

## 膨張顕微鏡法と蛍光増幅抗体 (Amplibody) を用いた 一次繊毛の超解像イメージング

加藤 洋平<sup>1</sup>, 千葉 秀平<sup>2</sup>, 中山 和久<sup>1</sup>

### 1. はじめに

一次繊毛は細胞表面から突出したアンテナ様のオルガネラであり、直径は0.2~0.3 $\mu\text{m}$ で長さは数 $\mu\text{m}$ と非常に小さい<sup>1)</sup>。そのため、通常の蛍光顕微鏡を使って観察しても、繊毛や繊毛基部にある基底小体(中心小体に変化した構造)はただの線や点にしかみえない(図2A参照)。したがって、繊毛の微細構造の観察には従来は主に電子顕微鏡が用いられてきた<sup>2)</sup>。近年では、光の回折限界以下の構造を可視化できるさまざまなタイプの超解像顕微鏡が開発されて、繊毛の研究にも応用されている<sup>3-6)</sup>。ただし、市販の超解像顕微鏡は数千万円以上する高額機器であるため、大学等ではほとんどの場合に共通機器として運用されている。しかし、利用できる超解像顕微鏡が近くにはない研究者もいるであろう。筆者らも、数年前までは超解像顕微鏡を利用できずに不満を抱えていたことから、いくつかの市販試薬を用いるだけで超解像観察ができる膨張顕微鏡法を知ってすぐに飛びついた。

### 2. 膨張顕微鏡法

膨張顕微鏡法(expansion microscopy: ExM)は、2015年

にMITのEdward Boydenらによって発明された画期的な超解像顕微鏡技術である<sup>7)</sup>。この技術では、顕微鏡が特別なのではなく、観察する試料の方に秘密がある。そのコンセプトは、「小さすぎて見分けがつかないのならば、試料自体を大きくすればよい」という逆転の発想に基づいている。実際の膨張顕微鏡法では、分解能を向上させるために高吸水性ゲルによって試料を約4倍に膨張させる(図1A)。ただし、オリジナルの膨張顕微鏡法では特殊なブローブが必要であったために、一般研究者にとってのハードルは高かった。しかし、約1年後にBoydenらは市販の蛍光標識抗体と蛍光タンパク質を用いることのできる改良型の膨張顕微鏡法(protein-retention expansion microscopy: ProExM)を開発した<sup>8,9)</sup>。この膨張顕微鏡法は五つのステップからなる(図1A)。<sup>①</sup>一般的な手法によって抗体染色を行う。<sup>②</sup>タンパク質や抗体の一級アミンを架橋剤(AcX)によってacryloyl化し、<sup>③</sup>アクリル酸ナトリウムとともにアクリルアミドゲル中で共重合させる。<sup>④</sup>Proteinase Kによってタンパク質を部分的に分解する。<sup>⑤</sup>アクリル酸ナトリウムのポリマーは高吸水性であり、カルボキシ基どうしの静電的反発と浸透圧の発生によってゲルが膨張する。第二世代の膨張顕微鏡法は誰でも購入可能な試薬と一般的な生物系研究室にある道具だけで実施できることから、培養細胞だけでなく脳の組織切片などさまざまな生物試料の観察への適用例が報告されている<sup>10)</sup>。

### 3. Amplibodyの開発

BoydenらのProExMプロトコールに従って膨張顕微鏡法を試してみると、それまではただの点にしかみえなかった中心体タンパク質が、視力検査に使うランドルト環のようなリングにみえて本当に驚いた(図2B)。他の超解像顕微鏡では微細構造の超解像画像をコンピュータのモニタ上でしかみることができないのに対して、膨張顕微鏡法では通常の顕微鏡をのぞくと微細構造を肉眼で確認できるのである。しかし、試料を顕微鏡で観察していると、すぐにある問題に気づいた。すなわち、試料中の蛍光が非常に弱いのである。ゲルはXYZ方向にそれぞれ4倍に膨張するので、

<sup>1</sup> 京都大学大学院薬学研究科生体情報制御学分野 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町46-29)

<sup>2</sup> 東北大学大学院生命科学研究所分子細胞生物分野 (〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-3)

**Superresolution imaging of primary cilia by expansion microscopy using an amplibody for fluorescence signal amplification**

