

ライブクレム顕微鏡法



技術解説

原 口 徳 子*, 平 岡 泰**

Live correlative light and electron microscopy

Key Words : live CLEM, CLEM, live cell imaging, fluorescence microscopy, electron microscopy

はじめに

生細胞を可視化するライブセルイメージング技術は、生命科学分野には欠かせない重要な技術である。特に、蛍光顕微鏡を用いた蛍光イメージングは、目的分子だけを蛍光で光らせて観察するので、分子特異的なコントラストの高い画像を得ることができる点で優れている。しかも、細胞を生かしたままの状態で観察できるので、細胞内分子の局在の時間変化を追跡できる。しかし、得られる画像の空間分解能が比較的低いことが問題である。一方、電子顕微鏡法は、細胞構造を高い分解能で観察できる点で優れているが、細胞を生きたままの状態で観察できないという問題点がある。この2つの観察法を組み合わせることによって、両者の利点を活かすのがライブクレム法 (Live CLEM; live cell imaging associated correlative light and electron microscopy) である

[1, 2]。まず、生きた細胞を、蛍光顕微鏡を使って連続的に観察（画像取得）した後に、同じ細胞を電子顕微鏡で観察し、2つの方法で得られた画像を比較し相関を取る。本稿では、分子ダイナミクスをナノメートルオーダーの高い分解能で観察できるナノイメージング法として、ライブクレム法について解説する。

1. クレム法（光学・電子顕微鏡相関法）

クレム法 (CLEM; correlative light and electron microscopy) は、光学顕微鏡で観察したのと同じ場所（細胞や細胞構造）を、電子顕微鏡で観察し、2つの方法から得られた画像を比較し相関をとる方法である。使用する顕微鏡は自由で、蛍光観察も電子顕微鏡観察も、色々な装置や方法を自由に組み合わせることができる。光学顕微鏡としては、蛍光顕微鏡が使われることが多い。ライブクレム法との違いは、ライブクレム法が生きた細胞での蛍光観察を行うのに対して、クレム法では、かならずしも生きた細胞で行う必要がなく、主に化学固定した細胞を対象として行われる点である。すなわち、細胞を、グルタルアルデヒドなどの化学固定剤を使って殺したサンプルに対して、蛍光顕微鏡観察と電子顕微鏡観察を行うのである。生きた細胞を蛍光観察の対象としているかどうかは僅かな違いに感じるかもしれないが、実際には、使える蛍光プローブに大きな違いを生じるため、実行上の差は大きい。例えば、クレム法の場合は、蛍光試薬として、蛍光励起時に酸素ラジカルが生じやすい蛍光色素を用いる方法が開発され利用されているが、生きた細胞で蛍光観察する場合は、このような蛍光試薬は使うことができない。いずれの方法であっても、蛍光観察した場所と同じ場所を電子顕微鏡で観察することが必要である。観察場所を特定するための道具として、番地付きの



* Tokuko HARAGUCHI

1954年5月生
お茶の水女子大学大学院 家政学研究科
食物学専攻 修士課程卒業（1979年）
現在、国立研究開発法人 情報通信研究
機構 未来ICT研究所 フロンティア創
造総合研究室 主任研究員 医学博士
細胞生物学
TEL : 078-969-2241
FAX : 078-969-2249
E-mail : tokuko@nict.go.jp



** Yasushi HIRAKAWA

1957年1月生
京都大学大学院 理学研究科 生物物理学専攻 博士課程卒業（1985年）
現在、大阪大学 生命機能研究科 教授
理学博士 細胞生物学
TEL : 06-6897-4620
FAX : 06-6897-4622
E-mail : hiraoka@fbs.osaka-u.ac.jp

