

4.材料と方法

細胞培養と siRNA トランスフェクション

ヒト子宮頸癌由来の細胞株 HeLa を 5%CO₂、37°Cの条件下で培養した。細胞が培養ディッシュ底面のおよそ 9 割まで増殖したところで培地を除き、PBS で洗浄後、トリプシン/EDTA により細胞を剥がし、培地で懸濁した。細胞懸濁液のおよそ 10~20%を新しい培養ディッシュに移し、培地を加え培養を継続（継代）した。

細胞への siRNA トランスフェクションは、RNAiMAX (Invitrogen) の製造元の指示にしたがい行った(1)。Giantin に対する以下の配列の siRNA は Qiagen (Valencia, CA) から購入した(4)。

siRNA1 : 5'- ACUUCAUGCGAAGGCCAAA-3'

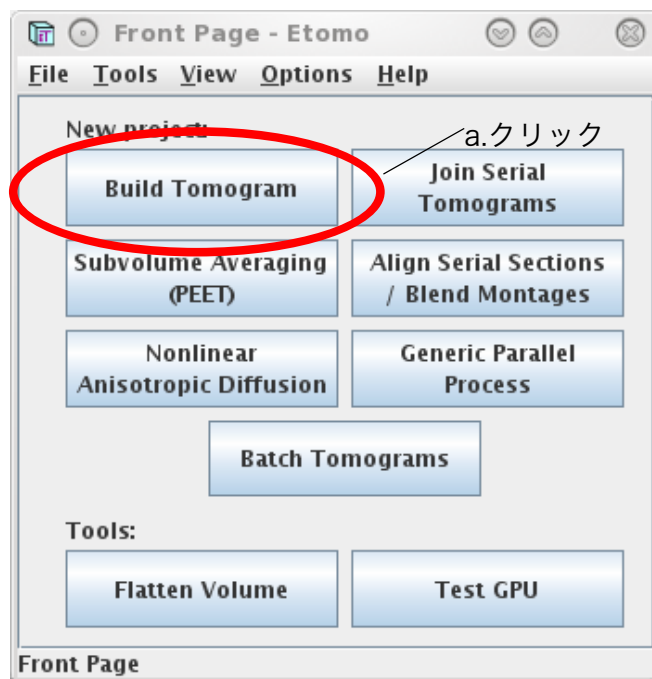
siRNA2 : 5'-CUGGAGUAGAAUUGAAAUCAAA -3'

透過型電子顕微鏡 JEM-2100(通称：JEOL 日本電子)を用いたゴルジスタックの傾斜像の取得

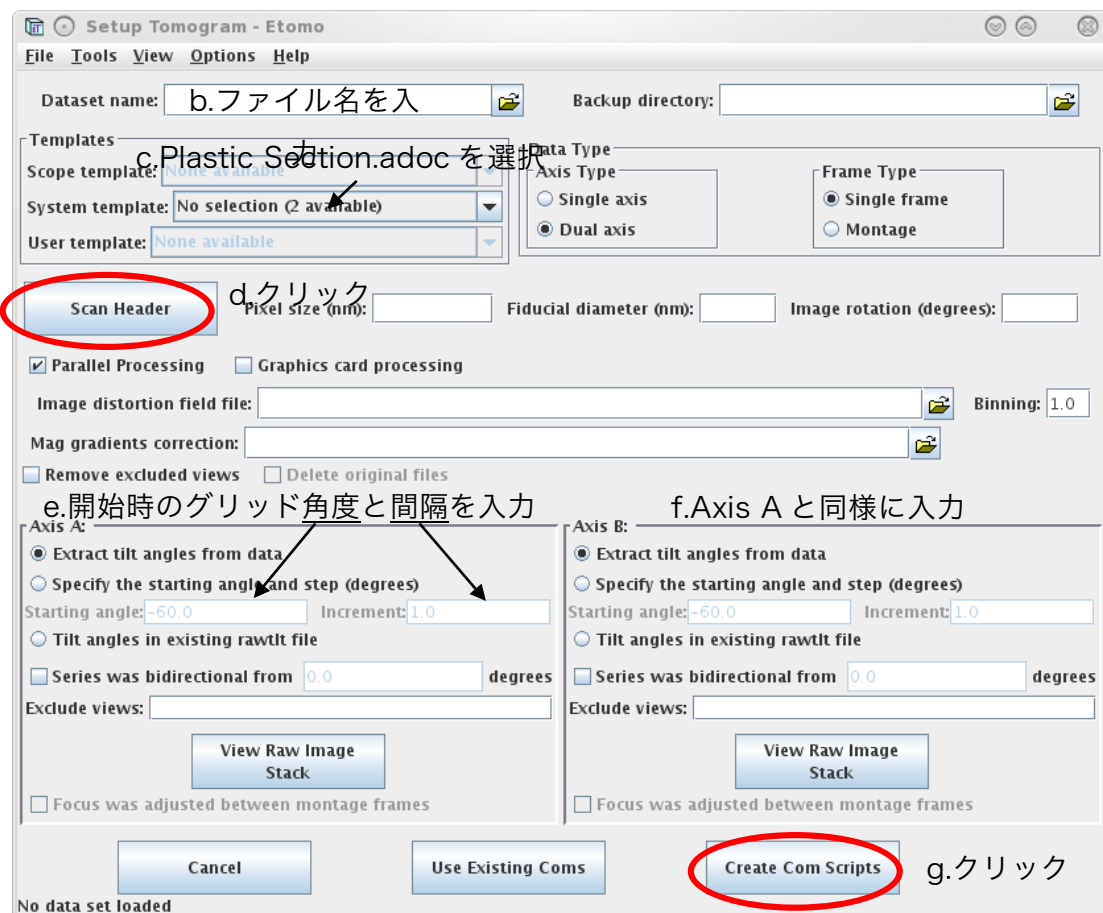
細胞をエポキシ樹脂に包埋した後、300nm の厚さに薄切した。薄切切片をフォルムバーム支持膜/カーボン蒸着処理した Finder グリッド(MAXTAFORM 社 TYPE H-6)に回収後、酢酸ウランと四酸化オスミウムの染色液を用いて重金属染色した。Finder グリッドの両面に Protein A に直径 15nm の金粒子を結合させた Protein A- Gold (Cytodiagnostics)を fiducial marker としてのせた。Finder グリッドをホルダーにのせ、JEM-2100 により加圧電圧 200kV/倍率 6000 倍 (pixel size 1.691nm)で 60° の傾斜角から-60° まで 1° 間隔で傾けながら、コントロール細胞と Giantin 欠失細胞のゴルジスタックの連続した傾斜像を取得した(16)。次に、Finder グリッドを 90° 回転させ、同じ条件下で 2 軸目の傾斜像をそれぞれ取得した。

