

連載ミニレビュー

作物の形態研究法：マクロからミクロまで 免疫電子顕微鏡法の実際

上野修
(農業生物資源研究所)

免疫電子顕微鏡法は、免疫組織細胞化学の一手法である。この方法では、抗原抗体反応を利用して、組織切片上で酵素等の蛋白質（抗原）の局在部位を標識し、電子顕微鏡下で観察する。これにより、対象とする蛋白質が組織細胞のどの部位にどの位蓄積しているのかを的確に知ることができ、組織細胞の構造と生理生化学的機能を結びつけて理解する上できわめて有効な手法である。ここでは、著者が葉における光合成代謝酵素の局在解析で日頃行っている、超薄切片を用いたプロテイン A・金コロイド免疫電子顕微鏡法の実験手法を概説する。

1. 免疫電子顕微鏡法とは

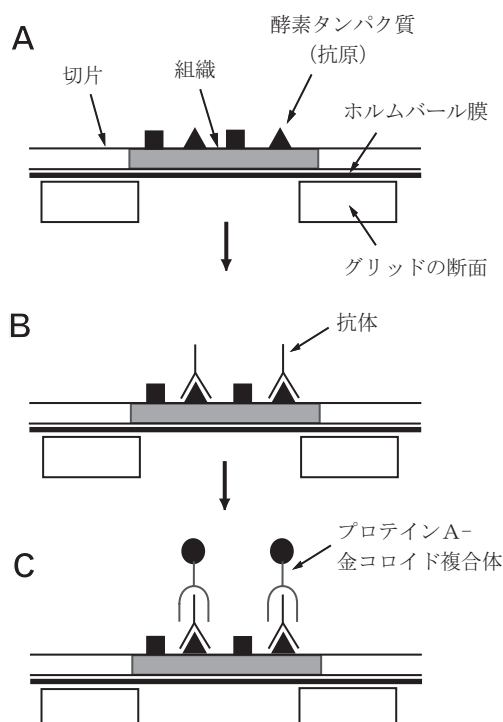
生体組織には酵素を始めとする各種の蛋白質が含まれている。これらの蛋白質の存在や蓄積量を解析するには、一般には生組織から蛋白質を抽出した後電気泳動にかけ、目的の蛋白質に対する抗体を用いて検出同定する（ウェスタンブロット法）。しかし、この方法では組織細胞のどこに目的の蛋白質が蓄積しているのかを知ることはできない。これを知るためには、組織をあらかじめ細胞やオルガネラに分画し蛋白質の局在を解析することになるが、このときコンタミネーションや回収率の問題が生ずる。中には分画すること自体、不可能な組織もある。これに対し免疫電子顕微鏡法では、生体組織を化学的に固定した後組織切片を作製し、抗原抗体反応を組織切片上で行わせる。その後金コロイド粒子で抗原の局在部位を標識することにより可視化し、蛋白質の存在を透過型電子顕微鏡下で間接的に観察する（Bendayan 2000）。このため、細胞分画法で直面する多くの問題を回避することができる。

第1図にプロテイン A・金コロイド免疫電子顕微鏡法の原理を示す。グリッド上に載せられた超薄切片の表面には各種の蛋白質が露出している（第1図 A）。まず、切片に目的の蛋白質（抗原）を特異的に認識する抗体を処理して、切片表面の抗原との間で抗原抗体反応を起こさせる（第1図 B）。このままでは、抗原の存在部位を見ることはできないので、切片表面の抗原と結合している抗体をプロテイン A・金コロイド複合体で標識する（第1図 C）。これは、プロテイン A（黄色ブドウ球菌の膜蛋白質）が抗体 IgG の Fc フラグメントと特異的に結合する性質による。この結果、切片上における抗原の局在位置が金コロイド粒子の標識として電子顕微鏡下で観察される（第2図）。

