

大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM) による水中免疫電顕法： タンパク質複合体のダイナミックな離合集散と細胞内移動

Immuno Correlative Microscopy in Solution Using Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM): Observation of Dynamic Rearrangements of Molecular Complexes

海老原達彦^a, 村井 稔幸^b, 西山 英利^c, 佐藤 真理^a, 須賀 三雄^c, 佐藤 主税^a
Tatsuhiko Ebihara, Toshiyuki Murai, Hidetoshi Nishiyama, Mari Sato, Mitsuo Suga and Chikara Sato

^a産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門

^b大阪大学大学院医学系研究科

^c日本電子(株)開発本部

要 旨 タンパク質の細胞内分布は高度に制御され、刺激に応じてダイナミックに変化する。免疫電顕法はタンパク質の精妙な細胞内配置による機能の解明に貢献してきた。膜タンパク質が、刺激後に細胞内膜から細胞膜へ数秒以内に移動する例などが近年多く見つかってきており、多要素の変化を時間経過とともに解析する需要が増してきている。すなわち、従来よりも迅速な試料作製と観察が可能で、いわゆる高スループットな電子顕微鏡が求められている。大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM) は、培養ディッシュ内の水溶液中で試料をディッシュ底の電子線透過薄膜越しに倒立走査電顕で観察する新しいタイプの電顕である。試料は脱水処理なしに、蛍光抗体法と同様に手早く作製できる。しかも細胞や組織の抗原分布は薄膜から2~3 μmの厚さで観察可能である。さらに上方の光顕による蛍光像との対比によって、タンパク質複合体の形成など多分子相関の詳細な観察を実現している。

キーワード：免疫電子顕微鏡, 光・電子相関顕微鏡, F-アクチン, STIM1, CD44

1. はじめに

シグナル制御タンパク質には、ダイナミックに移動するものが多い。その典型である TRPV2 は細胞内膜に控えており、外的刺激によって数秒以内に細胞表面に表れる¹⁾。この様に、素早く移動するタンパク質が近年数多く見つかってきている。その詳細な挙動と機構を解明するためには迅速な試料作製が可能で、いわゆる高スループットな電子顕微鏡観察法が必要と考えられる。

また、細胞の様々なタンパク質は互いに会合・離散しながら機能を果たす。会合したタンパク質複合体の多くは、さらに細胞骨格とも結合して細胞内で局在する。これまでの複合体の研究アプローチでは、構成タンパク質をそれぞれ異なる色で標識して相互の局在を解析してきた。電顕は分解能に優れているが単色であるため、異なるサイズの金粒子による染め分けにも限界がある。この限界を打ち破るのが光・電子相関顕微鏡 (CLEM: Correlative Light and Electron Microscopy) であり、光顕の色情報と電顕による高分解能情報を統合し、複合体の挙動をより詳細に探ることができる。

本稿で解説する大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM: Atmospheric Scanning Electron Microscope) は、金粒子や蛍光で標

識した細胞を脱水、包埋、薄切することなくそのまま観察することにより、高スループットな免疫電顕を実現する。また、光顕との相関観察が可能であり、非常に有用性の高い新型の電子顕微鏡と言える (図 1)。

2. 従来の免疫電顕法

従来の免疫電顕法は、主に透過電顕を用いて、様々なタンパク質の分布を高分解能で解明してきた。一般に、電顕では電子線を散乱させないように鏡筒内を真空にする必要がある。そのため試料は真空に耐えしかも電子線を透過するように、数時間~数日間かかる複雑な処理を施す必要があった。試料調整法は、大きく分類すると、Post-embedding 法、Pre-embedding 法、Replica 法の3種類である。Post-embedding 法では、有機溶媒による脱水・樹脂包埋などの前処理を抗体標識前に施すため、脱水処理に弱い試料では抗原性と構造に問題を生じることもある。脱水処理なしに親水性樹脂に試料を直接包埋し薄切することも可能ではあるが難しい。Pre-embedding 法では、水溶液中で試料を抗体標識するため抗原性は保存される。しかし、試料はその後脱水され樹脂包埋される。これら両方法では薄切が行われるため、連続切片法²⁾無しには、情報はおよそ 50-150 nm の薄い切片内に限られるという問題があった。Replica 法では、断面の微細な凹凸が抗原の局在と共に高分解能で観察できる。しかし、得られる情報は断面近くに限られてしまう。