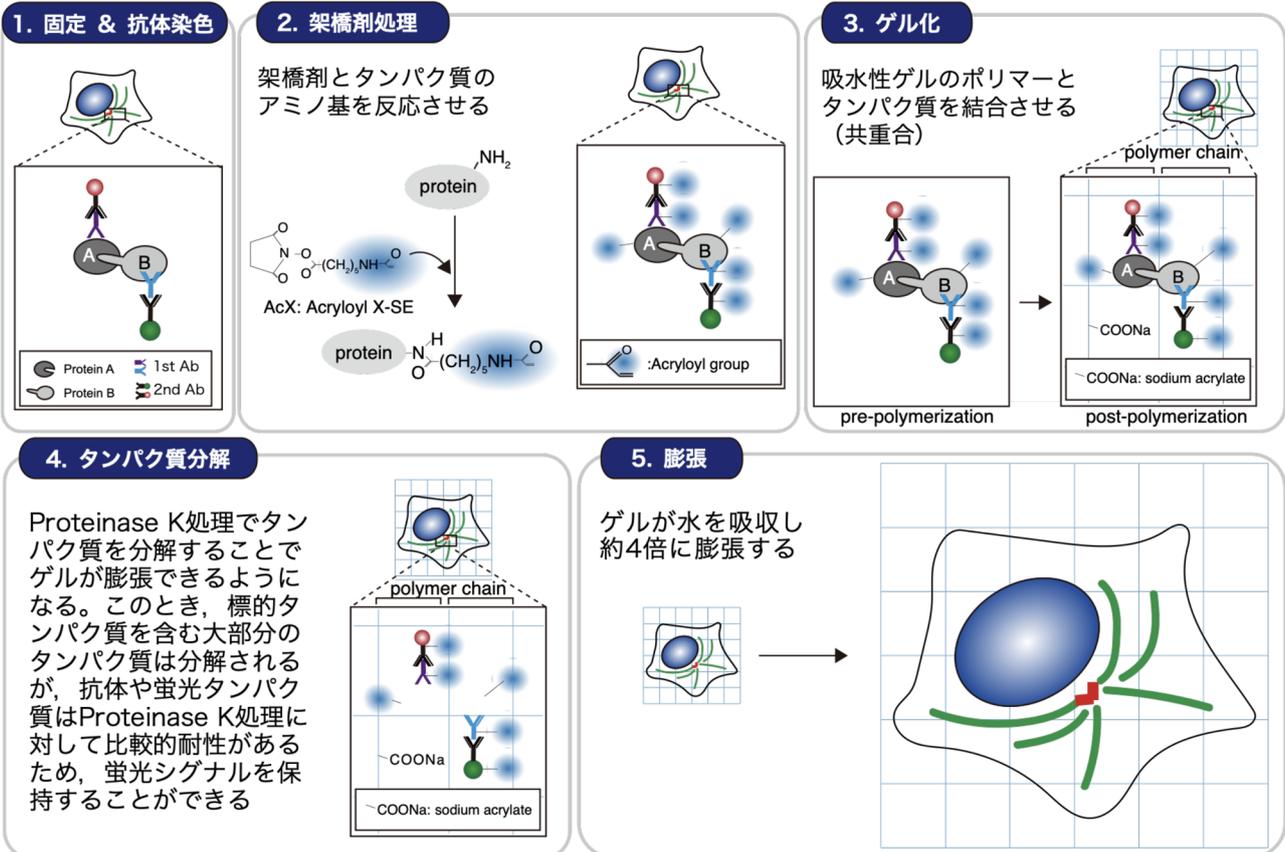
Yohei Katoh<sup>1</sup>, Shuhei Chiba<sup>2</sup> and Kazuhisa Nakayama<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Physiological Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida-Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan, <sup>2</sup>Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Department of Biomolecular Sciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan)

本論文の図版はモノクロ(冊子版)およびカラー(電子版)で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940616