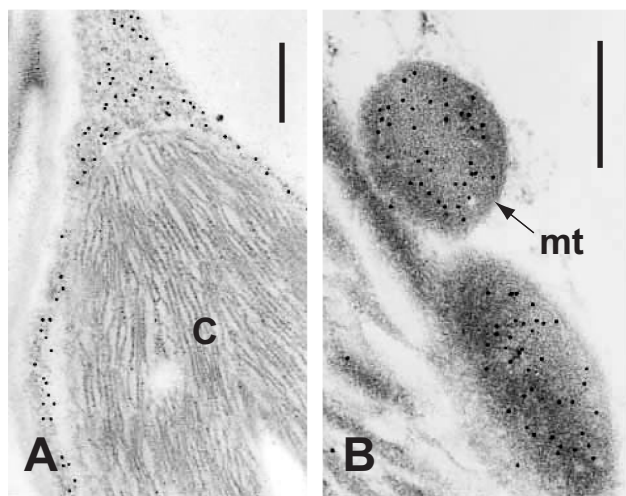
2. 方法の概要

(1) 試料の固定

免疫電子顕微鏡用の植物試料の固定法は、基本的には通常の透過型電子顕微鏡試料の固定操作と同じであるが、いくつかの相違点がある。オスミウム酸は蛋白質の抗原性を著しく低下させるので用いない。また、蛋白質の変成をできるだけ抑えるため低温下で行う。グルタルアルデヒドは抗原性を低下させやすいので、パラホルムアルデヒドがよく用いられる。著者は、3%パラホルムアルデヒド 0.2%



第1図 プロテイン A・金コロイド免疫電子顕微鏡法の原理。



第2図 プロテインA・金コロイド免疫電子顕微鏡法による光合成および光呼吸酵素の局在解析。A:アマランサス(C₄型)葉肉細胞の細胞質におけるPEP-カルボキシラーゼの標識。B:キャッサバ(C₃型)葉肉細胞のミトコンドリア(mt)におけるグリシンデカルボキシラーゼP蛋白質の標識。C:葉緑体。スケール:0.5 μm 。

グルタルアルデヒドリン酸緩衝液 (pH 6.8) により固定するか、光合成代謝酵素のように葉内に多量に蓄積している蛋白質では、3%グルタルアルデヒドリン酸緩衝液 (pH 6.8) により固定している。微量な蛋白質の検出では前者の固定液が優れているが、微細構造保持の点では後者の方がやや勝る。

植物試料に少量の固定液をたらし、カミソリの刃を用いて1 mm 以下に細切した後、管瓶の中で固定する。著者は、葉の場合厚さ0.3~0.4 mm、幅1 mm 位の切片にして固定している。管瓶は水冷する。以後、液の交換は試料を管瓶内に残したまま、パストールピペット等で液を吸い取るにより行う。なお、植物組織は細胞間隙が発達しているので、固定の最初の段階でアスピレーターにより脱気する必要がある。固定時間は植物材料により異なるが、イネ科植物の葉身で3時間位である。その後、水冷したリン酸緩衝液で30分おきに3回洗浄する。

(2) 脱水および包埋

エタノール (30%, 50%, 80%, 95%, 100%, 100%, 各30分) により脱水する。その後、Lowicryl K4M 樹脂とエタノールの混合液 (1:2, 1:1, 3:1, 各2時間) の中で徐々に組織内のエタノールを樹脂と置換し、100%のLowicryl K4M 樹脂の中に一晩おく。さらに新しいLowicryl K4M 樹脂と交換して1日おく。50%エタノール以降の操作は冷凍室 (-20°C) で行う。Lowicryl K4M 樹脂は粘度が低いので回転浸透器にかけると必要はないが、ときどき液を攪拌する。

組織片はゼラチンカプセルかビームカプセルの中で包埋し、紫外線を1日照射することにより重合させる。専用の紫外線重合装置が市販されている。重合中に熱が発生する

ので、抗原性の低下を防ぐために、装置は冷凍室の中に入る (Lowicryl K4M 樹脂は-35°Cまでの低温重合が可能)。完成した樹脂ブロックはシリカゲルを入れた密栓容器の中に入れ、冷蔵庫内に保管する。Rubisco や C₄ 植物の PEP-カルボキシラーゼのように多量に蓄積している酵素蛋白質であれば、1年間位保管したブロックでも十分検出できる。なお、免疫電子顕微鏡用の樹脂としては、LR White や LR Gold もしばしば用いられる (安田 1986)。

