各組織・細胞にどのような形態のオルガネラが存在し、どのような状態で分布しているか、超微形態レベルでの実体を知るには、蛍光イメージングだけでは未だ不明瞭であり、透過電子顕微鏡 (TEM) による観察が必須である。

これまで筆者らは、植物の様々な器官・組織の超微形態観察を多数行ってきた。その際、常に問題になる点として、野生型各組織における組織全体にわたった超微細構造の報告が少ないこと、加えて、組織ごとに細胞やオルガネラの超微形態が異なることが挙げられる。それ故、組織間・細胞間の超微細構造の比較、野生型と変異型とのオルガネラの比較は難しく、注意が必要である。また、筆者らは組織を数十ミリ秒で凍結固定ができる高圧凍結技法を取り入れた TEM 解析法の技術改良を進めながら、様々な植物組織を観察してきた。細胞内のオルガネラ分布の微細構造解析を行った結果、各器官や組織の細胞ごとにゴルジ体や多胞体などオルガネラの分布や超微形態も大きく異なっていた。以上の理由から、網羅的にオルガネラの超微細構造を撮影し、器官や組織ごとに解析するシステムの必要性を感じていた。

TEM は、2000 年代初頭から今日に掛けて記録媒体がフィルムからデジタルへ変貌し、スロースキャン CCD カメラにより電子線透過像をデジタルデータとして容易に保存できる

ようになった。さらに、コンピュータの高速化・大容量化により画像処理や大容量データの扱いが容易になった。そこで筆者らは、TEMにより組織や細胞を広範囲でさらに高解像度で超微細形態を記録することで、オルガネラの分布や超微細形態を明らかにできないかと考えた。これまでに、マウス神経回路網に対し、大規模な改造を実施したTEMを用いて広域TEM画像を取得、解析した報告がある(Bock et al. 2011)。しかし、汎用の透過電顕を用いて簡便にTEMの広域画像を取得する手法については、今までに報告例はない。当初我々は、手動で試料ステージを動かしながら、連続するTEM像を数十～数百枚撮影し、つなぎ合わせることを試みたが、多大な時間と労力を費やす必要があった。そこで、TEMにより連続したデジタル写真を数千枚、数万枚と自動撮影し、さらに自動で写真をつなぎ合わせて高解像度TEM写真を得る「広域TEM像自動取得システム」の開発を試みた。本稿では、その原理と高圧凍結技法で作製した超薄切片から画像取得した結果を中心に紹介する。

広域TEM像自動取得システムの概要

2000年代初頭からスロースキャンCCDカメラを標準装備したデジタルTEMが登場し、さらに試料X-Yステージの移動が手動式回転ノブからトラックボールまたはジョイスティックによる電動ステージ方式に替わった。アナログ制御が一部あったTEM本体が、全てデジタル制御可能になったこと

で、TEM像を自動撮影する環境が整ったと言える。我々が使用している透過電顕(日本電子 JEM-1400)は、モーター制御電動X-Yステージを備え、電子ビームを偏向コイルでコントロールすることで最大縦5枚×横5枚、計25枚を撮影し、像を結合するオートモンタージュ撮影機能を標準装備する。しかし、電子線を偏向コイルにより曲げて撮影するオートモンタージュ機能では、限られた領域しか撮影できないため、より広い領域を撮影する場合はステージを移動させる必要がある。試料ステージの自動制御によりオートモンタージュ撮影が可能な他メーカーのTEMも存在するが、OSやソフトウェア上の問題から、撮影上限が制限されている。そこで電子顕微鏡を専門とする研究者と画像情報解析を専門とする研究者、そして、顕微鏡企業の協力により「広域TEM像自動取得システム」の開発を行った。

広域TEM像自動取得システムは、プログラムで制御する二つのシステム、(1)広域TEM像自動撮影システムと、(2)広域TEM像タイリングプログラムで構成されている(図1)。(1)は、TEM本体を外部制御コンピュータによりスクリプト制御し、データ保存先が許す限りの連続写真を「自動撮影」するシステムである(図1左、図2)。(2)は、撮影したこれら大量の連続画像の位置情報とのりしろ部分の画像情報を用いて「自動結合」し、連結した1枚の写真を生成するプログラムである(図1右、図3)。