トモグラムの構築

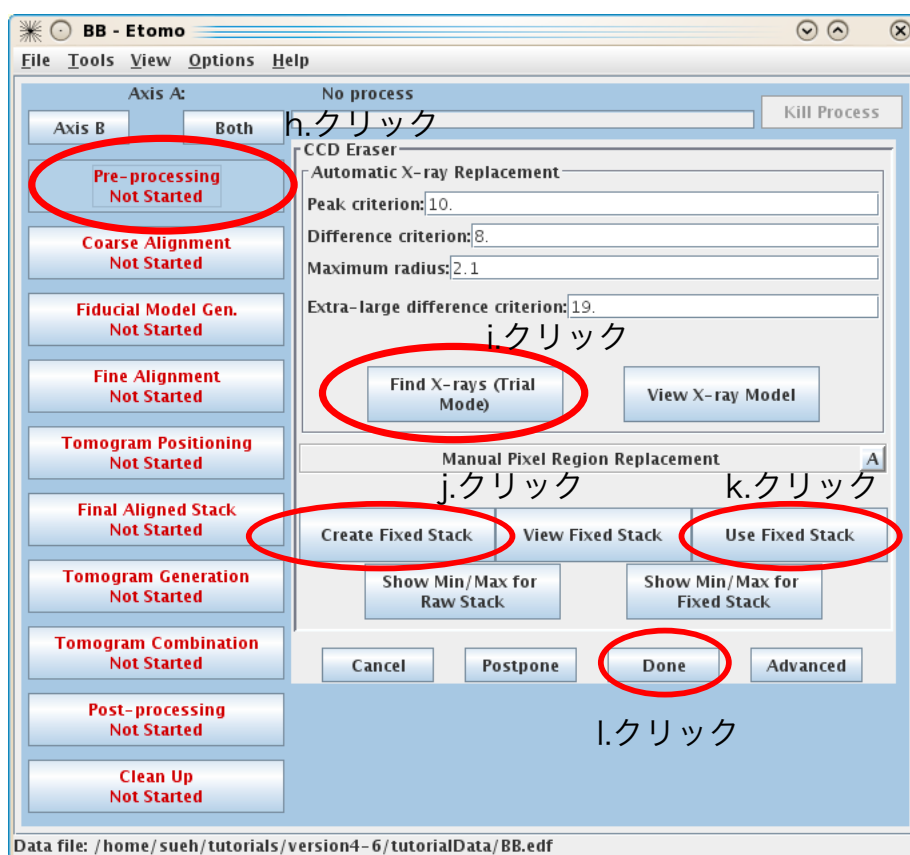
Etomo Tutorial for IMOD Version 4.9(17)に記載される指示にしたがい、トモグラムの構築を行った(14)。



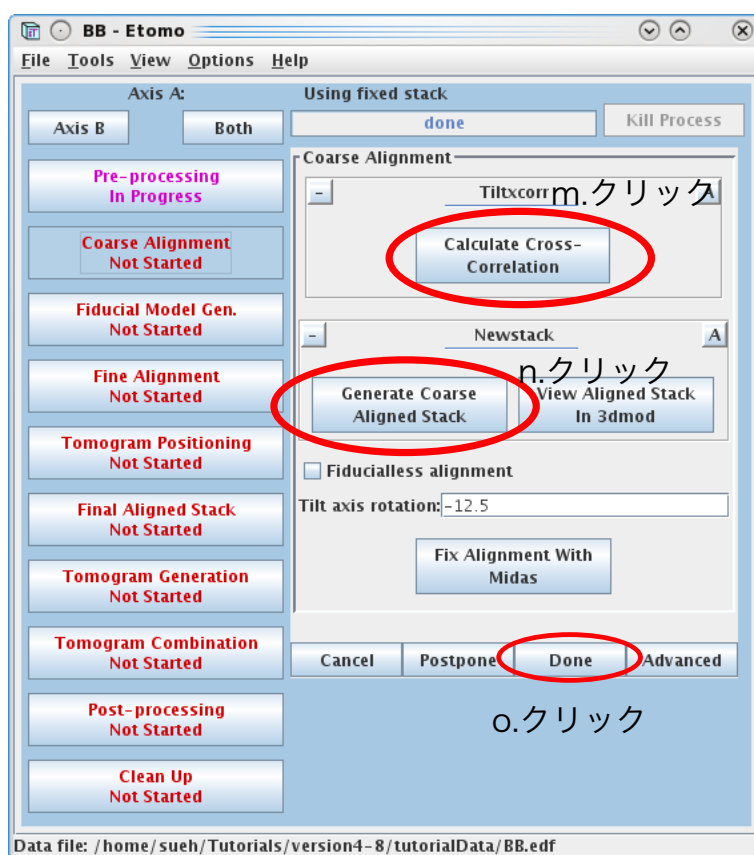
以下に、Imod によるトモグラム構築法の一般的な説明を記した。本研究では、本法に準じた方法でトモグラムの構築を行い、3次元モデル構築に使用した。ターミナルアプリでEtomoを起動し、フロントページパネル（上図）を表示する。トモグラムを構築する場合、Build Tomogram ボタンをクリックし、開始する(a)。