© 2022 公益社団法人日本生化学会

## A. 膨張顕微鏡法



## B. Amplibody



## C. Amplibodyによる蛍光の増幅

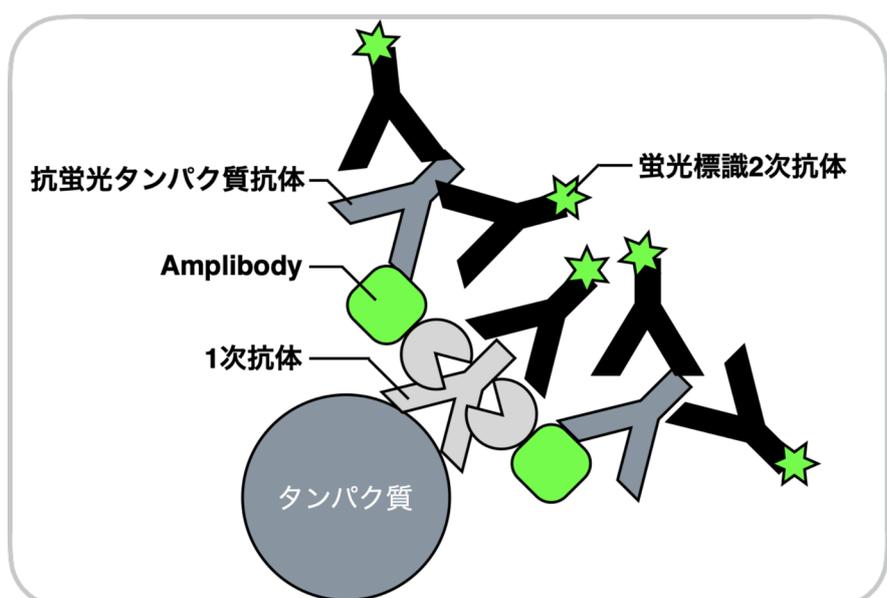


図1 膨張顕微鏡法とAmplibodyによる蛍光増幅の原理

(A) 膨張顕微鏡法の原理. ①固定と抗体染色, ②架橋剤処理, ③ゲル化, ④タンパク質分解, ⑤膨張の五つのステップからなる. (B) Amplibodyの模式図. (C) Amplibodyによる蛍光の増幅の作用原理.

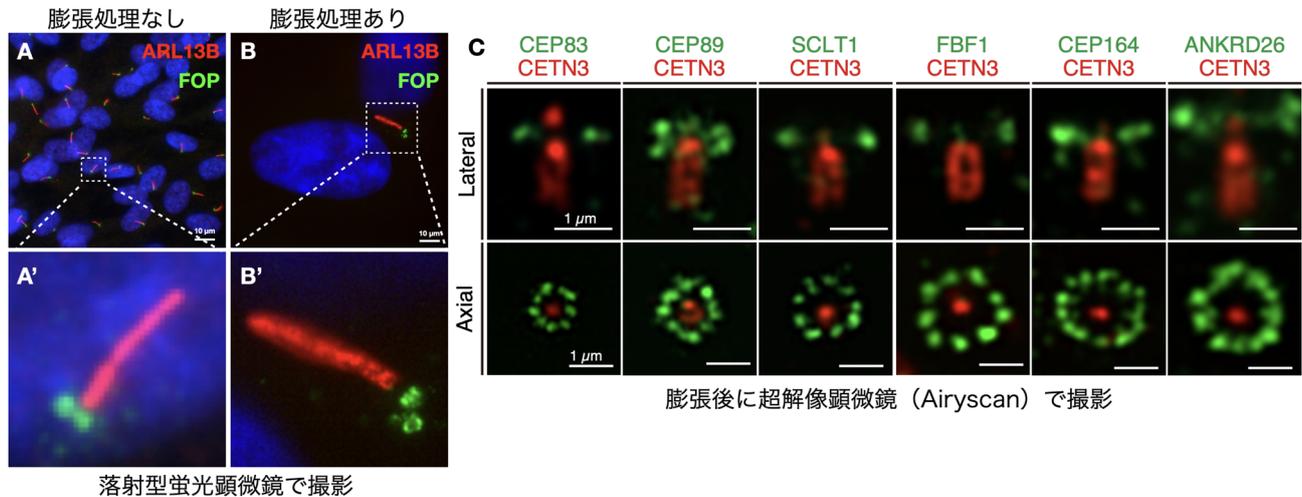


図2 膨張顕微鏡法を用いた一次繊毛と基底小体タンパク質の超解像観察例  
(A, B) hTERT-RPE1細胞をARL13B (繊毛マーカー) とFOP (中心小体マーカー) の抗体で染色した画像。(A) 膨張処理を行っていない細胞の画像。(A') Aの破線領域の拡大図。(B) 膨張処理を行った細胞の画像。(B') Bの破線領域の拡大図。(C) 基底小体に局在するさまざまなタンパク質に対する抗体で免疫染色し、膨張顕微鏡法を適用後に超解像顕微鏡 (Airyscan) を用いて撮影した画像 (縦方向と横方向から撮影)。(Katoh *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 2020<sup>13</sup>)より一部改変)。