図1 広域TEM像自動取得システムの概要。広域TEM像自動取得システムは、プログラムで制御する二つのシステムで構成されている：(1)TEM本体を外部制御コンピュータにより制御し、連続写真を自動撮影する「広域TEM像自動撮影システム」、(2)撮影した大量の連続画像を試料位置情報と画像情報を用いて「自動結合」し、連結した1枚の写真を生成する「TEM像タイリングプログラム」。

図2 広域TEM像自動撮影システムの概要。(A)TEM標準制御PCモニターと外部制御用ノート型PC。(B)広域TEM像自動撮影MATLABスクリプトが実行中の外部制御PCの画面。数秒ごとに撮影されたTEM写真が1枚ずつ25枚表示され、撮影状態が確認できる。(C)広域TEM像自動撮影システムの流れ：①ビームの照射方向を変えていき、最大5×5枚の画像を撮影、②のりしろ領域を考慮し、指定した方向・距離だけステージを移動させる。①、②の動作を繰り返し、大量の連続画像を得る。

(1) 広域TEM像自動撮影システム：

事前にTEM本体側で、撮影倍率や電子線の明るさ、フォーカスなどをあらかじめ設定した後、LAN接続した外部制御用ノートPCからコマンドをTEM本体へ送信することで写真を取得する(図2A)。広域TEM像自動撮影システムの流れは、① 偏向コイルを制御し、電子ビームの照射方向を変えることで、連続画像を撮影する(最大5×5枚、計25枚、図2B)、② 指定した方向・距離だけ試料ステージをX-Y方向に移動させる。①-②の動作を繰り返し、大量の連続画像を得る(図2C)。TEMをコントロールするためのコマンドツールとして、システムインフロンティア社のJEM ToolBoxを用いている。JEM ToolBoxは日本電子製のTEMを制御する機能を、MathWorks社の数値解析ソフトウェアMATLABに付加することができ、MATLABスクリプトによりTEM本体の試料X-Yステージ、CCDカメラ、偏向コイルなどを外部コンピュータから制御することが可能となる。筆者らはシステムインフロンティア社から提供された基本スクリプトに改良を加え、実際にTEMでスクリプトを実行しながら、連続撮影テストを繰り返した。

撮影した画像を結合するためには十分な「のりしろ」を確保する必要がある。改良スクリプトでは、撮影時の「のりしろ」の大きさを、任意に設定できるようにした。さらに、ビーム制御で撮影する枚数、ステージ移動回数、ステージ移動から撮影までの待機時間、撮影開始と終了位置などのパラメータを、用途に応じて予め設定できるようにした。また、撮影開始後、撮影状態(ステージ数)、撮影終了予想日時が表示されるとともに、つなぎ合わせに重要な情報である画像

の位置情報を記録ファイルに出力されるようにした。最適な撮影条件を検討し、広域TEM像撮影を試みた結果、2万枚超の画像を完全自動で取得することに何度も成功し、最大で46,000枚の写真を連続撮影することができた。全体の撮影時間は倍率やパラメータ設定によって変わるが、1,000～2,000枚であれば1～2時間で撮影可能である。2万枚超の一例として、22,800枚(撮影面積約110 μm×180 μm)の画像では、撮影完了までに30時間37分であった。

(2) 広域TEM像タイリングプログラム：

デジタル写真のつなぎ合わせ(タイリング)は、市販のデジタルカメラやAdobe Photoshopなど画像ソフトウェアで容易に合成できるようになった。生物学の分野でも、光学顕微鏡により撮影した組織染色切片や蛍光像のタイリングは顕微鏡付属のソフトウェアで簡単に行えるようになっていた。しかし、グレースケールのTEM写真はカラー写真に比べ1/3の画像情報しかない上、植物細胞や植物組織にはタイリングの目印となる構造体をほとんど含まない巨大液胞と細胞間隙が多いため市販のソフトウェアではタイリングが難しい。そこで筆者らはコマンドラインで実行するJavaアプリケーションを開発し、次の①～③の順でプログラム処理を行っている。① ビーム制御により取得した画像を結合(ビームタイリング)、② ①で結合した画像同士を結合(ステージタイリング)、そして、③ 一枚の結合画像を出力する(図3)。このプログラムは広域TEM自動撮影時に出力してある位置情報やのりしろの情報をもとに、正しい順序で画像を整列し、のりしろ部分の局所的な画像情報を元に独自の画像処理アルゴリズムを用いることで、短時間でタイリングが可能になっている。

