

Contents

第1部 入門編

1-1 電子顕微鏡入門 —電顕を使ったことがない人のために	11
藤本豊士・山本章嗣	
Ⅰ. 電顕で見ることの意味	11
Ⅱ. 電顕でものが見える原理について	11
Ⅲ. 自分の実験試料を包埋する方法	13
Ⅳ. 包埋試料を電顕観察するまで	15
Ⅴ. 電顕で何をどう見るか	16
1-2 電顕に期待するもの①	17
宮田真人	
Ⅰ. マイコプラズマ滑走運動	17
Ⅱ. レアな研究手法, “電顕”	17
Ⅲ. 日常的な疑問	18
電顕に期待するもの② 電子顕微鏡画像に動きを与えるイメージング法	20
原口徳子・平岡 泰	
Ⅰ. ライブイメージングとの融合	20
Ⅱ. 生物システムの理解	21
電顕に期待するもの③	23
斎藤通紀	
Ⅰ. 形態学的分子生物学との出会い	23
Ⅱ. 単一細胞レベルの解像度を目指した分子生物学へ	23
電顕に期待するもの④	26
永井健治	
Ⅰ. 今後の生物学においてますます必要な情報は?	26
Ⅱ. 電子顕微鏡像から分子の動的機能を理解するには?	26

第2部 実用編

2-1 超微形態をみる① ノックアウトマウスの解析	31
内山安男	
Ⅰ. 細胞内タンパク質分解とリソソーム	31
1. リソソームとは	31
2. リソソームのプロテアーゼ	32
Ⅱ. リソソーム蓄積症	33
1. リソソーム蓄積症とは	33
2. リソソームプロテアーゼ欠損とその蓄積症	34
3. オートファジーの破綻による封入体の形成	36
2-2 超微形態をみる② 急速凍結置換固定法による酵母の解析	38
馬場美鈴	
Ⅰ. 酵母細胞と試料作製技術	38
Ⅱ. 酵母細胞の急速凍結置換固定法	39
Ⅲ. 急速凍結置換固定法により得られた酵母細胞の電子顕微鏡像	39
Ⅳ. 液胞への選択的タンパク質輸送経路	40
Ⅴ. cvt経路の特異性	42
2-3 分子局在を見る① 誰でもできる免疫電子顕微鏡法	44
山本章嗣	
Ⅰ. 免疫電顕法のいろいろ	44
Ⅱ. さて、どの免疫電顕法を選ぶか?	45
1. 培養細胞を光顕と対応づけて観察したい→包埋前標識法	45
2. すぐに結果を知りたい→2日でできる凍結超薄切片法	47
3. まとまって時間がとれないが良い方法は?→樹脂包埋法	48
4. 二重染色で同時に2つのタンパク質の局在を見たい →凍結超薄切片法か樹脂包埋法であれば容易である	48
5. 試験管内の反応を見てみたい→アガロース包埋法	48
Ⅲ. 定量によって広がる世界	48
1. ナノ空間のpHを測定する	48
2. 具体例：網膜色素上皮細胞のファゴソーム動態の解析	49
2-4 分子局在を見る② 凍結切断レプリカ標識法による膜タンパク質の定量的解析 ..	51
重本隆一	
Ⅰ. SDS-FRL法の原理	52
Ⅱ. グルタミン酸受容体の定量的解析	53