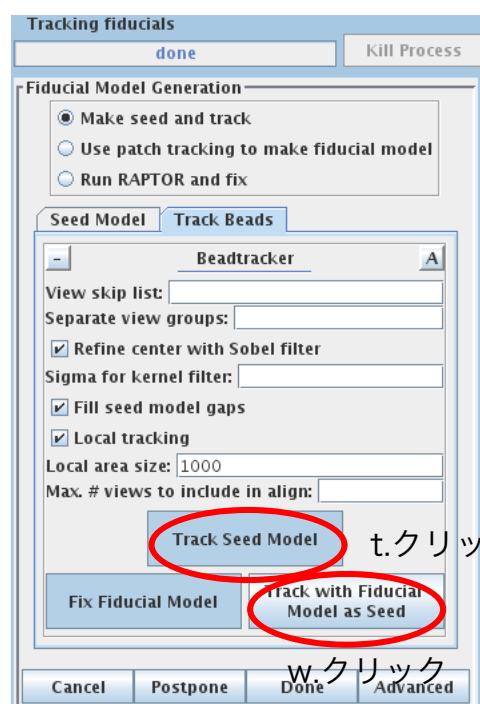
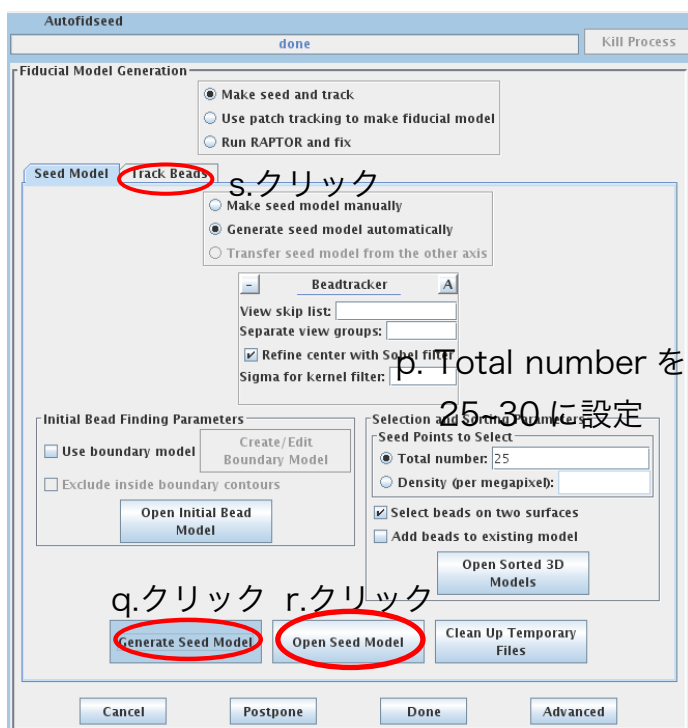
Build Tomogram ボタンを押し、Set up Tomogram パネルを表示する（上図）。取得した傾斜像のデータ名を Dataset name の欄に入力する(b)。テンプレートボックスの System templates は Plastic Section.adoc を選択する(c)。右の Data ボックスで Dual axis、Single frame を選択する。次に、Scan Header をクリックし、自動入力された Pixel size の数値が正しいか確認する(d)。今回、Fiducial diameter は 15nm に、Image rotation は-4.67 に設定する。Axis A 欄の Specify the starting angle and step (degrees)にチェックを入れる(e)。Starting angle の欄に開始時の角度の入力、Increment に傾斜角度の間隔の値を入力する。例えば、60° から-60° の場合は-1.0、-60° から 60° の場合は 1.0 と入力する。Axis B 欄も Axis A 欄と同様に入力する(f)。入力完了後、Create Com Scripts をクリックし、次の Main Window 画面へ進む(g)。