本プログラムで、液胞や細胞間隙をほとんど含まない植物組織と動物細胞では高い精度で画像をつなぎ合わせることに成功している。タイリング全体にかかる時間は、PCのCPU速度や搭載メモリ量、タイリング設定や画像内容に依存する。例として、根端を撮影した13,650枚の画像では、タイリング全体で59時間7分であった(8 core CPU、メモリ128 GBの場合)。タイリングの目安となる構造が少なく、ステージタイリングでずれが発生する場合、または、撮影中に電子線による損傷や熱により像の歪みが発生している場合は、本プログラムのビームタイリングプログラムでつなぎ合わせたビームタイリング像を、Photoshopの手動ソートと自動合成ツールにより半自動的に合成することで、結合精度の高い1枚のタイリング像を得ている。

結合画像は一辺が数万～数十万ピクセル、数GB～数十GBと巨大ファイルになる。現状では、画素数が2ギガピクセルを超えると、1枚の2次元画像として扱うことは困難である。広域TEM像タイリングプログラムでは、最終的な出力画像のサイズを任意に縮小できるようなパラメータ設定も行える。Photoshopを併用した半自動合成の場合は、Photoshop形式(最大2GB)またはピクドキュメント形式(一辺の最大300,000ピクセル)で保存、使用目的にあわせて解像度を調整しTIFF(最大4GB)やJPEG(最大30,000×30,000ピクセル)等へ書き出している。

高圧凍結技法による広域凍結試料作製

組織や細胞に固定液を徐々に浸透させる化学固定による試料調製法では、細胞内でダイナミックに動くゴルジ体や多

図3 TEM像タイリングプログラムの概要。TEM像タイリングプログラムの流れ：撮影した画像情報と位置情報を元に、① ビーム制御により取得した画像を結合、② ①で結合した画像同士を結合、③ 一枚の結合画像を出力。

胞体など、膜輸送系オルガネラの形態をそのまま固定するのが難しい。そこで試料調製には、細胞を瞬時に凍らせることができる凍結固定法を取り入れた。凍結固定法には、大きく分けて急速凍結法と高圧凍結法(加圧凍結法; high-pressure freezing)がある。急速凍結法では、氷晶無く凍結できる厚さが約20 μm と凍結範囲が狭いため、20-100 μm と大きな細胞を含む植物組織には不向きである。我々は200 μm 以上の厚みを凍結固定できる高圧凍結法により試料調製を行った。高圧凍結法とは、試料に約2000 barの高圧を加えると同時に液体窒素により物理固定する方法で、この高圧により氷晶の発生や成長を抑え、試料の微細構造の損傷を防ぐことができる。特に細胞内輸送に関わるオルガネラに注目して広域TEM像を取得する場合は、この高圧凍結法を用いて試料調製している。

具体的には、植物器官(根端、葉、茎頂など)を、鋭利なカミソリで挫滅のないよう細切し、直径1.2-1.5 mm、深さ0.2-0.4 mmの穴のあいた平板試料キャリアに載せる(図4A-D)。キャリア内を満たす溶液として、0.1 M ショ糖を含むMS液体培地または水を用いている。細切後すぐに高圧凍結装置(Leica EM-PACT: 図4E)で凍結し、続いて凍結置換を行う。初めに、-80°Cで2~7日間、2% オスミウム・アセトン溶液による凍結置換を行い、それから2日間かけて4°Cまで温度を上げる。凍結置換の際、我々は超低温アルミブロック恒温槽として販売されている温度制御プログラム機能付クライオポーター(サイニクス社)で-80°Cから4°Cまでの凍結置換を行っている(図4F)。本装置は装置自体が比較的安価で、液体窒素を使わないため簡便に出来る点で優れている。試料をアセトンで洗い、Epon812樹脂に置換・包埋後、ウルトラミクロトーム(Leica EM-UC7)で目的の組織全体が入る大きさで超薄切片を作製する。切片はホルムバール支持膜を張った単孔グ