カバーガラスを利用する（図1）。この番地付きのカバーガラスをプラスティックの培養器の底に貼った、クレム用ガラスボトムティッシュが市販されている。

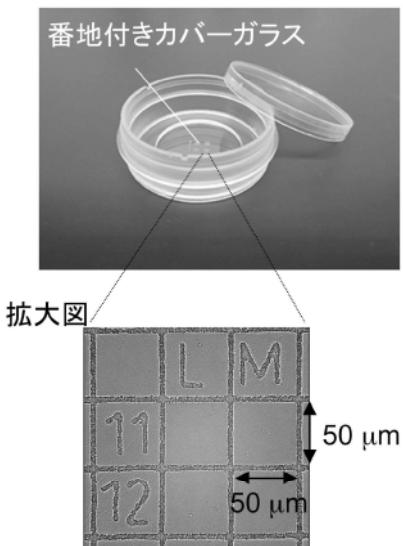


図1. クレム用培養器
培養器の底には、番地が付いたカバーガラス
が貼ってある。番地部分の拡大図。

a. クレム用プローブ

クレム観察するために、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡の両方で観察できるプローブが必要である。クレムプローブは、主に2つに大別される。ひとつは、蛍光および電子顕微鏡の両方で検出できるプローブを用いる方法である。例えば、量子ドット（quantum dot）や蛍光ナノゴールドがそのようなプローブとして開発されている。これらの方法は、同じプローブで蛍光画像と電子顕微鏡画像を取得できるため、得られた蛍光画像と電子顕微鏡画像を直接比較することができる。そのため、蛍光画像と電子顕微鏡画像の相関を付けることが比較的容易である。もうひとつは、蛍光顕微鏡では観察できるが、電子顕微鏡では直接観察できないタイプである。この場合、電子顕微鏡観察のためには、3, 3-diaminobenzimidazole (DAB) を用いて電子顕微鏡で観察可能な染色を行う[3]。DABは、蛍光で励起した際に生じた酸素ラジカルと反応し重合物（または沈殿物）を生成する（図2a）。このDAB重合体は、酸化オスミウムに容易に反応するため、電子顕微鏡下で黒い像として検出することができる（図2b,c）。この方法では、蛍光分子が

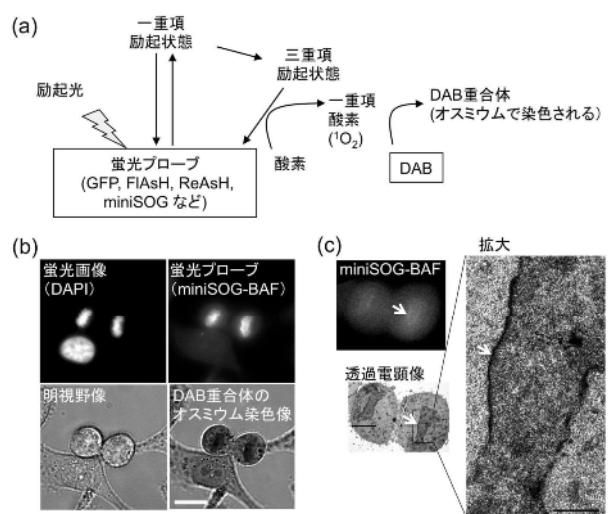


図2. 蛍光プローブの励起による電顕観察可能なDAB重合体の形成

- (a) DAB重合体形成の原理
- (b) 分裂中のヒト培養細胞（HeLa細胞）。すべて同一細胞の画像。左上図は、蛍光色素DAPIで染色された染色体。右上は、miniSOG融合BAFタンパク質の蛍光画像。左下は明視野像。右下は、明視野像に、mini-SOG-BAFの励起によって得られたDAB重合体のオスミウム染色像を重ねたもの。
- (c) 左上はminiSOG-BAFを励起した後の蛍光画像。左下は、同一細胞の電子顕微鏡画像。右は、一部の拡大像。

存在した場所だけが、電子顕微鏡で黒く染まって観察されるので、蛍光観察像と電顕画像の位置合わせが、より直接的で、正確となる。使用できる蛍光試薬は比較的広く、効率よく酸素ラジカルを発生する蛍光分子であれば、どれでも使うことができる。

• 蛍光ナノゴールド (FluoroNanogold)

蛍光・電子顕微鏡両用プローブのひとつで、抗体のFab断片タンパク質に、ナノメートルサイズ（1.4ナノメートル）の小さなゴールドクラスター（電子顕微鏡で観察可能）と蛍光色素（蛍光顕微鏡で観察可能なフルオレセインやアレクサなど）の両方が付いたものが使われる（図3a）[4]。抗体は、特定の分子や構造を認識して結合するので、分子特異的な染色が可能である。固定細胞で、抗体を使って目的分子の局在を調べる方法として間接蛍光抗体法がある。目的分子に対する特異的抗体を目的分子と反応させ、さらに、その特異的抗体を、蛍光標識した二次抗体を用いて検出する方法である。直接分子を検出する方法でなく、二次抗体を用いて間接的に目的分子の局在を検出するために間接蛍光抗体法と呼ば