^a 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1

E-mail: ti-sato@aist.go.jp

2013年5月10日受付

3. ASEMによる水中観察電顕法

液体・気体中の試料をそのまま高分解能で電顕観察したいという要求から、電子線透過窓を持つ閉鎖カプセルである環境セルが電顕開発の早期から開発された³⁾。近年、薄膜窓がカーボン膜から、半導体微細加工技術によって開発された強靱な素材へと変わり、環境セルは飛躍的な発展を始めた。しかし数十 μm と小さな閉鎖系であり、神経細胞などの培養は難しく長期培養や外部からの試薬投与も困難であった。何よりも、この小さな容器では抗体標識を行うことは容易でなく、免疫電顕法への応用を阻んでいた。

その克服のために、我々はASEMを開発した(図1A, B)^{4,5)}。強靱な100 nm窒化シリコン(SiN)薄膜をディッシュ底の素材とし、その中の試料を倒立走査電子顕微鏡を使って底から観察する。この35 mm径のASEMディッシュは、底面のSiN薄膜以外は通常の培養用プラスチックペトリディッシュである。そのため、培養細胞に対する一般的な蛍光抗体法の手技をそのまま応用することが可能である。しかも、水中で観察するため、試料作製の手間は光顕とほとんど同じである。インキュベーター内へASEMディッシュを移し、そこで細胞を培養した後、ディッシュを試料ステージ上にOリングで固定して、倒立SEM鏡筒内部を1分程度かけて真空排気

する。最初にディッシュ上部に配した光顕で、培養細胞の変化を観察する。目的とする細胞変化が起こった瞬間に化学固定し、ラジカルスカベンジャーである10 mg/mlグルコース溶液中で、下からSiN薄膜越しに電子ビームスキャンにより同一視野を高倍率観察する(図1A)。また、光・電子相関観察を行う抗原の標識には、蛍光と金が付いたFluoroNanogold⁶⁾やquantum dots⁷⁾が活用できる。ASEMの分解能は8 nmで、細胞小器官や細胞骨格の観察も可能である^{4,8)}。

3.1 細胞骨格のASEM観察

細胞骨格は細胞の形を決定するとともに、能動輸送のレールであり、分子局在の足場となる。微小管はチューブリン重合により形成され、細胞分裂、鞭毛運動、神経回路形成などに重要な役割を果たす。腎線維芽細胞由来のCOS7を化学固定し、Triton X-100処理後に、抗 α -チューブリン抗体で一次標識を行って⁸⁾、Alexa Fluor 488 Nanogold-Fab'抗体⁶⁾によって二次標識し、金増感を行った(図1C)⁹⁾。これらの一連の操作はディッシュの液交換で済み、2-3時間で全ての作業を終えることができた。ASEMでは、微小管は主に細胞の中心から辺縁に向かって走る白い線に見えた(図2A)。拡大すると、約20 nmの金粒子の連なりが正体であった(図2B)。バックグラウンドは極めて低い。もちろんラベリングは抗体に限らない。図2C, Dはファロイジン-金で標識したアク