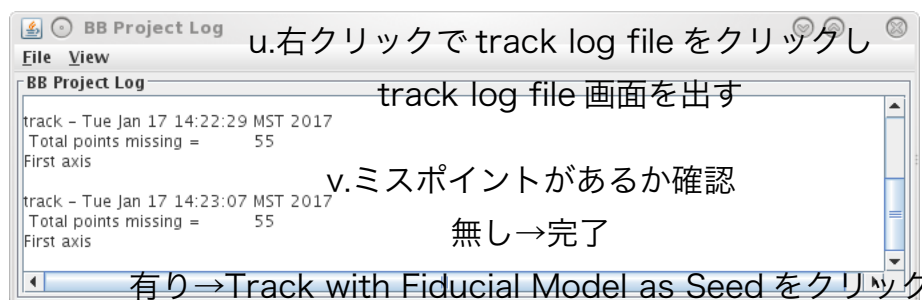
Main Window 画面の左側の欄にトモグラム構築の手順が表示される。上から順に進める。赤色は手順が開始していないことを示し、赤紫色は手順が現在進行中であること、緑色は手順の完了を示す。一番上の Axis B を押すと、2 軸目の Main Window 画面に切り替わる。最初に Pre-processing ボタンをクリックする(h)。次に Find X-rays(Trial Mode)をクリックし、傾斜像上の X-線を検知する(i)。操作完了後、No process の欄に done の文字が表示される。次に Create Fixed Stack をクリックし、X線を取り除いた傾斜像を作製する(j)。上記と同様に done の表示後、Use Fixed Stack をクリックし、X線を取り除いた傾斜像の使用を選択する(k)。最後に右下の Done をクリックし、次の Coarse Alignment の手順に進む(l)。



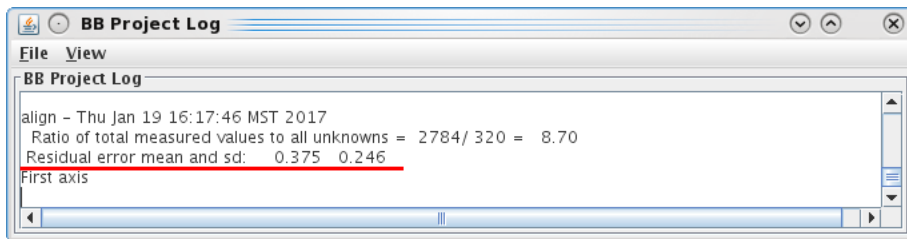
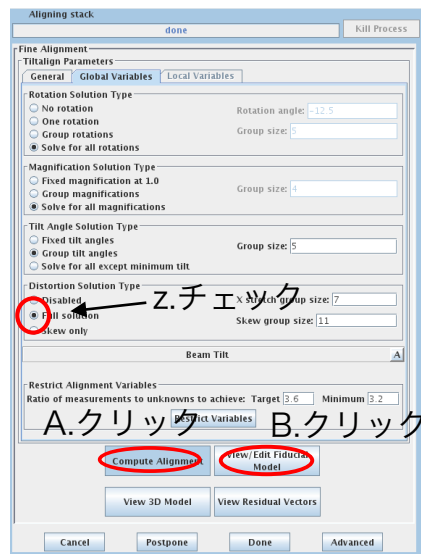
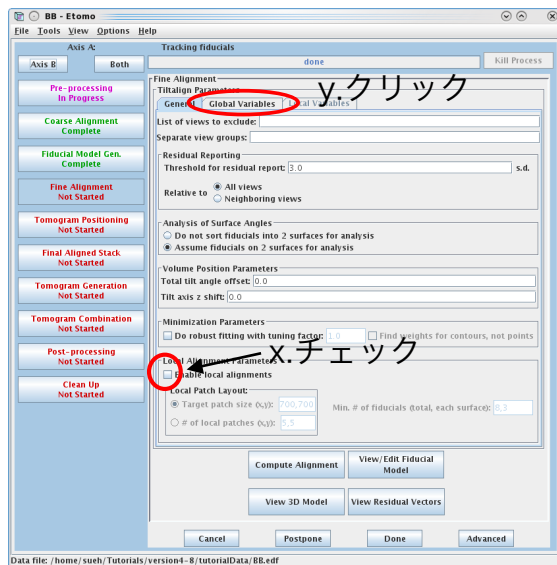
Coarse Alignment の手順では、最初に Calculate Cross-Correlation をクリックし、相関係数を用いて傾斜像間のアライメントを計算する(m)。次に Generate Coarse Aligned Stack をクリックし、計算したアライメントを適用した傾斜像を作製する(n)。作製完了後、Done をクリックし次の Fiducial Model Gen. の手順に進む(o)。