単位体積あたりの蛍光強度は $1/4^3$  (1/64) に低下する。また、プロテアーゼ処理による蛍光標識抗体の分解・変性によっても蛍光強度が半減し、明るさはもとの1/100以下になってしまう。さらに、試料は退色防止剤を含まない水につかっている状態なので、励起光によって発生する活性酸素種が色素の退色を引き起こす。したがって、かなり明るく染色されていなければ、膨張後の染色試料が発する蛍光は弱くて観察がしづらいか、ほとんどみえない。

膨張顕微鏡法をより実用的なものにするためには、染色試料が発する蛍光をもっと強める必要があると感じた。この問題の解決のために、筆者らが以前に独自開発していたタンパク質間相互作用解析法 [visible immunoprecipitation (VIP) assay]<sup>11)</sup> の際に用いる Nanobody というラクダ科動物由来の単鎖抗体を利用することはできないかと考えた。Nanobody は通常の抗体の1/10のサイズ (約15 kDa) であり、大腸菌で発現させて容易に精製することができる。さらに、他のタンパク質を融合させることによって、新たな機能を持った Nanobody を作製することもできる。筆者らは、蛍光強度を増大させる目的で、マウスまたはウサギの抗体に結合する Nanobody<sup>12)</sup> に蛍光タンパク質 (mClover3 または mCherry) を融合させた発現プラスミドを作製した。この融合タンパク質を、蛍光を増幅 (amplify) する抗体 (antibody) という意味で Amplibody と名づけた (図1B)<sup>13)</sup>。

Amplibody の使い方はシンプルである。まず、1次抗体と Amplibody を混ぜて、通常の方法で試料を処理する。次に、蛍光タンパク質を認識する市販の抗体 (筆者らは

MBL社の抗体を主に利用している) を Amplibody に結合させる。最後に蛍光標識された2次抗体を結合させれば、通常よりも多くの蛍光分子 (蛍光タンパク質と蛍光標識抗体) が標的分子に結合するので、標的分子の存在部位が明るくみえる仕組みである (図1C)。膨張後の試料の蛍光強度が Amplibody を使うと2.5~3倍になり<sup>13)</sup>、蛍光シグナルを実用的なレベルにまで増幅することができた。ただし、Amplibody を使うことでバックグラウンドも上がる場合があるので、抗体と Amplibody の濃度 (希釈率) は抗体ごとに最適化する必要がある。

Amplibody の作製も難しくはない。グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) タグ付きの Amplibody のプラスミドを導入した大腸菌にイソプロピルチオオガラクトシド (IPTG) を加えて GST 融合タンパク質の発現を誘導して、20°C で一晩培養する。次に細胞を破碎して、グルタチオンセファロースビーズを用いて GST-Amplibody を精製する。最後に PreScission プロテアーゼで処理して GST タグを切除し、ビーズを遠沈することによって Amplibody を含む上清を回収できる。Amplibody を発現する大腸菌は肉眼でもわかるほど発色しているので、発現や精製は比較的やりやすい。筆者らが作製した Amplibody の発現プラスミド (ID #138128~138133) は addgene に寄託してあるので、興味を持たれた方は取り寄せて利用していただきたい。

#### 4. Amplibody を用いた膨張顕微鏡法のプロトコール

ここからは筆者らが用いている膨張顕微鏡法 (ProExM)

## A. モノマー溶液の組成

|                                       | ストック溶液濃度      | 容量 (mL) |
|---------------------------------------|---------------|---------|
| Sodium acrylate                       | 38 g/100 mL   | 2.25    |
| Acrylamide                            | 50 g/100 mL   | 0.5     |
| <i>N, N'</i> -Methylene bisacrylamide | 2 g /100 mL   | 0.75    |
| NaCl                                  | 29.2 g/100 mL | 4       |
| PBS                                   | 10倍濃度         | 1       |
| H <sub>2</sub> O                      |               | 0.9     |
| 合計                                    |               | 9.4     |