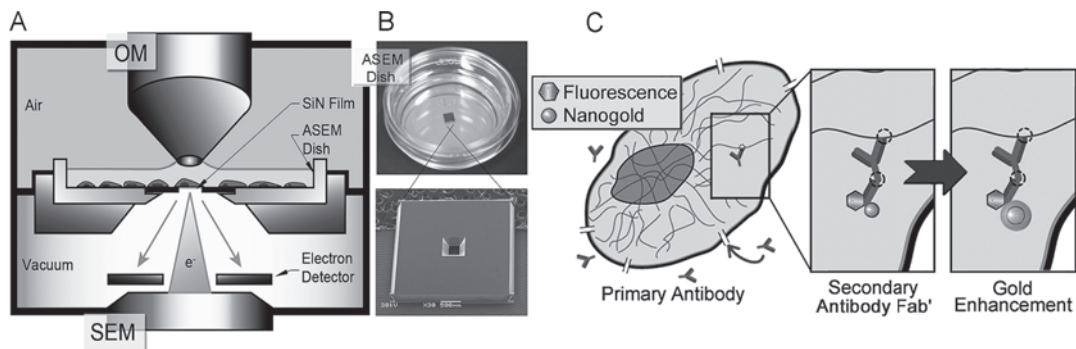


図1 ASEMの原理と蛍光・金標識法。(A)倒立型SEMに対向して光学顕微鏡を配置し、両者の間に、底に電子線透過薄膜を張ったASEMディッシュをセットする。このディッシュは取り外してCO₂培養器内で培養が可能である。原子400個厚のSiN薄膜は、半導体製造工程から生まれたもので真空を支える強度をもつ。電子線は薄膜を透して液中の細胞を照射し、反射電子は薄膜を通して円盤型のBEI検出器で検出される。SEM像は、ディッシュ上から撮影した蛍光像とリンクされる。(B)ASEMディッシュ。中央底にシリコンチップが埋め込まれている。下はディッシュ底から見たチップの拡大像で、中央はエッチングにより凹んでおりSiN薄膜が張られている。(C)細胞内抗原の蛍光・金抗体標識と金増感処理を示す。文献8)より改変。

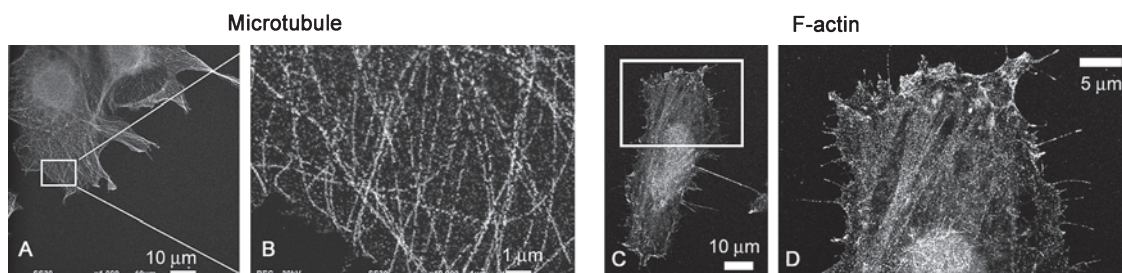


図2 微小管・F-アクチンの免疫ASEM。(A)COS7細胞の α -チューブリンを蛍光と金(FluoroNanogold)標識した水中免疫電顕像。(B)高倍像では一本一本の微小管が観察される。(C)HeLa細胞のF-アクチンをファロイジン-蛍光金で標識。(D)高倍像。文献8)より改変。

チンフィラメントのASEM観察像である。より動的な細胞骨格であるアクチンフィラメント（F-アクチン）は、細胞運動やシナプス形成・可塑性等に重要である。

3.2 ASEM はどの位の厚さまで見えているか

ASEM観察を加速電圧30kVで行った場合、薄膜からどの程度の深さまで観察できるのだろうか？微小管を図2と同様に標識し、共焦点蛍光顕微鏡との比較を行った。図3BのASEM像における突起（矢頭）や球状の突起（矢印）は、Aの共焦点像では最上段の薄膜底面像には存在しなかった。Aの下図より、これらは薄膜から浮いた構造であることがわかり、ASEMの観察できる深さは2-3 μm と推定された^{8,10}。加速電圧10kVでは観察できる深さは1 μm 程度まで浅くなった¹⁰。培養神経細胞のシナプスや神経突起はすべて2~3 μm の観察可能範囲内にあるため、ASEMで十分解析が行えると考えられる。

3.3 電子飛跡シミュレーションによる観察できる深さ

モンテカルロ法によってビーム中の電子の軌道（飛跡）を確率に基づきシミュレートした。20kVから30kVと加速電

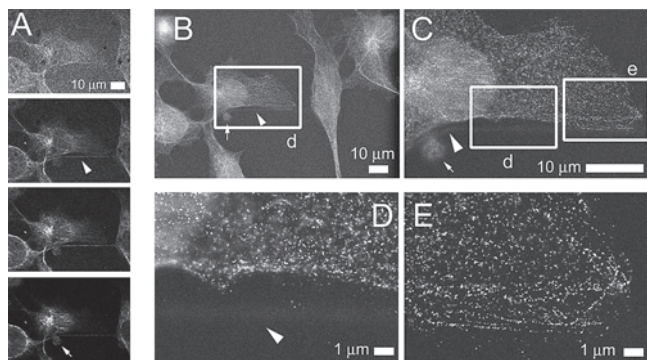


図3 ASEMによる観察深度。COS7細胞の α -チューブリンを図2Aと同様に金・蛍光標識し、Confocal蛍光顕微鏡との比較により観察できる深さを測定した。(A)共焦点蛍光顕微鏡像。最上段はSiN膜面。最下段は膜面より1.32 μm 。(B-E)ASEM像(30kV)。観察できる深さは2-3 μm と推定される^{8,10}。文献8)より改変。