(3) 薄切

超薄切片の作製法は、通常の透過型電子顕微鏡試料の方法と違いはない。ホルムバール支持膜を張ったグリッドの上にシルバーゴールド位の切片を載せる。Lowicryl K4M 樹脂は親水性であるため、ブロックの切り出し面に水滴が付かないよう注意する。樹脂が水分を吸うと、超薄切片の作製は難しくなる。また、ブロックを一度トリミングし時間がたつと、樹脂が変成し再度の薄切が難しくなるので、一度に切片を作成する。

(4) 抗原抗体反応と標識

- 1) 0.5%牛血清アルブミン (BSA) を含む PBST 溶液, 30分
- 2) 上記溶液で希釈した抗体 (数時間から一晩)
- 3) PBST による洗浄 (各10分, 3回)
- 4) 0.5% BSA を含む PBST で希釈したプロテイン A・金コロイド複合体溶液 (30分)
- 5) PBST による洗浄 (各5分, 4回)
- 6) 蒸留水による洗浄 (各5分, 3回)
- 7) 乾燥

PBST は 0.15M NaCl と 0.1% Tween 20 を含む 0.01M リン酸緩衝液 (pH 7.2) である。以上の操作は、シャーレ内の水を浸した濾紙の上にパラフィルムをしき、滴下した水滴 (20~30 μL) にグリッドを浮かべて (切片面を下)、順次移動させて行く。最初の BSA 処理は非特異的の反応を抑えるために行う (ブロッキング)。抗体の至適濃度と至適反応時間は、自身で見出す。処理時間が長い場合は冷蔵庫の中におく。著者は、Rubisco の場合 1000 倍希釈で3時間 (室温)、PEP-カルボキシラーゼでは 500 倍希釈で一晩 (4°C) 処理している。また、使用する抗体が目的の蛋白質を特異的に認識することを、事前にウエスタンブロット等により確認しておくことが重要である。特異性の低い抗体を用いて実験しても、何ら信頼できる結果を得ることはできない。信頼できる反応性の高い抗体を用いることが、実験成功のポイントとなる。プロテイン A・金コロイド複合体は自作することもできるが (Bendayan 2000)、市販されているもので十分良好な結果を得ることができる。希釈度は 40 倍位であるが、これも自身で至適濃度を見出す。最後に通常の方法に従い、切片を酢酸ウランとクエン酸鉛で電子染色する。オスミウム酸固定を省いているので電子顕

微鏡像のコントラストは低い。

コントロールとして、少なくとも2)の溶液から抗体を除いた場合と抗体を非免疫血清に変えた場合について実験を行い、得られた標識が目的の蛋白質に対して特異であることを確認する。

ブロックから厚さ1 μ m位の準超薄切片を作製しスライドグラスに張り付け、金コロイド標識を行った後、銀増感することにより光学顕微鏡下で蛋白質の局在を観察することもできる。詳細は、出村(1997)を参照されたい。

3. 解析例

免疫電子顕微鏡法は、植物では光合成や炭水化物代謝を始め、様々な代謝に関わる酵素蛋白質の局在解析に用いられているほか(Ueno 1992, Kawasaki ら 2002)、貯蔵蛋白質、糖蛋白質、膜輸送蛋白質、植物ホルモン等の解析にも活用されている(Herman 1988)。また、走査型電子顕微鏡による植物試料表面における蛋白質の検出にも用いられる(Miyake ら 2001)。