リッド(孔径1 mm $\times$ 2 mm)に載せ、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色した(図4G)。この方法により次項に示す例の他、シロイヌナズナ茎頂や葉、タバコ根端、シロイヌナズナ培養細胞など様々な植物種、器官、組織もしくは培養細胞で良好な凍結固定像を得ている。しかしながら、巨大な液胞を含む100 μm を超える大きな細胞を多数含む組織を凍結固定するのは非常に困難であり、今後の課題である。

広域TEM像自動取得システムを用いた組織および培養細胞の観察

本システムを用いて、様々な組織や細胞を自動撮影し、広域TEM像取得に成功している。本稿では、具体例として高圧凍結固定したシロイヌナズナ根端とタバコ培養細胞BY-2株について述べる。

(1) シロイヌナズナ根端の広域TEM撮影

高圧凍結/凍結置換法により調製した発芽7~14日目のシロイヌナズナ根端をEpon812樹脂に包埋し、そのブロックから広域超薄切片を作製した(図4AとB)。連続切片を単孔グリッドのホルムバール支持膜上に、しわが入らないよう掬い上げ、乾燥させ二重染色した(図4H)。そのグリッドを電頭用試料ホルダーに載せ、広域TEM自動撮影システムにより、リボソームや小胞が識別できる倍率(JEM-1400・ボトムマウントCCDカメラで12,000倍)で約3,000枚のTEM像を得た。さらに得られた写真をTEM像タイリングプログラムのビームタイリングプログラムにより結合させ、Photoshopの手動ソフトと自動合成ツールを組み合わせることで1枚の画像を得た(図5A)。光学顕微鏡レベルで観察可能な液胞や核以外のオルガネラでも各組織によって分布や形態が異なることがわかった。また、トランスゴルジ網や分泌に関わる小胞クラス

図4 広域高圧凍結切片作製の概要。(A) シロイヌナズナの根端をMS培地内で細切し、平板試料キャリアに搭載。(B) シロイヌナズナの根端約1 mmを3本載せた平板試料キャリア。(C) 水分を軽く吸い取りピンセットですくい上げたBY-2細胞。(D) 空気が入らぬようにBY-2を満たした平板試料キャリア。(E) 高圧凍結装置。(F) 凍結置換に用いている温度制御プログラム機能付超低温アルミブロック恒温槽。(G) ホルムバール支持膜を張った単孔グリッド(孔径1 mm $\times$ 2 mm)。(H) シロイヌナズナ根端全体を含む連続超薄切片を載せた単孔グリッド。

図5 シロイヌナズナ根端とタバコ培養細胞BY-2の広域TEM像
高圧凍結法により調製したシロイヌナズナ根端とBY-2細胞の超薄切片を広域TEM像撮影。ビーム制御により撮影した25枚のTEM像をビームタイリングプログラムにより結合し、そのビームタイリング像をPhotoshopの手動ソフトと結合プログラムにより1枚のタイリング像を得た。(A) 発芽2週目のシロイヌナズナ根端領域の広域TEM像。3,025枚の写真を撮影・結合し、ファイルサイズ2.19 GB、29,000ピクセル $\times$ 45,000ピクセルの写真を得た。左下は口の部分の拡大写真。(B) 対数増殖期のBY-2細胞の広域TEM像。3,825枚の写真を撮影・結合し、ファイルサイズ1.28 GB、39,721ピクセル $\times$ 37,020ピクセルの写真を得た。左下は口の部分の拡大写真。右下は、デジタル写真1枚のサイズと、ビームタイリングで25枚つなぎ合わせた写真のサイズを示す。