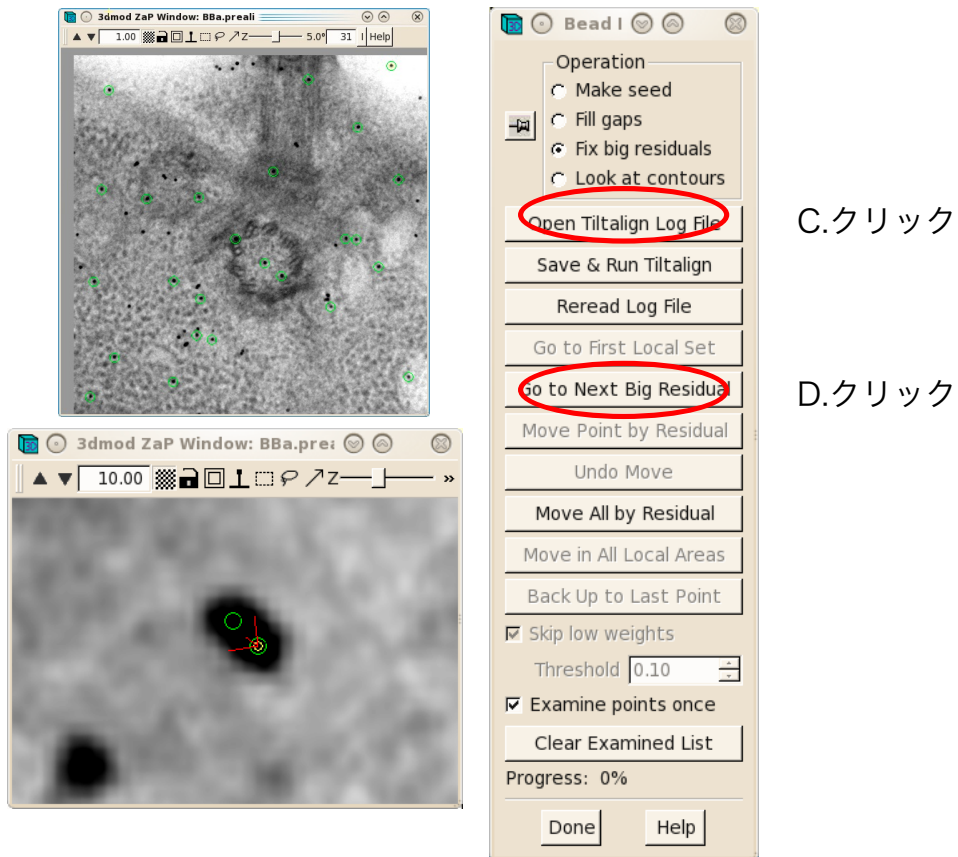
ミスポイントがなくなるまで
繰り返す



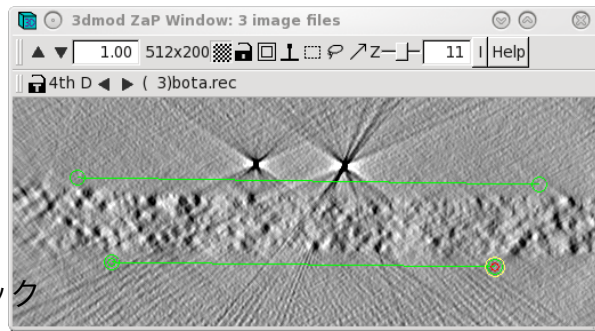
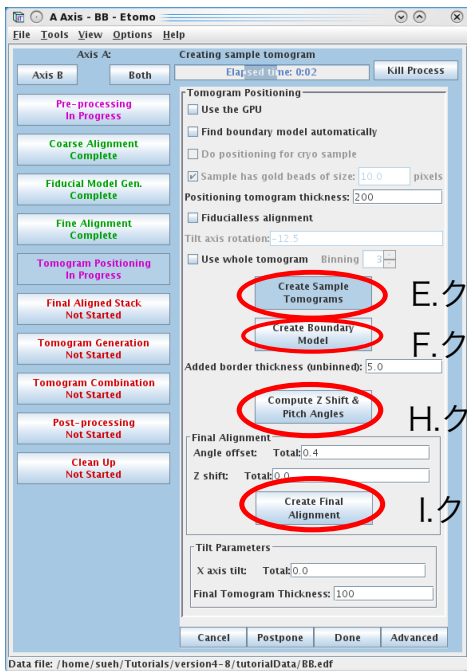
Fiducial Model Gen.の手順では fiducial marker を追跡して Fiducial モデルを作製する。最初に追跡する fiducial marker の数を Total number に入力する(p)。今回、追跡する fiducial marker の数は 25~30 の間で設定し、Select beads on two surfaces を選択する。次に Generate Seed Model をクリックし、Seed モデルを作製する(q)。Open Seed Model をクリックすることで、Seed モデル上のランダムに選択された fiducial marker を確認することができる(r)。この時、fiducial marker の自動選択にミスが無い確認をする。次に Track Beads をクリックし、右上図の画面に切り替える(s)。Track Seed Model をクリックし Fiducial モデルを作製する(t)。右クリックで track log file 画面を表示し、ミスがあるか確認する(u)。ミスが無い場合は Done をクリックし次の Fine Alignment へ進む(v)。ミスがある場合、Track with Fiducial Model as Seed をクリックし、再度 track log file 画面で確認をする(w)。この行程(u~w)をミスがなくなるまで繰り返す。



Fine Alignment の手順でアライメントの調整を行う。最初に Enable local alignment にチェックを入れる(x)。次に Global Variables をクリックし、右上図に切り替える(y)。Distortion Solution Type 欄の Full solution にチェックを入れ(z)、Compute Alignment をクリックする(A)。Compute Alignment 完了後、右クリックで Align Axis 画面を表示する。Residual error mean and sd が 0.2~0.5 の数値に収まるか確認をする。0.2~0.5 の値からはみ出た場合、View/Edit Fiducial Model をクリックし、Bead Fixer dialog box を表示、修正を行う(B)。



Bead Fixer dialog box の Open Tilt align Log File をクリックし、aligna.log を選択する (C)。選択すると Fiducial マーカーのズレ幅が矢印で表示されるので、Go to Next Big Residual をクリックし、一つずつズレ幅を修正する (D)。この作業を Residual error mean and sd が 0.2~0.5 の数値に収まるまで繰り返す (C~D)。Residual error mean and sd が 0.2~0.5 の数値に収まったのち、次の Tomogram Positioning の手順に進む。