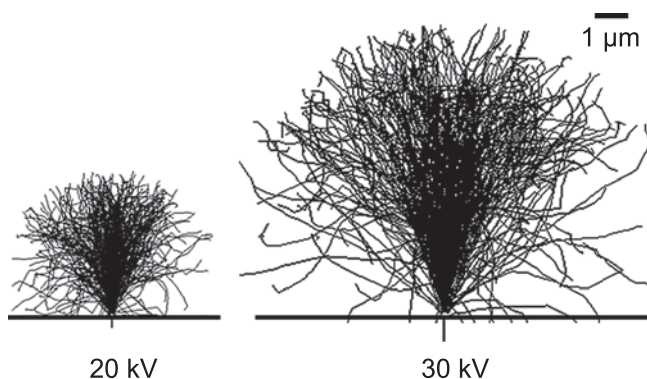


図4 電子軌道（飛跡）シミュレーション。ASEMでのイメージングを、モンテカルロ法によって電子軌道シミュレーションした。20kVと30kVに関して、試料をカーボン層と仮定して行った。この結果は図3で観察された深さの結果を支持している。文献4)より改変。

圧が上昇するに伴って、電子線照射深度は深くなり、観察できる深さも大きくなると考えられた(図4)。これらの結果は、図3ともよく一致した。

4. 初代培養神経細胞のシナプス形成時における細胞骨格の再構築

シナプスは、神経ネットワーク形成の基本単位である。そのサイズは50-500nmと小さく、構成する軸索や樹状突起も微細なものが多い。そのため、観察には、光顕よりも電顕の分解能が適しているように思われる。しかし、通常透過電顕で培養神経細胞のシナプス結合を全て観察するには、樹脂包埋後に培養面と水平にサンプルを薄切するという実際には困難な作業を行わなければならない。これに対して、ASEMではシナプスを包埋や薄切なしに観察可能で、50nmの小さなスパインも観察できた。

図5A-Dは神経軸索の成長円錐を観察したものである。ポリ-L-リジンコートしたASEMディッシュ上で、マウス海馬神経細胞（錐体細胞）を4日間初代培養した⁸。固定・細胞膜透過処理後に、F-アクチンを標識し、白樺の成長円錐をASEMで観察すると、先端のラメリポディア（葉状仮足）内の微細なF-アクチンがまるで自転車のスポークのような形状で観察された(図5C, D)。スポーク構造の内側には、Homer 1cが共在した(図5B黄緑)。このことは、Homer 1cが Ca^{2+} シグナル情報を受け取り、成長円錐の運動をアクチン重合を介して制御するとの考えにも合致する。培養14日目ではシナプスが観察された。スパインに局在するHomer 1c(図5F, 緑)をガイドに、シナプス部位の精細な形態が観察できた(図5H)。チューブリンは樹状突起のシャフトに存在して、シナプス部位にはほとんど存在しなかった(図5G)。また、これら樹状突起内の微小管は斜め(らせん状)に走行することが判明した(図5I, J)。

5. シグナル伝達分子のダイナミックな再配置

5.1 脂質ラフトによる糖鎖レセプターの局在制御

細胞膜において外から内へのシグナルを制御するタンパク質には、一般に脂質ラフトと呼ばれる膜ドメインに局在し、そこで複合体構造をつくるものがある。癌転移関連膜レセプターCD44は、ラフトに局在すると考えられており、細胞外基質の特定の糖鎖を認識して結合し、癌の転移にも密接に関係している。神経膠芽腫U251MG細胞を固定後に、細胞外からCD44を認識する抗体を用いて金標識した。CD44を示す白い点は細胞表面の所々に密集していた(図6A)¹¹。対照的に、M β CD(methyl- β -cyclodextrin)の投与により、脂質ラフトの構成成分であるコレステロールを細胞から除去してラフトを破壊すると、CD44を示す金粒子の分散が認められた(図6B)。この結果は、コレステロールの低下が、細胞運動の駆動力を生み出す足場であるCD44複合体を分散させることで、癌の浸潤・転移などに関わる細胞の運動性を抑制する可能性を示唆している。