ターは大きな表皮細胞などに多く、さらに、ER ボディ様の構造体は側部根冠領域に多く観られ、組織間でオルガネラの分布や形態が大きく異なることが見えてきた。

(2) タバコ培養細胞BY-2株増殖期の広域TEM撮影

対数増殖期(継代3日目)の培養細胞を平板試料キャリアに載せ、高圧凍結した後、オスミウム・アセトン溶液で凍結置換した。アセトン洗浄後、糖タンパク質と膜のコントラストを上げるために、我々は1%タンニン酸・アセトン溶液によるブロック染色を行っている(Toyooka et al. 2009)。タンニン酸は特に糖タンパク質を良く染め、酵母ではポストゴルジ区画が良く染まることが報告されている(McDonald and Muller-Reichert 2002)。この方法はRandy Schekman 研究室のSusan Hamamoto氏からの情報を元に、高圧凍結/凍結置換法に応用した。Epon812樹脂包埋後、以降(1)と同様に通常より大きめの超薄切片を作製し、TEMにセットした。凍結が良好でかつ目的の細胞周期・方向性を持つ細胞を選び、倍率12,000倍で広域TEM撮影システムにより撮影し、3,000から5,000枚の写真を得た。ビームタイリングプログラムとPhotoshopの手動ソートと結合プログラムを併用し、広域高解像度TEM像を得た(図5B)。細胞全体の微細構造が容易に見えたとともに、高圧凍結技法で固定したことにより、ライブイメージングでないと見えないような輸送中の小胞や膜構造など多数確認することができた(図5B拡大写真)。対数増殖期と定常状態期の広域TEM像から輸送系オルガネラを定量した結果、対数増殖期から定常状態期にかけてゴルジ装置の層板数と大きさ・小胞クラスターの数とその小胞数は減少していたことから、分泌系オルガネラは急速に減衰することが見えてきた。このような現象は、限られた部位の高倍率撮影・観察では得られない知見である。

広域TEM像自動取得システムの応用と今後の展望

広域TEM像自動取得システムにより通常では撮影できないギガピクセルクラスのTEM像を得られるようになった。しかし、取得した広域TEM像のファイルサイズは、数GB～数十GBと非常に大きいため、Photoshopなど特殊アプリケーションでなければ観ることができない。そこで我々は、理研CSRSの持田・櫻井らとともに、広域TEM像をウェブブラウザ上で容易に閲覧/検索することができる「電顕アトラス」の構築を進めている。今後、タブレット型デバイスやスマートフォンがさらに普及し、高校や大学などの教育現場で導入されていくと予想される。誰でも簡単にアクセスできるインターフェイスで、OSやブラウザーに依存しない顕微鏡像のデータベースを作成し、そこでオルガネラに印を付けた細胞小器官から組織レベルまでの広域TEM像を電子地図のようにシームレスに標示できれば、オミックス情報や他のデータベースと統合できるようになるとともに、TEMを扱ったことのない研究者や学生でも容易にTEM像の閲覧が可能となると期待される。

さらに、撮影した広域TEM写真を用いて、東大の桧垣らとともに、特定の注目した微細構造を半自動的に検出するプログラムを開発している。これは、蛍光顕微鏡画像や核磁気共鳴画像など、多様なバイオ画像を目的別に評価・分類することのできるCARTA: Clustering-Aided Rapid Training Agent (Kutsuna et al. 2012)を広域TEM像に応用している。現在、ミ

トコンドリアやプラスチドなど特定のオルガネラ検出が可能となりつつある。

近年、集束イオンビームやウルトラマイクローム機能をもつ高分解能走査電顕により広域かつ3次元の電顕像が得られるようになりつつある(Lichtman and Denk 2011)。しかしながら、そのような機器は非常に高価でランニングコストがかかり、技術的にはいかにコントラストを上げるか、大容量の3Dデータをどのように扱うか、など問題点も多い。我々の広域TEM像自動取得システムは、CCDカメラと電動X-Yステージを搭載したTEMであれば(現状では日本電子製のみ対応)、MATLABとJEM ToolBoxをインストールした外部PCを導入し、我々が開発したスクリプトを実行するだけで広域TEM画像を取得でき、TEM像タイリングプログラムで画像をつなげ合わせることができる。

開発時に問題になったのは、広域TEM像のファイルサイズである。広域TEM像は汎用ファイル形式のTIFFで、ファイル全体で数GB～数十GBに達し、また、ピクセルサイズも10億(ギガ)ピクセルを優に超える。このような大きなファイルは、条件を満たしたパソコン・OS・アプリケーションでなくては扱うことができず、扱えたとしても動作不安定になることが多い。そのため、大容量メモリと大容量なハードディスクを要し、我々はタイリングの際、96 GBまたは128 GBのメモリを搭載し、10テラバイト(TB)のハードディスクを搭載するデスクトップPCを用いている。さらに、ファイルフォーマット形式には最大ファイルサイズまたは最大ピクセル数の上限があり、また、LANやサーバーなどネットワーク経由で転送する際のファイルサイズの上限があるため、今後はファイルを分割してタイリングするなど工夫が必要である。