## B. ゲル溶液の組成

|                  | 容量 (μL) |
|------------------|---------|
| モノマー溶液           | 470     |
| H <sub>2</sub> O | 19      |
| TEMED            | 1       |
| 10% APS          | 10      |
| 合計               | 500     |

## C. ゲルの作製から膨張までの作業工程

① スライドガラスにパラフィルムを巻き、ゲル溶液 (15 μL) を乗せる。

② 9 mmのカバーリップを細胞が附着している面を下にして乗せる。

③ スライドガラスを37°Cのインキュベーターに入れて20分静置しゲル化させる。

ピンセットを使って、カバーリップとともにゲルを剥がす。

④ ガラスボトム6ウェルプレートにカバーリップとゲルを移動させる。

Digestion buffer (1 mL) を加え、37°Cのインキュベーター内で30~60分静置する。

⑤ Digestion buffer中でゲルが少し膨らみ、カバーリップから剥がれる。自然に剥がれない場合は、プレートを揺すったり軽くたたいたりしてゲルを剥がす。ゲルが剥がれたカバーリップは取り出しておく。

⑥ Digestion bufferをピペットなどで取り除き、ゲルをPBSで洗浄する。PBS中ではゲルが約2倍に膨らむ。

蛍光抗体で染色する場合はゲルに抗体希釈液を加えてシーソー型のシェイカーを使いゆっくりと振とうする。洗浄のときも同様。

⑦ Hoechst入りのmilliQ水を入れて静置し、20~30分ごとに水を交換する。水を4~5回交換するとゲルが約4倍に膨張してウェルとほぼ同じサイズになる。(9 mm x 4 = 36 mm)