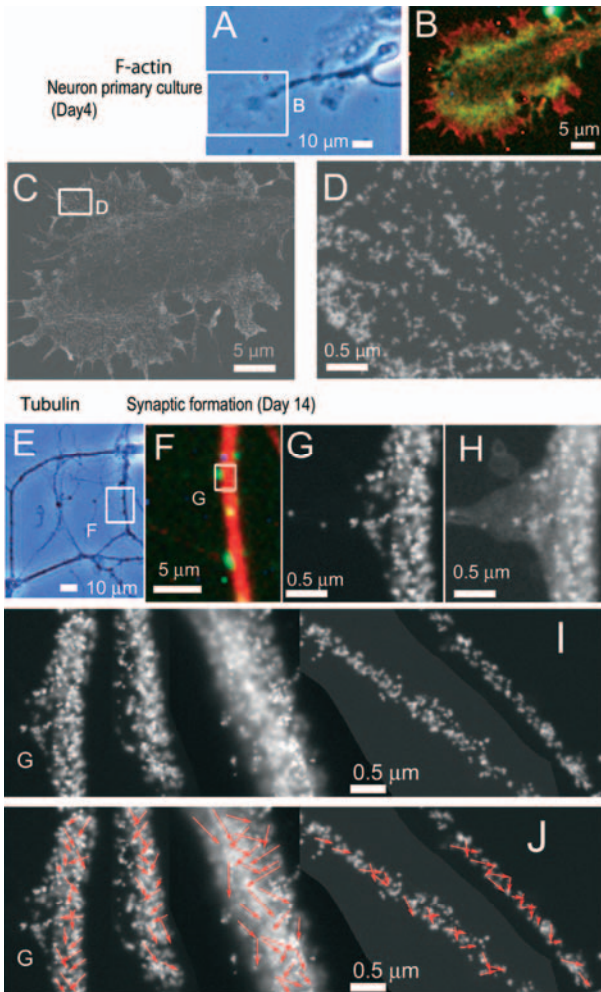


図5 初代培養神経細胞の成長円錐。ポリ-L-リジンコートしたSiN薄膜上で、Homer1c-EGFPトランスジュニクマウス的大海錐体細胞を初代培養した。(A) 4日後の位相差顕像。(B) 蛍光像。F-アクチンを赤と金で標識。(C, D) ASEM像。成長円錐のラメリポディア(葉状仮足)には、自転車のスポーク状にF-アクチンが観察された。(E) 培養14日後の位相差像。シナプスが形成されている。(F) 蛍光像。(G-I) ASEM像。(G) シナプスのチューブリン。(H) さらに重金属で細胞の輪郭を染色。(I, J) 樹状突起内の微小管は、長軸に対して斜め(らせん状)に走行している。文献8)より改変。

5.2 CRAC イオンチャンネルのCa²⁺感受機構の可視化

小胞体の膜タンパク質であるCa²⁺センサーSTIM1は、細胞膜にあるCRACイオンチャンネルのセンサーである。STIM1は小胞体内部のCa²⁺濃度をモニターしており、小胞体内部のCa²⁺欠乏によってCRACを開けると考えられている。Ca²⁺を涸渇させて、STIM1の小胞体膜上での分布を観察したのが図7である⁸⁾。小胞体マーカーPDIを蛍光標識して相関観察したところ(図7A), 小胞体がCa²⁺を貯蔵している定常状態では、STIM1を表す金は小胞体全体に分散していた(図7B, C)。ひとたびCa²⁺枯渇が起こると、STIM1分子は細胞膜近くに斑点状に集合した(図7E-G)。拡大すると、分子は一次元的につながって凝集する様子が初めて観察された(図7G)。STIM1分子は非対称なので、分子が前後に連結することが示唆された。STIM1重合体はさらに細胞膜のOraiと結合し、密集したイオンチャンネル複合体を形成し活性化すると考えられる。