れる。二次抗体として、一次抗体に特異的な蛍光ナノゴールド抗体を用いることにより、クレム観察をすることができる。抗体は分子サイズがそれほど大きくなないので、比較的マイルドな界面活性剤処理をするだけで細胞内に浸透することができる。この方法の欠点としては、微小なゴールドクラスターを、電子顕微鏡で直接観察できず、銀増感と呼ばれる処理を行う必要があることが挙げられる。この銀増感処理は、時おり、よくわからない理由でシグナルを増感できないことがあるのが問題である。このような問題があるものの、この方法は、細胞生物学分野で普及している間接蛍光抗体法と手順が同じであるため、細胞生物学分野では、汎用性のある方法として普及していく可能性がある。

・量子ドット (Quantum dot)

量子ドットも、蛍光・電子顕微鏡両用プローブのひとつである。量子ドットは、CdSe やその関連物質からなる半導体の結晶である。結晶のサイズによって蛍光の波長が異なる。励起の波長依存性がなく、どの波長でも同じように励起できるために、1種類の励起光源で、すべての種類の量子ドットを励起することができる。蛍光がきわめて明るく退色も遅いなど、従来の低分子蛍光色素や蛍光タンパク質などに比べて優れた蛍光特性を持っている。その上、量子ドットは電子密度が高く、電子顕微鏡でも容易に検出することができる。そのため、クレムのプローブとして大変有用である。実際、上述した間接蛍光抗体法の二次抗体を標識する蛍光色素として量子ドットを使うことによって(図3b)、クレムを行った例が示されている[5]。量子ドットは、フルオレッセインやローダミンのような低分子の蛍光色素と異

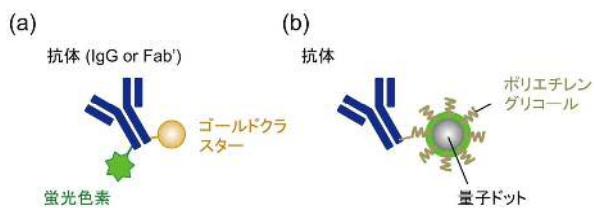


図3. 蛍光・電子顕微鏡両用プローブ

- (a) 抗体(IgG or Fab)と蛍光色素とナノサイズのゴールドクラスターを結合させたもの。抗体として IgG か Fab 断片が使われる。
- (b) 抗体と量子ドットを結合したもの。量子ドットに親水性を持たせるためにポリエチレングリコールなどの修飾が付ける。

なり、非常に疎水性が高いため、細胞内で非特異的結合が起こりやすいという問題がある。しかし、最近では、表面コーティングで親水性を持たせて、細胞内部への非特異的結合を軽減した量子ドットが開発されており、今後、クレム法にとって、より重要なツールとなる可能性がある。

・蛍光タンパク質

GFP をはじめとする各種の蛍光タンパク質も、クレムに利用することができる。GFP は、電子顕微鏡では直接観察できないので、電子顕微鏡観察のためには、上述した DAB を利用する。具体的には、まず蛍光観察が終了したサンプルを、グルタルアルデヒドなどで化学固定した後、強い励起光を照射し蛍光をブリーチさせる。このとき酸素ラジカルが発生する。その酸素ラジカルを DAB と反応させると、DAB が重合したポリマーが形成される。この DAB ポリマーは、オスミウムと反応すると、電子顕微鏡で観察可能な黒ずみとなる。実際、この方法を使って、ゴルジ嚢内における GalNAc-T2 の局在が、非常に高い分解能で解析されている[6]。また、生細胞で FRAP 法を用いて分子移動度を解析したのちに、この方法で電顕観察することも可能である。DAB ポリマーが形成されるためには、蛍光励起の間に、効率良く酸素ラジカルを生成することが重要である。GFP は量子効率が高く、蛍光励起をしても発生する酸素ラジカルの量はそれほど多くないため、クレムに有用な試薬という訳ではない。より有用なものとして、蛍光励起の際に酸素ラジカルを生じ易い蛍光タンパク質が多数開発されている。その中でも、mini-SOG (mini singlet oxygen generator) は、極めて有用なクレム用蛍光タンパク質である[7]。このタンパク質は、シロイヌナズナのフォトトロピン 2 と呼ばれるタンパク質を改変したもので、分子量は、約 15 キロダルトンと比較的小さい蛍光タンパク質である。青い光で励起すると、大量の酸素ラジカルを発生するため、クレムに非常に適している。

・テトラシティンタグ

GFP などの蛍光タンパク質は比較的大きいため、複合体のサブユニットとして機能するようなタンパク質に融合させて使う場合は、本来の機能が損なわれてしまう可能性がある。このような場合は、タグ