最後に水を取り除き、溶かしたアガロースを加えて冷やし固める。固まったら水を少量加えて乾燥を防ぐ。

図3 膨張顕微鏡法に利用する高吸水性ゲルの組成と作製方法

(A)モノマー溶液の組成、(B)ゲル溶液の組成、(C)ゲルの作製から膨張までの作業工程。作業中のゲルの写真および作業内容を示す。

と Amplibody を組み合わせたプロトコールをステップバイステップで説明し、これまでの経験から得られたコツや注意点などを合わせて述べる。

## 1) 材料と試薬

一般的な免疫染色に用いる材料や試薬の他には、以下のものが必要である。

## テクニカルノート

- ・直径9mmのカバースリップ (松浪硝子工業, #CS01029), 6ウェルガラスボトムプレート (Cellvis, P06-1.5H-N), モイストチャンバー (角型ディッシュに水を染み込ませたろ紙を敷き, その上にパラフィルムを敷いたもの), 精密ピンセット, 絵筆 (ゲルを移動させるときに使う).
  - ・アクリル酸ナトリウム (sodium acrylate; Sigma-Aldrich, #408220), アクリルアミド (acrylamide; ナカライテスク, #00809-85), *N,N'*-methylenebisacrylamide (ナカライテスク, #22402-02), ammonium persulfate (APS; ナカライテスク, #02627-34), *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED; ナカライテスク, #33401-72), 10×phosphate-buffered saline (PBS) (ナカライテスク, #11482-15). モノマー溶液とゲル溶液の組成は図3A, Bを参照. モノマー溶液は4°Cで保存可能.
  - ・Digestion buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.8 M guanidine HCl, 8 units/mL Proteinase K]. 4°Cで保存可能.
  - ・Acryloyl-X, SE, 6-((acryloyl)amino)hexanoic acid, succinimidyl ester (AcX) (Invitrogen, #A20770). 10 mg/mLの濃度になるようにAcXをdimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解する. マイクロチューブに小分けしたものを-20°Cで保存可能.
  - ・2% SeaPlaque アガロース (Lonza, #50100).
- 2) プロトコール**
- (1) 直径9mmの丸型カバースリップを24ウェルプレートに入れ, その上に細胞を播種して培養する. (9mmのカバースリップを用いてゲルを作製すると, 膨張後のゲルの直径が6ウェルガラスボトムプレートのウェルのサイズとほぼ同じ約36mmとなる.)
  - (2) 培地を取り除いた後, 3% パラホルムアルデヒド (PFA) を加えて37°Cで15分間静置して細胞を固定する. (このプロトコールではPFA固定の例を示すが, メタノール固定でも膨張顕微鏡法は可能である.)
  - (3) PBSで洗浄した後, クエンチングのために50 mM NH<sub>4</sub>Cl/PBSを加えて室温で15分静置する. その後PBSで洗浄する.
  - (4) 膜の透過処理のため, 0.1% Triton X-100/PBSを加えて室温で5分静置する. その後PBSで洗浄する.
  - (5) モイストチャンバー内にブロッキング液 (10% FBS/PBS) の液滴 (30~50 μL) を作り, その上にカバースリップを乗せて室温で約1時間静置する.
  - (6) 5% FBS/PBSで希釈した1次抗体とAmplibodyをモイストチャンバー内に滴下して液滴を作り, その上にカバースリップを移して, 4°Cで一晩 (12~18時間) 静置する. (通常の免疫染色よりも抗体を高濃度で使用し, 処理時間を長めにした方がよい試料になりやすい.)
  - (7) PBSで洗浄する. 室温で5分を3回繰り返す.
  - (8) 5% FBS/PBSで希釈した抗蛍光タンパク質抗体 (anti-GFPまたはanti-mCherry) を, モイストチャンバー内に滴下して液滴を作り, その上にカバースリップを移して, 室温で2時間静置する.
  - (9) PBSで洗浄する. 室温で5分を3回繰り返す.
  - (10) PBSで100倍に希釈したAcX (終濃度0.1 mg/mL) をモイストチャンバー内に滴下して液滴を作り, その上にカバースリップを移して, 室温で2~3時間反応させる.
  - (11) PBSによる洗浄 (室温で5分) を3回繰り返す.
  - (12) 氷上で冷やしたマイクロチューブ内でゲル溶液を作製する (図3B). パラフィルムを巻いたスライドガラス上でゲル溶液 (15 μL) の液滴を作り, その上にカバースリップを移す (図3C①). (この条件で作製したゲルの厚みは約240 μmと薄いので, ゲル化後に抗体が浸透しやすい.)
  - (13) 37°Cで20分静置しゲル化させる (図3C②).
  - (14) 精密ピンセットを使ってカバースリップとゲルをパラフィルムからゆっくりと剥がす (図3C③).
  - (15) 剥がしたカバースリップとゲルを6ウェルガラスボトムプレートにゲルが上 (カバースリップが下) の向きに置く (図3C④).
  - (16) Digestion buffer (1 mL) を加えて37°Cのインキュベーター内で30分から60分静置する (図3C⑤). (この過程でゲルが一回り膨らみ, カバースリップから自然に剥がれることが多い. ゲルが剥がれたカバースリップは不要なので取り出しておく.)
  - (17) Digestion bufferを取り除いた後, PBSを加えて室温で15分間2回洗浄する. シーソー型のシェイカーを使ってプレートをゆっくり振とうする.
  - (18) 蛍光標識された2次抗体を5% FBS/PBSで希釈し, ウェルに加えて室温または4°Cで一晩 (12~18時間) ゆっくり振とうする (図3C⑥).
  - (19) 2次抗体液を取り除いた後, 0.1% Triton X-100/PBSを加えてゲルを振とうしながら洗浄する. 洗浄 (室温で30分) を3回繰り返す.
  - (20) 洗浄液を取り除いた後, milliQ水を加えて室温で静置する. 20~30分ごとに水を交換し, それを4~5回繰り返す (図3C⑦). (2回目か3回目の水交換のときに, Hoechst色素を加えたmilliQを使用することでゲル内に残っている核DNAを染色することができる.)
  - (21) ゲルが完全に膨張してウェルとほぼ同じサイズになったら水を取り除く. ゲルの上から溶かした低融点アガロースを流し込み, 室温で静置して固化させる. (アガロースを加える前に, ゲル内のHoechst染色された核を顕微鏡で観察し, 試料がゲルの下側にあること

をフォーカス面の位置で確認する。ゲルを振とうしている間に表裏がひっくり返っていることがあるので注意が必要である。)

- (22) アガロースゲルが固まったら少量の水を加え、観察するまで4°Cで保存する。(1週間程度は保存できるが、徐々に劣化するのでできるだけ早く観察して画像を撮影するのが望ましい。)