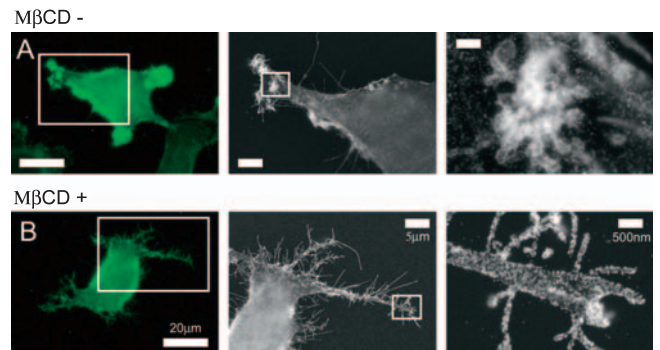


図6 脂質ラフトにおけるCD44の分布とMβCDの影響。神経膠芽腫U251MG細胞の細胞膜表面のCD44をFluoroNanogold標識した。左は蛍光、中と右は金粒子をASEMで撮影。(A) 糖鎖レセプターCD44は、通常脂質ラフトと呼ばれる膜ドメインに局在する。(B) 脂質ラフトをMβCDで壊した細胞では、ラフトに集中していたCD44は分散していた。ラフト集積構造のほうが、細胞運動の足場として優れていると推測される。それぞれ、左側の図の白枠エリアを拡大撮影した。AとBの各図上下は同倍率。文献11)より改変。

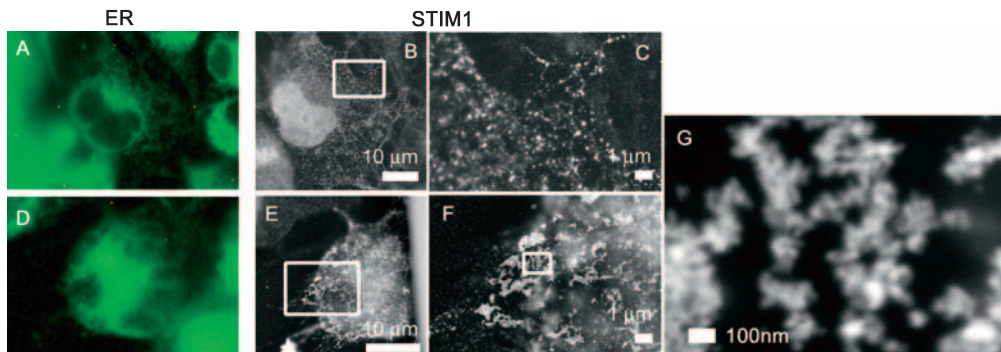


図7 小胞体(ER)内Ca²⁺減少によるSTIM1の複合体形成。CRACチャンネルのCa²⁺センサーであるSTIM1サブユニットは細胞内の小胞体に分布するが(A-C), Ca²⁺枯渇を感知し細胞膜近くに斑点状に集合する(D-G)。白黒像はASEM像で、白枠をそれぞれ拡大撮影したのが右側の図である。集合したSTIM1の最拡大像では金粒子が線状に繋がって見え、分子が一次元的に結合していることが推測される(G)。STIM1は、さらに細胞膜のOrai1と超複合体イオンチャンネルを形成すると考えられる。(A, D) ERマーカーのPDIに対する蛍光抗体標識であり小胞体の分布を表す。COS7発現系での結果を示した。免疫系T細胞の内在性STIM1でも同様の分子会合が観察された。文献8)より改変。

6. 細菌の構造解析

細胞サイズが非常に小さい細菌は液中でどう見えるのであろうか？近年肺炎の流行などで特に注目を集めるマイコプラズマは、細胞体積が大腸菌のおよそ1/25しかない。*Mycoplasma mobile* 種は魚のエラから発見され、水中で極めて高速で運動できる。それは、タンパク質複合体の足を多数持つからである。Triton X-100 で細胞膜に透過処理をした後、重金属で染色してASEM撮影を行った。尖った先端にはCap構造、球状の細胞後方部には核酸、中間部分には変化に富んだ構造が観察された(図8A)¹²⁾。また、移動を支える足複合体を金で免疫標識すると、細胞表面に腹帯状に分布しているのが認められた(図8B下)。

7. 細胞培養・固定・金標識・染色の方法

SiN 薄膜は一般に細胞培養に適している。COS7・HeLa等の細胞は、基質への接着性が良いため、ASEM ディッシュのSiN 薄膜上で直接培養した(10%ウシ胎児血清加ダルベッコ改変イーグル培地, 5% CO₂, 37°C)。神経細胞の初代培養では、あらかじめポリ-L-リジン等で表面コートを行った。ASEM 観察用の試料作製方法は以下のとおりである。①細胞を4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液(pH 7.4)等で室温にて10分間固定、②必要に応じて0.1%–0.5%のTriton X-100で細胞膜透過処理、③1%スキムミルク等でブロッキング、④一次抗体付加、⑤洗浄後にFluoroNanogold Fab'二次抗体付加、⑥蛍光観察、⑦1%グルタルアルデヒドで抗体を固定、⑧水洗後に、室温で5分間金増感、⑨10 mg/ml グルコース溶液などのラジカルスカベンジャー中でASEM観察を行う。標識以外の構造を見るためには、⑩金属塩溶液(例えば1%リンタングステン(PTA)水溶液や10倍希釈白金ブルー液)などで10分間染色する^{4,8)}。

