特集 「細胞の機能を 3D イメージングで観る」

はじめに

鮫島正純, 大隅正子

認定特定非営利活動法人 総合画像研究支援 (IIRS) 〒102-0093 東京都千代田区平河町 1-7-5-103

要旨：3D イメージングの発展により、細胞や組織の微細形態のみならず、その機能を“観る”ことができるようになってきた。この特集では、従来から活用されてきた連続超薄切片法、走査電子顕微鏡 (SEM) 内で試料表面を超薄切することにより露出した表面を連続して観察する方法である Serial block-face scanning electron microscopy (SBF-SEM) と Focused ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM)、トモグラフィー法として X 線マイクロ CT、および光学顕微鏡として 2 光子顕微鏡を取り上げた。これらの技法により得られた 3D 像による研究成果を通じて、古典的な連続超薄切片法の効用を再認識するとともに、最新の 3D 技術の有効性を紹介する。なお本特集は、植物形態学会および認定特定非営利活動法人 総合画像研究支援 (IIRS) の共催のもと、2014 年 9 月 12 日に公益社団法人日本植物学会第 78 回大会で開催された同名のシンポジウム発表をまとめたものである。

Observing the cell function by 3D imaging

Introduction

Masazumi Sameshima, Masako Osumi

Integrated Imaging Research Support, 1-7-5-103 Hirakawacho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0093, Japan

Author for correspondence: M. Sameshima, sameshima@jiirs.org

Summary: Recent development of the 3D imaging has read us “to observe” the function as well as fine structure of cells and tissues. In this special issue, techniques and practice of four different methods for the 3D imaging: traditional serial ultra-thin sectioning, serial block-face scanning electron microscopy (SBF-SEM), focused ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM), X-ray micro-Computed Tomography and 2 photon microscope, are presented and discussed. This issue is based on the symposium held at the 78th Annual Meeting of the Botanical Society of Japan and co-hosted with The Japanese Society of Plant Morphology and Integrated Imaging Research Support.

Key words: 3D imaging, Serial ultra-thin section, SBF-SEM, FIB-SEM, X-ray micro-CT, 2 photon microscopy

かつての 3D イメージング法は、電子顕微鏡、光学顕微鏡に関わらず、連続切片画像を“手書き”で書き写し、さらに模型として、あるいは“立体図”として再構成してから観察するという大変に手間暇のかかるものであった。その後、共焦点レーザー顕微鏡の出現により光学 3D イメージを手軽に取得できるようになり、さらに電子線トモグラフィー法や単粒子解析の実用化により、細胞や組織に加えて分子の 3D イメージングが可能となっている。これらに加えて最近では、走査電子顕微鏡 (SEM) の鏡体内で試料表面を超薄切し、露出した表面をそのまま連続して SEM で観察する方法が生物試料でも実用化したことにより、細胞や組織レベルでの 3D イメージングの応用範囲が一層広がりがつつある。

本特集では、3D イメージング法のうち、従来から活用されてきた連続超薄切片法、SEM 内の試料表面を連続して観察する最新の方法である Serial block-face scanning electron microscopy (SBF-SEM) と Focused ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM)、トモグラフィー法である X 線マイクロ CT、および光学顕微鏡からは超解像顕微鏡

である 2 光子顕微鏡を取り上げ、それらの技法と応用の最先端をご紹介いただいた。なお、本特集は、日本植物形態学会および認定特定非営利活動法人 総合画像研究支援 (IIRS) の共催により、120 名の参加者のもと、2014 年 9 月 12 日に公益社団法人日本植物学会第 78 回大会で開催された同名のシンポジウム (参照：シンポジウム演題と講演者欄) を、講演者の方々のご協力を得てまとめたものである。