### 3) 顕微鏡観察

ここでは顕微鏡観察時の注意点などを述べる。培養細胞のような薄い試料に膨張顕微鏡法を適用した場合には観察の際に開口数の大きい油浸レンズを使用できるが、厚みのある試料の場合には作動距離の長い水浸レンズの方が適している。ゲルは透明なので、慣れないうちはフォーカスを合わせるのが難しい。そこでまず、Hoechstで染色した核を観察して試料がある場所とおおよそのフォーカス位置を合わせる。その後、蛍光抗体で染色したチャンネルを観察するとフォーカスを合わせやすい。蛍光の退色を防ぐために観察時の励起光はなるべく弱くすることを心掛ける。

膨張顕微鏡法で作製した試料の観察には、落射型蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡、各種超解像顕微鏡を利用できる。我々はZeiss社の超解像顕微鏡Airyscanを主に利用している。Airyscanを用いれば通常の蛍光顕微鏡の約2倍の分解能で観察できるので、ゲルの膨張率(約4倍)と合わせると、約8倍の分解能での試料の観察が可能である。Airyscanは他の方式の超解像顕微鏡と比べて使い方が簡単であり、蛍光色素や蛍光タンパク質の制限がなく、多色イメージングも可能なので膨張顕微鏡法との相性がよい。これまでに筆者らは膨張顕微鏡法とAiryscanを組み合わせることによって、基底小体に局在するさまざまなタンパク質の9回対称構造やリング状構造の超解像観察(図2C)に成功している<sup>13)</sup>。

### 5. おわりに

膨張顕微鏡法を用いると通常の顕微鏡で手軽に超解像観察が可能になる。超解像顕微鏡と組み合わせればさらに分解能を向上させることもできる。そのため、すでに超解像顕微鏡を利用している研究者にも膨張顕微鏡法は有益な技法であると思われる。また、今回紹介したプロトコールは一次繊毛の研究に限らず、さまざまな分野の研究に大いに役に立つと確信している。ただし、膨張顕微鏡法は発展途上の技術であるため、化学固定・ゲル化・タンパク質分解の過程におけるアーティファクトの発生、ゲル膨張時のゆがみや膨張率のばらつきなど、分子の局在や細胞構造の精密なイメージングをする上で解決すべき課題は多く残されている。しかし最近ではさまざまな改良を加えた次世代の

膨張顕微鏡法が次々に発表されている<sup>14-20)</sup>ことから、今後もより実用的でより信頼性の高い技術へと進化していくに違いない。

本誌の読者はアクリルアミドゲルを作製して電気泳動を行った経験のある方が多いと思われる。そのような研究者にとって高吸水性ゲルを作製すること自体はそれほど難しいことではないだろう。本稿をきっかけにして膨張顕微鏡法にトライしてみようという研究者が増えれば幸いである。

### 文 献

- 1) Ishikawa, H. & Marshall, W.F. (2011) Ciliogenesis: Building the cell's antenna. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 222-234.
- 2) Fisch, C. & Dupuis-Williams, P. (2011) Ultrastructure of cilia and flagella-back to the future! *Biol. Cell*, **103**, 249-270.
- 3) Sonnen, K.F., Schermelleh, L., Leonhardt, H., & Nigg, E.A. (2012) 3D-structured illumination microscopy provides novel insight into architecture of human centrosomes. *Biol. Open*, **1**, 965-976.
- 4) Shi, X., Garcia, G. 3rd, Van De Weghe, J.C., McGorty, R., Pazour, G.J., Doherty, D., Huang, B., & Reiter, J.F. (2017) Super-resolution microscopy reveals that disruption of ciliary transition-zone architecture causes Joubert syndrome. *Nat. Cell Biol.*, **19**, 1178-1188.
- 5) Bowler, M., Kong, D., Sun, S., Nanjundappa, R., Evans, L., Farmer, V., Holland, A., Mahjoub, M.R., Sui, H., & Loncarek, J. (2019) High-resolution characterization of centriole distal appendage morphology and dynamics by correlative STORM and electron microscopy. *Nat. Commun.*, **10**, 993.
- 6) Kashiwara, H., Chiba, S., Kanno, S.-I., Suzuki, K., Yano, T., & Tsukita, S. (2019) Cep128 associates with Odf2 to form the sub-distal appendage of the centriole. *Genes Cells*, **24**, 231-243.
- 7) Chen, F., Tillberg, P.W., & Boyden, E.S. (2015) Optical imaging. Expansion microscopy. *Science*, **347**, 543-548.
- 8) Tillberg, P.W., Chen, F., Piatkevich, K.D., Zhao, Y., Yu, C.-C. J., English, B.P., Gao, L., Martorell, A., Suk, H.-J., Yoshida, F., et al. (2016) Protein-retention expansion microscopy of cells and tissues labeled using standard fluorescent proteins and antibodies. *Nat. Biotechnol.*, **34**, 987-992.
- 9) Asano, S.M., Gao, R., Wassie, A.T., Tillberg, P.W., Chen, F., & Boyden, E.S. (2018) Expansion microscopy: Protocols for imaging proteins and RNA in cells and tissues. *Curr. Protoc. Cell Biol.*, **80**, e56.
- 10) Tillberg, P.W. & Chen, F. (2019) Expansion microscopy: Scalable and convenient super-resolution microscopy. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **35**, 683-701.
- 11) Katoh, Y., Nozaki, S., Hartanto, D., Miyano, R., & Nakayama, K. (2015) Architectures of multisubunit complexes revealed by a visible immunoprecipitation assay using fluorescent fusion proteins. *J. Cell Sci.*, **128**, 2351-2362.
- 12) Pleiner, T., Bates, M., & Görlich, D. (2018) A toolbox of anti-mouse and anti-rabbit IgG secondary nanobodies. *J. Cell Biol.*, **217**, 1143-1154.
- 13) Katoh, Y., Chiba, S., & Nakayama, K. (2020) Practical method for superresolution imaging of primary cilia and centrioles