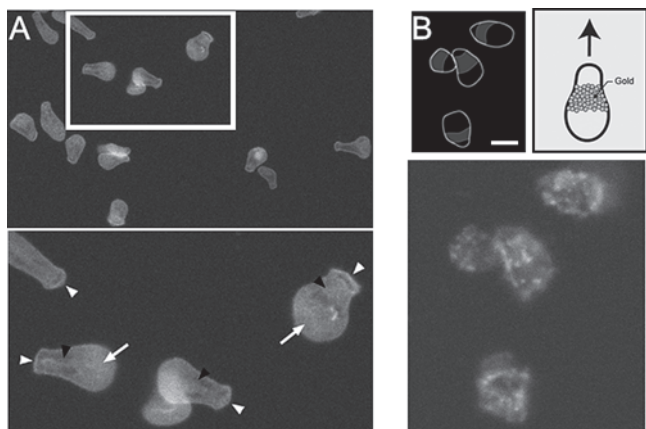


図8 マイコプラズマ *Mycoplasma mobile* のASEM像。(A) 重金属染色。下は拡大図。(B) 足タンパク複合体Gli349の水中免疫電顕像。金標識の後で、重金属で細胞の輪郭をカウンター染色。上は模式図であり、細胞は矢印方向に移動する。マイコプラズマは一般に大腸菌の1/25の体積しかない。文献12)より改変。

8. ASEMによるイメージングのコツ：加速電圧とコントラスト

電子顕微鏡で微細な構造を視認できるかは、一般的に装置の分解能だけでは決まらない。ASEMでより微細な構造を観察するにはどうしたら良いのであろうか？これは、以下の3要因により決まる。

- 1) 試料位置におけるビームの広がり
- 2) コントラスト
- 3) 信号量

1) は小さいほど良い。加速電圧が高いほど、電子ビーム電流が小さい(スポットサイズが小さい)ほど、また薄膜が薄くて、試料の位置が薄膜に近いほどビームは小さくなる。

2) は、観察ターゲット(例えば標識の金粒子)とマトリクス(例えば水)の原子番号差や密度差が大きいほど高くなる。また、信号発生領域を小さくする方が高くなる。加速電圧を低くすることにより、信号発生領域を小さくできる。

3) は、電子ビーム電流が大きいほうが多くなる。

全体として、生体試料に標識した金粒子などでは原子番号と密度が高いため、高い加速電圧で観察しやすい。また、薄膜から近く薄い構造のコントラストは、低加速電圧のほうが高く、可視化に優れると言える。

9. 考 察

水中での光顕・電顕による相関観察が一つの装置にてできることは、ASEMの大きな特徴である。観察の迅速さは、多条件での実験を可能にした。光顕とのリンクは、遺伝子導入実験でも威力を発揮する。培養細胞への遺伝子導入は、時として数%の効率でしか成功しない。mCherryなどの蛍光タンパクの遺伝子を導入マーカーとして使用すれば、発色する導入細胞を選別してその影響を電顕観察できる。

新開発の開放型ASEM ディッシュは、特に二つの利点をもたらした。一つは、培養が難しい様々な細胞を薄膜上で培養できるようになったこと。もう一つは標識や洗いの効率が上がったことである。ASEM ディッシュでは、3 mlの大きな培養体積でCO₂ インキュベーター内で培養できるため、培養液の塩濃度が安定である。さらに、広い液面でのガス交換により酸素・二酸化炭素濃度が安定である。SiN膜は、ガラス用の表面コート剤で表面処理することで細胞接着が向上する¹²⁾。それは、SiN膜表面は恐らく製造過程で酸化されてSiO₂となっており、ガラス様の性質を持つからと思われる。標識・洗浄の容易さは、本免疫電顕法をほぼ光顕並に高スループットなものにした。そのため、多検体解析やスクリーニングが容易であり、1日に40ディッシュを観察した例もある。試料の調整はすべて水溶液中で行われるため、抗原性の保存は極めて良い。100種類ほどの細胞標識用の抗体を試したところ、100%の抗体でASEM観察することができた。その内半数はマウスモノクローナル抗体である。重金属による染め