大田先生は、直径約 30 μm の比較的大きい球状細胞を持つ微細藻類であるヘマトコッカス藻 (*Haematococcus pluvialis*) の 370 枚もの連続超薄切片や、比較的小さな微細藻類である 2 種のクロレラ *Chlorella sorokiniana* と *Parachlorella kessleri* の約 960 枚の連続切片を作成された。それらの 3D 再構成像から、培養条件によるオルガネラのダイナミックな変貌の詳細な解析結果を報告された。これは、職人技と時間を要する従来の超薄連続切片法が、細胞小器官の解析に威力を発揮することを示している。

Gatan 社製の In-chamber 型マイクロームシステム (3View) を ZEISS 社製の FE-SEM に取り付けた SBF-SEM を駆使された宮崎先生は、SBF-SEM の原理、特徴および技法を解

説され、さらに酵母細胞や血球細胞の観察例を示された。一方、将来の炭素循環型の原料として期待されているセルロース系バイオマスのキーとなる、セルロース分解酵素生産微生物である糸状菌 *Trichoderma reesei* のセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子発現応答メカニズムの全容を解明することを目指している小笠原先生は、従来のゲノミクスに形態オミクスを融合させた解析手法と概念を提唱された。形態オミクスとして細胞壁構造を FIB-SEM を用いて解析し、さらにそれらの結果をゲノムオミクスと統合して、植物細胞壁高分解糸状菌の生存戦略を提示された。

ソフト X 線を利用した顕微鏡観察は、厚い細胞壁を持つ植物組織の観察に有効であると古くから判断されていた。唐原先生は放射光施設 SPring-8 を利用した X 線マイクロ CT (Computed Tomography) をシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 種子やイネ (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare) の一次根の観察に応用し、再構成した 3D モデルからそれらの器官・組織の形態観察に有用であることを示された。

生きた状態における 3D イメージングは、電子顕微鏡が最も苦手とする分野である。それが可能であり、しかも高解像度であるにもかかわらず、組織に対する低侵襲性や深い到達性などの特徴を持つのが、2 光子顕微鏡である。村田先生は、2 光子スピニングディスク顕微鏡法を用いて、分裂しているタバコ BY-2 細胞を解析し、Preprophase band の形成過程を詳細に報告された。

シンポジウムでは手法の異なる、魅力的な多数の 3D 象が示された。しかしその取得に関しては、2 光子顕微鏡を含む光学顕微鏡やトモグラフィーに比べて、TEM にしろ SEM にしろ、連続切片像の 3D 再構成は、コンピュータと解析ソフトの進歩により労力が以前に比べると大幅に軽減

されたとは言え、未だに時間を要するものとなっている。それは、3D 再構成過程上の重要な手順である“画像の軸合わせ”が、依然として経験に頼る“手作業”であることによる。そのためこの過程が、統計的に有意な結果を得るために必要な数の 3D 像を得るためのボトルネックとなっていることから、その自動化の開発が強く望まれる。最後に、本シンポジウムを共催して下さった日本植物形態学会に深く感謝する。

シンポジウム演題と講演者

1. はじめに
鯨島正純 (総合画像研究支援)
2. 藻類バイオと電顕 3D
大田修平, 河野重行
(東大・院・新領域, 科学技術振興機構 CREST)
3. 連続ブロック表面走査型電子顕微鏡 (SBF-SEM) による細胞小器官の形態観察
宮崎直幸, 村田和義 (生理研・形態情報解析)
4. 植物細胞壁高分解糸状菌の生存戦略
小笠原渉, 志田洋介 (長岡技科大・生物系)
5. X 線マイクロ CT を用いた植物の根および種子の 3D イメージング
唐原一郎¹, 山内大輔², 峰雪芳宣²
(¹富山大・理・生物, ²兵庫県立大・院・生命理学)
6. 植物細胞分裂のダイナミクスを 2 光子顕微鏡を用いて立体的に観察する
村田隆 (基生研・生物進化)
7. 総合討論

Received: 30 January 2015

写真左より大隅正子オーガナイザー、村田隆先生、宮崎直幸先生、大田修平先生、唐原一郎先生、小笠原渉先生、鯨島正純オーガナイザー