E.クリック

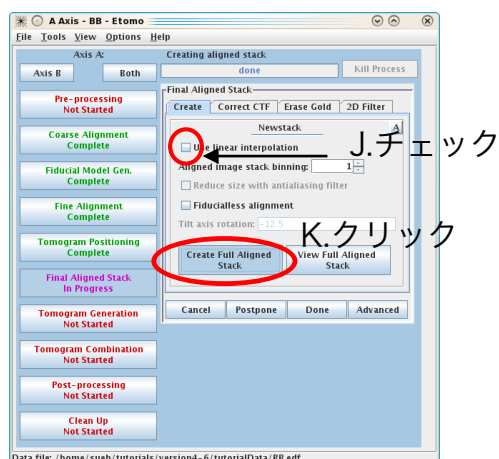
F.クリック

H.クリック

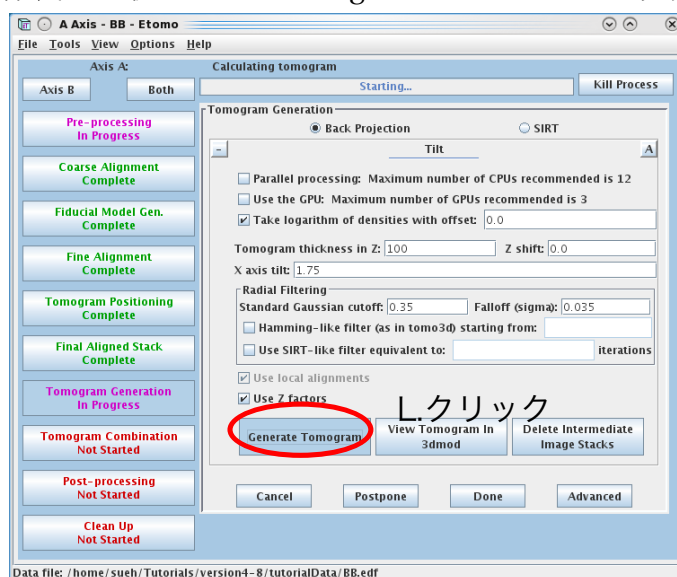
I.クリック

G.トモグラムの厚さを決定

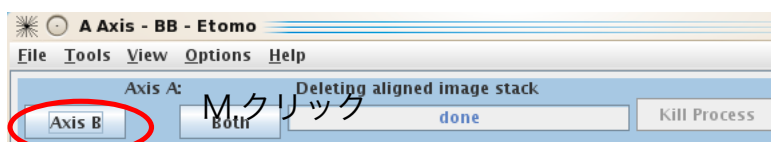
Tomogram Positioning の手順では、トモグラムの厚さを最小の体積に収まるよう設定する。最初に Create Sample Tomograms をクリックする(E)。このコマンドによりアライメントされた傾斜像の上部、中央部、下部それぞれ 3 つのトモグラムを作成する。次に Create Boundary Model をクリックし、上述で作製したトモグラムを表示する(F)。トモグラムが表示されない場合、Positioning tomogram thickness の数値を 300、400 と上げる。上部、中央部、下部のトモグラムそれぞれに右上図のように 2 本の線を引き、表示されたトモグラムの厚さを設定する(G)。2 本の線を引く時、実際のトモグラムの厚さより数ミリ余裕を持たせて引く。次に Computer Z shift & Pitch Angle をクリックする(H)。最後に Create Final Alignment をクリックし、次の Final Alignment Stack の手順に進む(I)。



Use linear interpolation にチェックを入れる(J)。次に Create Full Aligned Stack をクリックし、最終的にアライメントを行った傾斜像のフルサイズでの画像を作製する(K)。作製完了後、次の Tomogram Generation の手順に進む。



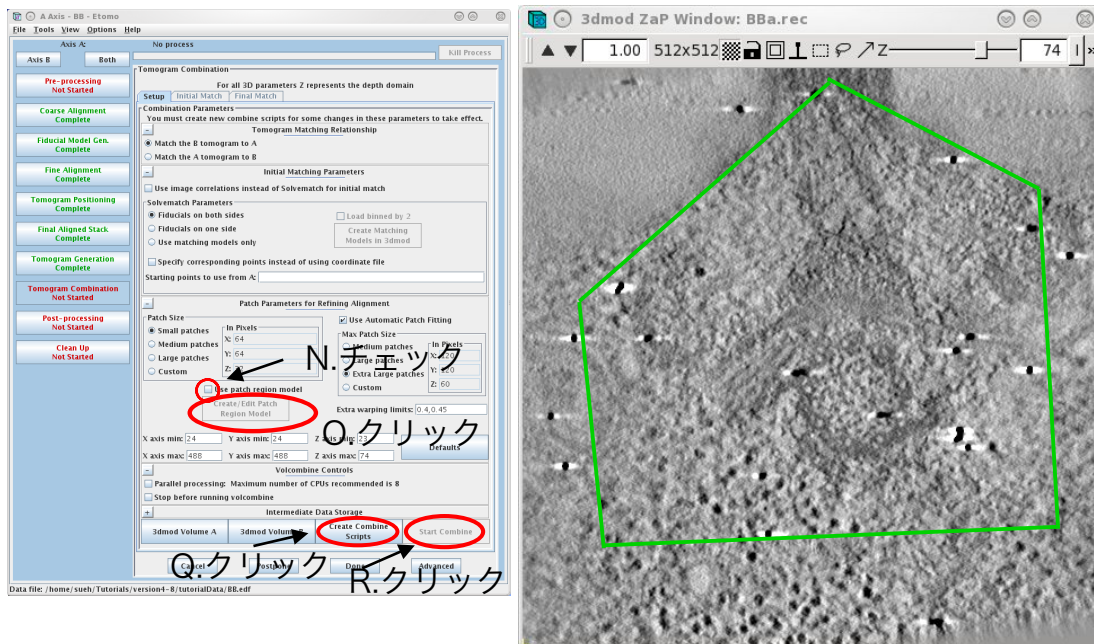
Tomogram Generation の手順では、Generate Tomogram をクリックし、最終的な 1 軸におけるトモグラムを作製する(L)。