分けを追加することで、特定の細胞構造を強調することができる。酢酸ウラン、リンタングステンは主にタンパク質・核酸を、四酸化オスミウムは油滴や膜構造を強調する⁴⁾。ASEMの加速電圧を変えることで、目的物の薄膜からの距離を推定することができる。この辺りは、機能的には共焦点顕微鏡と少し似ているが、原理は異なる。

10. おわりに

高スループットなASEMは、多様な試料を短い前処理により高分解能で観察することが可能である。ASEMの操作は、電顕としては極めて習得が簡単である。常に薄膜が同じ高さにセットされるため、フォーカス位置が同じ場所にくることも簡便さの一因となっている。今回ご覧いただいた結果以外にASEMは、光顕分解能以下のタンパク質微結晶を無染色で結晶化溶液中で観察可能である¹³⁾。また、基礎生物学のみならず、癌の術中迅速診断⁴⁾や病原菌の特定、食品化学、ポリマー化学などにも応用できる。さらに、開放系の気体・液体中で高分解能観察できる能力は、材料科学や電気化学¹⁴⁾、ナノ科学など様々な物理・物性研究にも広く応用できる。

謝 辞

産総研の小椋俊彦博士にASEM (ClairScope) 開発での貢献に、ASEM製作では日本電子テクニクス (株) の露木誠氏、佐藤猛氏、石森能夫氏、小泉充氏、小川康司氏に、薄膜の製作では、山形県工業技術センターの渡部善幸博士と日本電子の小入羽祐治氏の御協力に感謝いたします。ASEM開発の一部は、産業技術総合研究所と日本電子のマッチングファンドの支援を受けて行われました。

- 1) Nagasawa, M., Nakagawa, Y., Tanaka, S. and Kojima, I.: *J. Cell. Physiol.*, 210, 692–702 (2007)
- 2) Toida, K., Kosaka, K., Heizmann, C.W. and Kosaka, T.: *Neuroscience*, 72, 449–466 (1996)
- 3) Abrams, I.M. and McBrain, J.W.: *J. Appl. Phys.*, 15, 607–609 (1944)
- 4) Nishiyama, H., Suga, M., Ogura, T., Maruyama, Y., Koizumi, M., Mio, K., Kitamura, S. and Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, 169, 438–449 (2010)
- 5) 西山英利, 須賀三雄, 小椋俊彦, 丸山雄介, 小泉 充, 三尾和弘, 北村真一, 佐藤主税: 顕微鏡, 44, 262–267 (2009)
- 6) Powel, R.D., Halsey, C.M. and Heinfeld, J.K.: *Microsc. Res. Techniq.*, 42, 2–12 (1998)
- 7) Giepmans, B.N., Deerinck, T.J., Smarr, B.L., Jones, Y.Z. and Ellisman, M.H.: *Nat. Methods*, 2, 743–749 (2005)
- 8) Maruyama, Y., Ebihara, T., Nishiyama, H., Suga, M. and Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, 180, 259–270 (2012)
- 9) Powell, R.D. and Hainfeld, J.E.: Silver- and gold-based autometallography of Nanogold, in: Hacker, G.W., Gu, J. (Eds.), *Gold and Silver Staining: Techniques in Molecular Morphology*, CRC Press, Boca Raton, FL, 29–46 (2002)
- 10) Suga, M., Nishiyama, H., Ebihara, T., Ogura, T. and Sato, C.: *Microsc. Microanal.*, 15, 924–925 (2009)
- 11) Murai, T., Maruyama, Y., Mio, K., Nishiyama, H., Suga, M. and Sato, C.: *J. Biol. Chem.*, 286, 1999–2007 (2011)
- 12) Sato, C., Manaka, S., Nakane, D., Nishiyama, H., Suga, M., Nishizaka, T., Miyata, M. and Maruyama, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 417, 1213–1218 (2012)
- 13) Maruyama, Y., Ebihara, T., Nishiyama, H., Konyuba, Y., Senda, M., Numaga-Tomita, T., Senda, T., Suga, M. and Sato, C.: *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 10553–10567 (2012)
- 14) Suga, M., Nishiyama, H., Konyuba, Y., Iwamatsu, S., Watanabe, Y., Yoshiura, C., Ueda, T. and Sato, C.: *Ultramicroscopy*, 111, 1650–1658 (2011)