金コロイド免疫電子顕微鏡法は、金粒子の標識密度(切片像の単位断面積当たりの金粒子の数)を測定することにより、蓄積している蛋白質の相対的な量を評価できるという利点をもつ。これは、標識密度の高低は切片上の抗原濃度の高低を表していると考えることに基づく。アブラナ科のC₃-C₄中間植物種とC₃植物種との間で作出した人為交雑植物では、両親との中間的な光呼吸ガス交換特性を示す。免疫電子顕微鏡法による光呼吸鍵酵素グリシンデカルボキシラーゼ(GDC)の標識密度の解析から、この光呼吸活性の違いは維管束鞘細胞におけるミトコンドリアの発達程度と、葉肉細胞と維管束鞘細胞のミトコンドリアにおけるGDCの発現量の調節に基づくことが明らかになった(Ueno ら 2003)。キャッサバ葉では背軸表皮に気孔をもつが(下面気孔葉)、免疫電子顕微鏡法による解析から、GDCは海綿状組織よりも柵状組織のミトコンドリアで強く発現していることが明らかとなり、葉内部の組織の間で光呼吸活性に違いがあることが示唆された(Ueno and Agarie 1997)。

免疫電子顕微鏡法で得られた結果が、生化学的手法により得られた結果と常に一致するのは注意を要する。免疫電子顕微鏡法では組織を化学的に固定し、脱水、包埋するため、この過程で抗原性の低下がおこる可能性を排除できない。しかし、イネ科C₄植物の維管束鞘細胞ミトコンドリアにおけるGDCの蓄積量の種間差に関する研究では、免疫電子顕微鏡法とウェスタンブロット法で得られた結果

とは互いによく一致することが報告されている(Yoshimura ら 2004)。組織内に広く微量に蓄積している蛋白質では、免疫電子顕微鏡法では検出できなくとも、ウェスタンブロット法では検出されることがある。また逆に、組織全体としては微量であるが、組織内のある特定部位に局在している蛋白質では、ウェスタンブロット法では検出できないが、免疫電子顕微鏡法では検出されることもある。常にそれぞれの手法の長所と欠点を十分に念頭において、実験を進めることが必要であろう。

引用文献

- Bendayan, M. 2000. A review of the potential and versatility of colloidal gold cytochemical labeling for molecular morphology. *Biotechnic Histochem.* 75 : 203-242.
- 出村拓 1997. イムノゴールド・シルバー染色法によるタンパク質の局在解析法. 福田裕穂・西村幹夫・中村研三, 植物の細胞を観る実験プロトコル. 秀潤社, 東京. 95-99.
- Herman, E.M. 1988. Immunocytochemical localization of macromolecules with the electron microscope. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39 : 139-155.
- Kawasaki, M., T. Matsuda, Y. Nakamura, O. Ueno, M. Taniguchi, Y. Nitta and H. Miyake 2002. Structural and immunocytochemical characterization of the synthesis and accumulation of starch in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) tuberous root. *Plant Prod. Sci.* 5 : 152-159.
- Miyake, H., M. Nishimura and Y. Takeoka 2001. Immunogold labeling of Rubisco in C₄ plant leaves for scanning electron microscopy. *Plant Prod. Sci.* 4 : 41-49.
- Ueno, O. 1992. Immunogold localization of photosynthetic enzymes in leaves of *Aristida latifolia*, a unique C₄ grass with a double chlorenchymatous bundle sheath. *Physiol. Plant.* 85 : 189-196.
- Ueno, O. and S. Agarie 1997. The intercellular distribution of glycine decarboxylase in leaves of cassava in relation to the photosynthetic mode and leaf anatomy. *Jpn. J. Crop Sci.* 66 : 268-278.
- Ueno, O., S.W. Bang, Y. Wada, A. Kondo, K. Ishihara, Y. Kaneko and Y. Matsuzawa 2003. Structural and biochemical dissection of photorespiration in hybrids differing in genome constitution between *Diplotaxis tenuifolia* (C₃-C₄) and radish (C₃). *Plant Physiol.* 132 : 1550-1559.
- 安田健次郎 1986. 免疫化学的方法. 日本電子顕微鏡学会関東支部(編), 電子顕微鏡生物試料作製法. 丸善, 東京. 219-235.
- Yoshimura, Y., F. Kubota and O. Ueno 2004. Structural and biochemical bases of photorespiration in C₄ plants: quantification of organelles and glycine decarboxylase. *Planta* 220 : 307-317.