となる蛍光色素を小さくすることが時に有効である。GFPよりもはるかに小さいサイズで、かつ遺伝子レベルでの導入が可能なタグとして開発されたのが、テトラシスティンタグである[8]。テトラシスティンタグは、4つのシステイン残基を含む短いアミノ酸配列（6-20アミノ酸長）から成り、二砒素(biarsenica)化合物(FlAsH-EDT₂、ReAsH-EDT₂)と特異的に反応すると、蛍光を発するようになる。具体的には、目的タンパク質にテトラシスティンタグを付加した融合タンパク質を細胞に発現させ、望みのタイミングで FlAsH-EDT₂（あるいは ReAsH-EDT₂）を培地中に添加する。FlAsH-EDT₂は単独では蛍光を発しないが、テトラシスティンタグと結合すると緑色の蛍光（ReAsHの場合は赤色）を発するようになる。電子顕微鏡観察をする場合は、上述したGFPの場合と同様、蛍光をブリーチさせ、生じた酸素ラジカルによってDABを重合させ、オスミウムと反応させることによって電顕用染色を行い、観察を行う。

• ランタノイド(Ln)錯体

蛍光色素の他に、電子顕微鏡観察用として、ランタン(La)やセリウム(Ce)、プラセオジム(Pr)など、それぞれのランタノイド分子を2分子のDABに配位結合したもの(La-DAB2, Ce-DAB2, Pr-DAB2など)を使う方法が開発されている[9]。これらの錯体は、蛍光色素を励起することによって発生する活性酸素と反応して重合し、電子顕微鏡で観察可能な沈殿(黒ずみ)となる。ここでは、この黒ずみそのものを電子顕微鏡観察するのではなく、エネルギーーフィルター透過電子顕微鏡(EFTEM)を使って電子エネルギー損失分光スペクトルを測定することで、それぞれのランタノイド元素の局在を識別する。電子エネルギー損失分光スペクトルは、元素ごとに特徴的なピークを示すことから、それぞれのランタノイド元素に由来する成分を分離して検出することができる。分子特異的な画像を重ね合わせすることで、電子顕微鏡観察でありながら、あたかもマルチカラー蛍光顕微鏡法を使った解析のように、擬似カラー表示することが可能となる。蛍光色素としては、NBD(nitrobenzoxadiazole)やminiSOGなどを使った方法が紹介されている[9]。

b. クレム用蛍光・電顕一体型装置

装置としては、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡と、それぞれ独立した装置を使う方法が主流である。その場合、必然的に、サンプルを蛍光顕微鏡から電子顕微鏡へと移動されることになる。従って、蛍光観察した場所を電子顕微鏡観察する時に探し出す必要がある。番地付きのカバーガラスは、これを実現するためのツールである。しかし、蛍光観察した場所を電子顕微鏡観察時に探し出すのは、時には大変煩わしく困難である。これを解決するために開発されたのが、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡がひとつの装置に組み込まれた一体型の顕微鏡である[10-12]。この装置は、蛍光顕微鏡観察をしている場所を、スイッチを切り替えるだけで、電子顕微鏡観察ができるため、クレム観察の時間を最小にすることができる。従って、クレム観察に極めて有用である。しかし、問題点としては、サンプルとして、電子顕微鏡観察用のエポキシレジンに埋め込まれているものが必要であるため、生きた細胞での観察はできない。

2. ライブクレム法

この方法は、まず、生きた細胞での目的分子の挙動を、蛍光顕微鏡法を用いて細胞を生かしたままの状態で蛍光イメージングを行う(図4,上段)。蛍光による生細胞観察をするための蛍光顕微鏡装置として、広視野蛍光顕微鏡装置や共焦点顕微鏡装置など、様々な種類のものが利用できる。生細胞観察中の望みのタイミングで、観察中の細胞を化学固定し、界面活性剤による処理をせずに、電子顕微鏡に必要なサンプル調整を行い電子顕微鏡で観察する(図4,下段)。目的に応じて、透過型電子顕微鏡や走査型電子顕微鏡など、望みの装置で観察できる。蛍光画像と電子顕微鏡画像の相関を取り際に重要なことは、化学固定した後に、目的細胞の蛍光画像を、焦点を変えながら一揃いの三次元画像を撮像しておくことである。この蛍光三次元画像と電子顕微鏡画像を比較し、どの焦点面の蛍光画像が電子顕微鏡画像に対応するかを検討し、最も適切な画像を使って蛍光画像と電顕画像の相関を検討する。この方法の利点は、試料作製の過程で界面活性剤を使用しないために、膜構造が本来の状態に保たれており、細胞の微細構造が大変きれいな電子顕微鏡画像が得られる点である。そのため、蛍光分子の局在だけでなく、膜構造