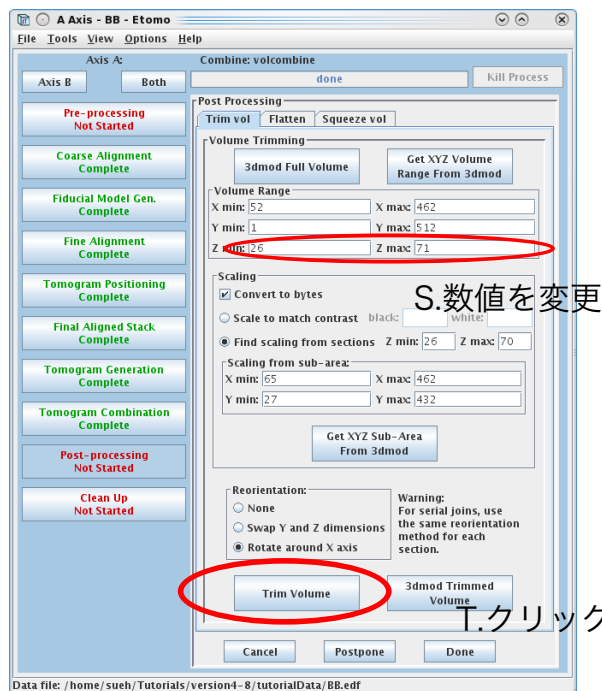
作製完了後、2 軸目のトモグラムの作製に移行する。1 軸目で行ったトモグラム作製と同じ手順でトモグラムの作製を進める(M)。

2 軸目のトモグラム作製完了後、再び 1 軸目の手順に戻り、Tomogram Combination の手順に進む。

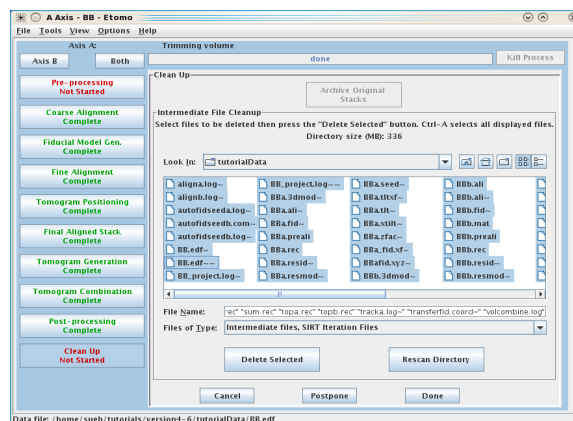
P.はっきり見える範囲を選択



Use patch region model にチェックを入れ(A)、Create/Edit Patch Region Model をクリックし、簡易的に2軸を組み合わせたトモグラムを表示する(O)。画像が不明瞭な部分を除去するため、画像の明瞭な部分を線で囲む(P)。囲み完了後、Create Combine Script をクリック(Q)、次に Start Combine をクリックし、2軸のトモグラムの組み合わせを開始する(R)。トモグラムの組み合わせが上手く行われない場合、線で囲んだ範囲に不明瞭な部分があるか見直しを行う。トモグラムの組み合わせ完了後、Post-processing の手順に進む。



Post-processing の手順では、先程の手順で緑の線に囲んだ範囲以外のトリミング作業を行う。Volume Range の Z の数値を緑の線に囲んだ範囲に変更する(S)。次に Trim Volume をクリックし、トリミングを完了する(T)。完了後、Clean Up の手順へ進む。

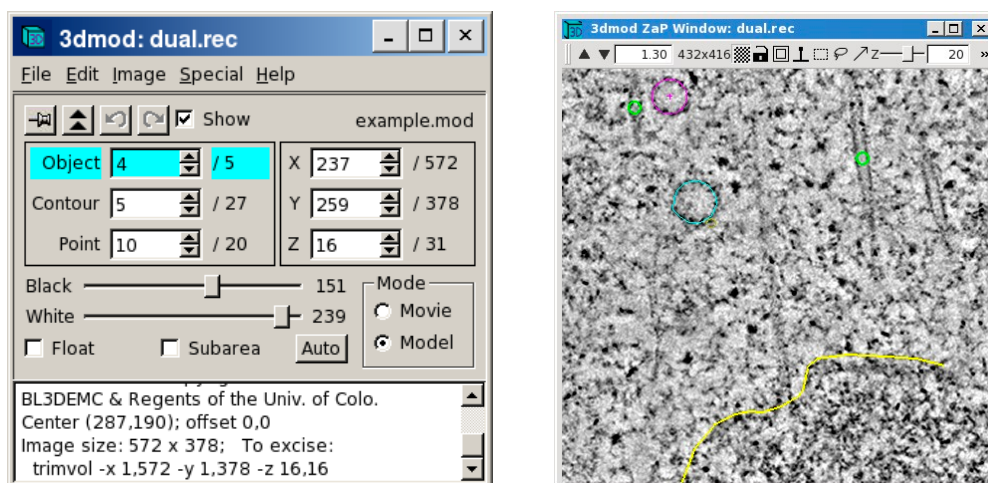


Clean Up の手順では、コンピューターの処理速度を保つため、今まで作製した不必要な中間ファイルデータの消去を行う。Ctrl キー+A ボタンで中間データを全選択、その後、Delete Selected をクリックし、中間データを消去する。Clean Up の手順後、トモグラムの構築が完了する。