## テクニカルノート

- by expansion microscopy using an amplibody for fluorescence signal amplification. *Mol. Biol. Cell*, **31**, 2195–2206.
- 14) Gambarotto, D., Zwettler, F.U., Le Guennec, M., Schmidt-Cernohorska, M., Fortun, D., Borgers, S., Heine, J., Schloetel, J.-G., Reuss, M., Unser, M., et al. (2019) Imaging cellular ultrastructures using expansion microscopy (U-ExM). *Nat. Methods*, **16**, 71–74.
  - 15) M'Saad, O. & Bewersdorf, J. (2020) Light microscopy of proteins in their ultrastructural context. *Nat. Commun.*, **11**, 3850.
  - 16) Gao, R., Yu, C.-C.J., Gao, L., Piatkevich, K.D., Neve, R.L., Munro, J.B., Upadhyayula, S., & Boyden, E.S. (2021) A highly homogeneous polymer composed of tetrahedron-like monomers for high-isotropy expansion microscopy. *Nat. Nanotechnol.*, **16**, 698–707.
  - 17) Sun, D.-E., Fan, X., Shi, Y., Zhang, H., Huang, Z., Cheng, B., Tang, Q., Li, W., Zhu, Y., Bai, J., et al. (2021) Click-ExM enables expansion microscopy for all biomolecules. *Nat. Methods*, **18**, 107–113.
  - 18) Shi, X., Li, Q., Dai, Z., Tran, A.A., Feng, S., Ramirez, A.D., Lin, Z., Wang, X., Chow, T.T., Chen, J., et al. (2021) Label-retention expansion microscopy. *J. Cell Biol.*, **220**, e202105067.
  - 19) Damstra, H.G.J., Mohar, B., Eddison, M., Akhmanova, A., Kapitein, L.C., & Tillberg, P.W. (2022) Visualizing cellular and tissue ultrastructure using Ten-fold Robust Expansion Microscopy (TREx). *eLife*, **11**, e73775.
  - 20) Laporte, M.H., Kléna, N., Hamel, V., & Guichard, P. (2022) Visualizing the native cellular organization by coupling cryofixation with expansion microscopy (Cryo-ExM). *Nat. Methods*, **19**, 216–222.

## 著者寸描

## ●加藤 洋平 (かとう ようへい)



京都大学大学院薬学研究科生体情報制御学分野講師。博士 (薬学)。

■略歴 1979年栃木県に生まれる。2002年筑波大学第二学群生物学類卒業。07年京都大学大学院薬学研究科博士課程修了。McGill大学ポストドクトラルフェローを経て、09年より現所属助教。19年より講師。

■研究テーマと抱負 繊毛内タンパク質輸送のメカニズムとその破綻が引き起こす繊毛病に興味を持って研究を行っている。膨張顕微鏡法のような画期的な手法を自分も発明してみたい。

■ウェブサイト <http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/physchem/>

■趣味 水泳と散歩 (コロナ太り解消のため)。