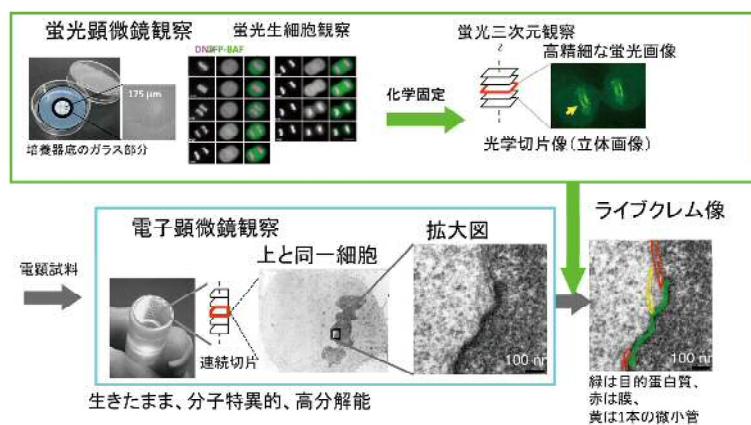


図4. ライブクレム法の概要

まず、蛍光顕微鏡を使って生細胞蛍光観察を行う。その細胞を化学固定し蛍光顕微鏡を使って三次元画像を取得する。そのサンプルをエポンに包埋する。カバーガラス上の番地を頼りに蛍光観察した同一細胞を捜し、電子顕微鏡観察用の切片を作製する。目的細胞の見たい場所を電子顕微鏡で観察する。蛍光画像と電子顕微鏡画像の相関画像を作成する。

や微小管の有無も解析できる。蛍光顕微鏡によるライブイメージングには、特に制限がなく、タイムラプス法で経時観察したもの、FRAP法で分子移動度を解析したもの、FRET法で分子相互作用を解析したものなど、どのようなライブイメージングを行ったサンプルも同様に電子顕微鏡で解析できる。この方法は単純であるが、蛍光観察によって、例えば、細胞分裂からどのくらい時間が経った細胞なのか、目的分子が細胞内のどこに局在して、何と結合しているのかといったことが分かったものを電顕観察するので、分子機能を理解するのに大変有用である。この方法を使って解析した例として、細胞分裂期終期の核膜再形成時に、染色体表面に一過的に形成されるコア構造を示す（図4、右下）。コア構造は、barrier-to-autointegration factor (BAF) と呼ばれるタンパク質が、終期の染色体表面に集合してできる特殊な構造で、核膜が形成されるまで染色体を守る役割と、核膜形成の足場になる役割があると考えられている[1]。この画像によって、GFP-BAFが局在するコア構造と、核膜や微小管の有無や位置関係が明確に判断できる。このコア構造は、染色体分離後のわずか数分間、過渡的に形成される構造のため、ライブイメージングで追跡しなければ、電子顕微鏡で捉えるのは不可能である。

この方法は大変優れた方法であるが、欠点として、蛍光画像と電顕画像の位置合わせが困難なことが挙げられる。蛍光観察は、厚み方向の解像度が低く、

たとえ共焦点蛍光顕微鏡や計算でボケを除くデコンボリューション法を用いて解像度の高い三次元画像を作ったとしても、厚み方向の解像度は約800 nmもある。それに比べて、電子顕微鏡観察に用いる切片の厚みは、その約10分の1の80 nmしかない。のために、電子顕微鏡画像が、蛍光顕微鏡画像のどこに相当するのか、2つの画像の相関は正確には取れないことになる。このような問題を解決するためには、より直接的に蛍光と電顕画像の相関を取りができる方法を使う必要がある。そのような方法として、以下にいくつかの方法を紹介する。

a. ライブクレム用プローブ

ライブクレム法では、生きた細胞で蛍光生細胞観察を行うので、生細胞観察できる蛍光色素・蛍光タンパク質を選択する必要がある。クレム用の蛍光色素・蛍光タンパク質は、蛍光励起時に酸素ラジカルを効率良く発生させるものが多く、酸素ラジカルは生きた細胞にとって強い毒性を発揮するので、それらを利用することは困難である。生きた細胞でも使える蛍光色素・タンパク質を使う必要がある。