広域TEM像自動取得システムにより、今まで得られなかった広域TEM像を簡便かつ短時間で取得できるようになった。撮影した広域TEM写真は、オルガネラの分布や超微形態観察だけでなく、シミュレーションの基礎データや画像統合データベース、教育など様々な用途が考えられる。全自動撮影と結合システムを改良し広域TEM像取得法の確立をより確実なものにするとともに、光学顕微鏡や高分解能走査電顕との融合、データベースや3次元解析などの応用を目指していきたい。

謝辞

本稿では日本植物学会第76回大会で行なわれたシンポジウム「新世代の画像情報が切り拓く世界」の内容を中心に扱った。オーガナイザーの鮫島正純先生(NPO 総合画像研究支援)ならびに大隅正子先生(NPO 総合画像研究支援)にはこの場を借りて感謝申し上げます。本システムの開発にあたり、東京大学新領域の桧垣匠博士、秋田佳恵氏、馳澤盛一郎先生、日本女子大学の澤木史江氏、小林恵氏、理研CSRSの若崎真由美氏、橋本恵博士に多大なるご協力を頂きました。また、九州大学の松岡健先生にはタバコ培養細胞の広域TEM解析に助言を頂きました。システムインフロンティア社の古河弘光氏、片桐康代氏にはJEM Toolboxを用いた広域TEM撮影プログラムのセットアップと助言を頂きました。理研CSRSの持田恵一博士、吉田拓広氏、櫻井哲也氏には電顕アトラスの構築に多大なるご協力を頂きました。この場を借りてお礼申し上げます。本研究は、科学研究助成金 若手研究(A) 24687007(代表: 豊岡)、挑戦的萌

芽研究 23657051 (代表：豊岡), 新学術領域研究 23120526 (代表：永田), 若手研究 (B) 24770038 (代表：朽名) による支援を受けました。

引用文献

- Arimura, S., Yamamoto, J., Aida, G. P., Nakazono, M., and Tsutsumi, N. (2004) Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7805-7808.
- Bock, D. D., Lee, W. C. A., Kerlin, A. M., Andermann, M. L., Hood, G., Wetzel, A. W., Yurgenson, S., Soucy, E. R., Kim, H. S., and Reid, R. C. (2011) Network anatomy and in vivo physiology of visual cortical neurons. *Nature* 471: 177-182.
- Kitajima, A., Asatsuma, S., Okada, H., Hamada, Y., Kaneko, K., Nanjo, Y., Kawagoe, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Takeuchi, M., Nakano, A., and Mitsui, T. (2009) The Rice alpha-Amylase Glycoprotein Is Targeted from the Golgi Apparatus through the Secretory Pathway to the Plastids. *Plant Cell* 21: 2844-2858.
- Kutsuna, N., Higaki, T., Matsunaga, S., Otsuki, T., Yamaguchi, M., Fujii, H., and Hasezawa, S. (2012) Active learning framework with iterative clustering for bioimage classification. *Nat Commun* 3: 1032.
- Lichtman, J. W., and Denk, W. (2011) The Big and the Small: Challenges of Imaging the Brain's Circuits. *Science* 334: 618-623.
- McDonald, K., and Muller-Reichert, T. (2002) Cryomethods for thin section electron microscopy. *Methods Enzymol* 351: 96-123.
- Schermelleh, L., Heintzmann, R., and Leonhardt, H. (2010) A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J Cell Biol* 190: 165-175.
- Toyooka, K., Goto, Y., Asatsuma, S., Koizumi, M., Mitsui, T., and Matsuoka, K. (2009) A Mobile Secretory Vesicle Cluster Involved in Mass Transport from the Golgi to the Plant Cell Exterior. *Plant Cell* 21: 1212-1229.
- Yamada, K., Nagano, A. J., Nishina, M., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M. (2008) NAI2 Is an Endoplasmic Reticulum Body Component That Enables ER Body Formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20: 2529-2540.

Received: 31 January 2014