2-5 分子局在を見る③ 凍結レプリカ標識法による膜脂質の分布解析	57
藤田秋一・藤本豊士	
I. 膜脂質解析におけるSDS-FRL法の利点と問題点	57
II. 膜脂質分子の分布解析	59
1. K関数	59
2. 最近隣距離と分布密度	61
3. クラスタの大きさ	62
2-6 分子局在を見る④電子顕微鏡によるタンパク質複合体の観察法	64
片山栄作	
I. 電子顕微鏡による分子観察法の特長	64
II. 古典的な試料作製法	64
III. 急速凍結による試料作製法	65
IV. 急速凍結フリーズレプリカ法と新たな画像解析法	66
V. 機能中の細胞内タンパク質の構造解析を目指して	68
2-7 分子を見る 電子顕微鏡を用いて分子構造を見る	71
光岡 薫・藤吉好則	
I. 低温電子顕微鏡法	71
II. 電子線結晶構造解析	72
III. らせん再構成による立体構造解析	73
IV. 単粒子解析	74
2-8 三次元構造を見る① 電子線トモグラフィーとは何か —ナノスケールでの3Dバイオイメージング	77
唐原一郎・須田甚将・峰雪芳宣	
I. トモグラフィーとは何か	77
II. 電子線トモグラフィーとは何か	78
III. 急速凍結・凍結置換固定した包埋試料の電子線トモグラフィー	79
1. 凍結技法, 試料作製	80
2. 画像取得, トモグラム作製, 解析	80
2-9 三次元構造を見る② 急速凍結ディープエッチング法による細胞膜の ナノドメイン解析	83
諸根信弘・臼倉治郎	
I. 急速凍結法	83
1. ヘリウム冷却型メタルコンタクト法	83
2. 浸漬法	84
3. 加圧法	84
II. ディープエッチング法	84
III. 免疫レプリカ	86
IV. トモグラフィー	86

2-10 三次元構造を見る③ 超高压電子顕微鏡を用いた細胞構造の立体観察	89
鷹岡昭夫	
Ⅰ. 超高压電子顕微鏡の特徴	89
Ⅱ. トモグラフィーの原理と観察試料の厚さ	91
Ⅲ. トモグラフィーの手順とキーポイント	93
Ⅳ. 細胞組織の観察例	93
2-11 三次元構造を見る④ 見えなかったものを見る位相差電子顕微鏡	96
永山國昭	
Ⅰ. 光顕 vs 電顕	96
Ⅱ. 位相の画像化原理	97
1. 位相差法の原理	97
2. 顕微鏡の原理	98
Ⅲ. 位相差法のシミュレーション	99
Ⅳ. 無染色で“生”に迫るヒルベルト微分像	100
Ⅴ. 膜／タンパク質複合体構造を見るゼルニケ位相差法	101

第3部 応用編

3-1 シナプス終末の内膜系を3Dで見る	107
西野-林 美都子・山口明人	
Ⅰ. ダイナミン1KOマウスの特徴	107
Ⅱ. 電子線トモグラフィーによるダイナミン1KOシナプスの三次元構築	109
1. 電子線トモグラフィー	109
2. クラスリン被覆ピット	109
3. スピニュール様構造体	109
4. 小胞体, その他オルガネラの構造と局在	109
Ⅲ. シナプトジャニン1KOシナプスとの比較	109
3-2 光顕と電顕で同時に見る	114
小林昇平・原口徳子	
Ⅰ. Correlative light and electron microscopy (CLEM)の原理	114
Ⅱ. CLEMを実現するための様々な方法	115
1. 蛍光標識抗体および金コロイド標識抗体を併用する方法	115
2. 量子ドットを用いる方法	116
3. 酸素ラジカルによるDABの重合を利用する方法	117
4. <i>in vivo</i> immunogold labeling法	118
5. 生細胞蛍光イメージングとCLEMとの融合 (live CLEM法)	118

3-3 染色体の内部構造を見る	121
前島一博	
Ⅰ. 染色体の基本構造を電子顕微鏡で見る—ヌクレオソームと30nmクロマチン繊維—	121
Ⅱ. 染色体を壊して、電子顕微鏡で構造を見る—非ヒストンタンパク質の役割—	122
Ⅲ. 染色体の七変化?	123
Ⅳ. 古典的な(?)電子顕微鏡観察の例	126
Ⅴ. 生きている状態の細胞の染色体を電子顕微鏡で見るためには?	126
Ⅵ. 新しいモデル	128
Ⅶ. クライオ電子顕微鏡観察の泣き所	128
3-4 キネトコアの分子構築を見る	130
鈴木應志・深川竜郎	
Ⅰ. キネトコアを構成するタンパク質群	130
Ⅱ. キネトコアの微細構造	132
Ⅲ. キネトコアの電子顕微鏡観察法	132
Ⅳ. キネトコアの分子構築理解のための電子顕微鏡観察の利用	133
3-5 電子顕微鏡の紹介	136
① 日立ハイテクノロジーズ 中澤英子	136
② 日本電子 原野祐輔	138
③ 日本エフイー・アイ 青山一弘	140
索引	142