• 蛍光タンパク質

GFPなどの蛍光タンパク質は、励起時にそれほど多くの酸素ラジカルを発生しないので、生細胞観察に適している。GFPをライブクレム観察に使う場合には、上述したように、単に画像の相関を取る

場合もあるが、正確に位置決めする場合には、細胞を固定した後に、酸素の存在下で強い励起光を照射することによって GFP をブリーチし、DAB を反応させて、電子顕微鏡用の染色をする必要がある。これとは異なるアプローチとして、GFP に対する抗体を使う方法もある。抗 GFP 抗体にナノゴールドを結合させた抗体を、生きた細胞に微小注入したり、固定細胞と反応させたりすることで、GFP の位置を電子顕微鏡で特定することができる。

• テトラシステインタグ

クレム法で述べたように、目的タンパク質にテトラシステインタグを付加したものを細胞に発現させ、望みのタイミングで二砒素化合物 (FlAsH-EDT₂、あるいは ReAsH-EDT₂) を添加することで、目的タンパク質を蛍光で可視化できる。この方法の特長は、生きた細胞で、パルス一チエイス実験を行うことができる点である。FlAsH-EDT₂ (あるいは ReAsH-EDT₂) を培地に一定時間パルスで添加し、それを除去してから時間をおくことによってチエイスし、チエイスした時間内にどれだけ分子が移動するかを調べることができる。電子顕微鏡観察には DAB 染色を用いる。この手法により、新たに合成されたコネキシン 43 が、ギャップジャンクションの周辺部から、ギャップジャンクション構造に取り込まれていくことが明らかにされている [13]。この方法は、膜透過処理を行う必要がないので、細胞内の膜構造が正常に保たれておりきれいな微細構造が得られる。しかし、問題点として、タグをつけたタンパク質を過剰発現した上に、FlAsH-EDT₂などの薬剤で細胞を処理しなくてはならず、それらの処理によって、細胞機能に悪影響が出る可能性がある。

b. 人工ビーズ

細胞内に人工ビーズを導入して位置合わせの指標として使うことができる。人工ビーズには、プラスチックビーズや磁気ビーズなど様々なものがある。トランスフェクション試薬と共に、細胞とインキュベートすると、マクロピノサイトーシスと呼ばれる仕組みを使って、細胞内に取り込まれる。この人工ビーズは、ライブクレム法を行う場合、よい位置マークとなる。この方法を使って、人工ビーズ周辺で

起こるオートファジー膜の集合が調べられている [14, 15]。

おわりに

電子顕微鏡法は、細胞や組織の微細構造を高い分解能で観察できる優れたイメージング法ではあるが、得られる画像は基本的に分子特異性のない白黒画像である。しかも、生きた細胞での画像は得られず、時間の情報が得られないことが問題であった。しかし、蛍光観察と電子顕微鏡観察を組み合ったライブクレム法、あるいはクレム法の登場によって、静的でモノトーンな観察しかできなかつた電子顕微鏡観察が、動的でマルチカラーな観察となり、電子顕微鏡の有用性は一段と大きくなってきた。今後、蛍光観察と電顕観察の両方が出来るプローブの開発や方法論の開発が進んでくれば、このようなイメージング法は、細胞生物学的な手段として、生命科学の広い分野で、ますます重要な貢献をしていくことだろう。今後の展開が楽しみな分野である。

文献

1. Haraguchi et al., J. Cell Sci. 121, 2540 (2008).
2. Kobayashi et al., Microscopy (Oxf). 65, 296 (2016).
3. Lübke J., Microsc Res Tech. 24, 2 (1993).
4. Robinson and Vandré, J. Histochem. Cytochem. 45, 631 (1997).
5. Wu et al., Nat. Biotechnol. 21, 41 (2003).
6. Grabenbauer et al., Nat. Methods, 2, 857 (2005).
7. Ruiz-González et al., J. Am. Chem. Soc. 135, 9564 (2013).
8. Griffin et al., Science 281, 269 (1998).
9. Adams et al., Cell Chem Biol. 23, 1417 (2016).
10. Sims and Hardin, Methods Mol Biol. 369, 291 (2007).
11. Agronskaia et al., J Struct Biol. 164, 183 (2008).
12. Faas et al., J Struct Biol. 181, 283 (2013).
13. Gaietta et al., Science, 296, 503 (2002).
14. Kobayashi et al., Autophagy. 6, 36 (2010).
15. Kobayashi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 112, 7027 (2015).