2軸方向のトモグラムからのゴルジスタックの3次元モデル構築

以下に、3dmodによる3次元モデル構築法の一般的な説明を記した。本研究では、本法に準じた方法で3次元モデル構築を行い、構造解析に使用した。

アプリケーションのターミナル画面において、「3Dmod. トモグラムファイル名」を入力し、3次元モデルの構築を開始する(15)。



開始時に、3dmodのコントロール画面(左図)とモデル画面(Zap、右図)が表示される。最初にコントロール画面上のMode欄のModelを選択し、またAutoボタンでZap画面の明るさを調整する。Zap画面において、ゴルジスタックの輪郭抽出を行う。左クリックで開始点となる黄色の十字マークを置き、マウスのセンターボタンを押しながら、ゴルジスタックの輪郭をなぞる。ゴルジ小胞を輪郭抽出する場合、EditタブのObject欄のNewを選択し、Object TypeをClosedからOpenに変更する。そしてSphereの大きさを設定する。今回は13ptに設定した。ゴルジスタックの輪郭抽出と同様に、左クリックで開始点を設定し、センターボタンをクリックする。この方法で小胞の場所に球体を置き、小胞の輪郭抽出を行う。キーパッドのVキーを押し、輪郭抽出したゴルジスタックの3D Viewを表示する。全てのゴルジスタックの輪郭抽出完了後、3D View画面上のEditタブ、Objectの欄を選択し、輪郭抽出したゴルジスタックにMeshingをかけ、3Dモデルの作製を完了する。作製した3Dモデルの画像ファイルはキーパッドのSキーを押し、保存する。ターミナル画面において、「imodinfo -F 3Dモデル画像ファイル名」を入力することで、作製したゴルジスタック3Dモデルの体積と表面積を計算、表示することができる。

Image sequence 書き出し方

- 1.3dmod を開く
- 2.3dmod ウィンドウの Mode を Movie にする。
3. 3dmod ウィンドウの File→Movie/Montage から 3dmodv Movies ウィンドウを開く
4. start, end, increment を設定する。Snapshot は JPEG がおすすめ
5. 3dmod Model View ウィンドウの File→Movie/Montage から 3dmodv Movie ウィンドウをひらく
6. 3dmodv Movie ウィンドウ左下 Write files にチェックを入れる
7. 3dmod Zap Window の画面上にマウスを移動させ、中応ボタンをクリックにて image sequences を書き出す。
- 8.書き出した File を一つにまとめる
- 9.Image J を立ち上げ、File の Import を選択し Image sequence で先ほどまとめたファイルを選択する。
- 10.File から save を選択し、TIF で保存する。

No hole model について

No hole モデルのファイルは RNAi1-B18 と Mock-A8 は C1~C4 まで作製。
Mock-B8、Mock-B0、Mock-B1、RNAi1-B3、RNAi1-B13、RNAi1-B0 は C2,C3 の作製。C1 と C4 を作製する場合は fullmod と名前がついた mod ファイルで行う。

8.参考文献

- (1) Manuel Martinez *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 280(2005)
- (2) Michael A. Demetriou *et al.*, *Journal of Cell Biology*130(1995)
- (3) Yi Xiang *et al.*, *Nature Communications* 4(2013)
- (4) Mayuko Koreishi *et al.*, *PLOS ONE* 8(2013)
- (5) <https://bio3d.colorado.edu/imod/doc/3dmodguide.html>
- (6) Mark S. Ladinsky *et al.*, *Journal of Cell Biology*144(1999)
- (7) Riccardo Rizzo *et al.*, *Journal of Cell Biology*201(2013)
- (8) Tommy Nilsson *et al.*, *FEBS Letters*330(1993)
- (9) Mark S. Bretscher *et al.*, *Science*261(1993)
- (10) C. Rabouille *et al.*, *Journal of Cell Science*108(1995)
- (11) Alexandra Gambaryan *et al.*, *Virology*344(2006)
- (12) Peter D. Kwong *et al.*, *Nature*393(1998)
- (13) L C Lopez *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*6(1989)
- (14) David N. Mastronarde *Journal of Structural Biology* 120(1997)
- (15) James R. Kremer *et al.*, *Journal of Structural Biology* 116(1996)
- (16) Mitsuko Hayashi-Nishino *et al.*, *Nature Cell Biology* 11(2009)
- (17) <https://bio3d.colorado.edu/imod/doc/etomoTutorial.html>
- (18) Nicola L. Stevenson *et al.*, *Journal of Cell Science*130(2017)
- (19) Armen Petrosyan *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*287(2012)
- (20) Therese H. Ward *et al.*, *Journal of Cell Biology*155(2001)
- (21) Benjamin D. Engel *et al.*, *PNAS*112(2015)