

## 作物の形態研究法：マクロからミクロまで 高圧凍結および凍結置換法による電子顕微鏡試料作成

林八寿子  
(新潟大学理学部)

電子顕微鏡用の試料作成法としては、簡便な化学固定法が主流であるが、細胞内のより微細な構造の解析や、瞬間的な動きを捉えるため、また、免疫電子顕微鏡法のための抗原性の保持のためには、凍結固定法が優れている。近年、高圧下で凍結することで、構造を破壊する原因である氷結の形成を防ぐことができる高圧凍結装置 (Bal-Tec, HPM010S 型) が開発され、組織を材料とした凍結固定法による試料作成が可能となっている。そこで、この装置を用いた高圧凍結および凍結置換法について紹介する。

### 1. 高圧凍結の原理

凍結固定法による電子顕微鏡試料作成のための問題点は、通常の気圧下では、試料が凍結される過程で細胞内部に氷が形成され、その氷結によって細胞内部の構造が破壊してしまうことであった。そのため、冷媒の温度を下げ、凍結速度をあげることがこれまでの課題であった。しかし、液体ヘリウムを冷媒とした金属圧着法でも圧着面から 20  $\mu\text{m}$  の深さまでしか硝子様凍結 (氷結の径 20 nm 以下) は得られず、取り扱いが比較的容易な液体窒素を用いた場合には、冷却速度 10000 K/秒が必要となるため、凍結深度は 10  $\mu\text{m}$  が限界とされてきた。

高圧凍結法は Reihel (1968) や Moor ら (1980) により開発された方法で、高圧下では水の融点が下がるために、氷結形成が妨げられるという考えを基にしている。2050 bar では水の融点は 22 K に低下し、過冷却域も低下する。また、粘性が常気圧の 1500 倍以上となる。この状態の場合は、凍結速度 200 K/秒で硝子様凍結が可能となる。理論的には、両面から凍結すれば、200~600  $\mu\text{m}$  の厚さの試料の凍結が可能となる。Bal-Tec, HPM010S 型 (日立ハイテクノロジーズ, 3500 万円) は、油圧ポンプで加圧した

300 bar の液体窒素を試料加圧凍結室へと送り込み、穴から噴出する液体窒素によって、試料加圧凍結室内部を 0.5 秒間 2100 bar に保つ構造となっている (第 1 図)。試料は、サンプルキャリアに挟まれた状態でセットされ、キャリアの両面から凍結される。

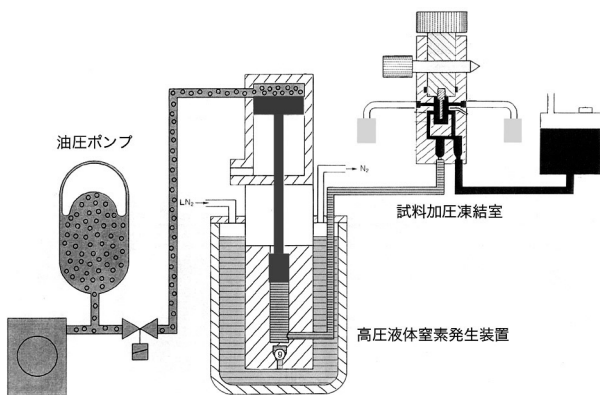
### 2. 方法の概要

#### (1) 高圧凍結

凍結後、キャリアから試料を取り出し易くするために、キャリアの片方を 0.3% レシチンでコートしておく。サンプルキャリアのポケットの深さは 0.2~0.6 mm, 直径 1.4~2.0 mm なので、それ以下の大きさに目的の試料を切り出す。試料を 2 個のサンプルキャリアで挟み込む。ポケット内に空間があると上手く凍結できないので、隙間を 0.5% 寒天やヘキサデシリンで埋める。凍結ホルダーにキャリアをセットして、凍結室へ差し込む。スタートボタンを押すと凍結の過程は自動的に行われる。液体窒素が試料加圧凍結室に流れ込むと 0.5 秒で凍結は終了するので、素早くホルダーを凍結室から抜き取り、サンプルキャリアを取り外して、液体窒素液中に保存する。キャリアを開き、試料があることを確認する (林・西村 2005)。

#### (2) 凍結置換、包埋

細胞内の形態を観察するためには、2% オスミウムを含むアセトン (あるいはエタノール) 置換液 ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) に試料が付着したままのキャリアを入れる。免疫電子顕微鏡用の試料作りには、オスミウムを使わずアセトンだけで置換する。 $-80^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫で 2 晩、凍結置換を行い、その後、10 時間掛けて、徐々に  $-20^{\circ}\text{C}$  まで温度を上げる。 $-20^{\circ}\text{C}$  になったらキャリアから試料をはずす。試料溶液の中から、キャリアをすべて取り出せたら、 $-20^{\circ}\text{C}$  のアセトンで洗う (30 分ごと 2 回)。その後、一度、有機溶媒の浸透を良くするためにメタノールに置換し、30 分間  $30^{\circ}\text{C}$  で処理した後、再び溶液をアセトンへ戻す。



第 1 図 Bal-Tec, HPM010S 型の構造 (日立カタログ図改変)。

形態観察のためにオスミウム固定を行ったサンプルは、しっかりと固定が行われているので、ここからの作業は室温でおこない、エポキシ樹脂などに置換包埋する。免疫電子顕微鏡解析のための試料作りには、この後の作業も $-20^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫内で行い、DMFA（ジメチルホルムアミド）を中継溶剤として用いて、低温で重合する Lowicryl Resin や LR White などの樹脂に置換し、 $-20^{\circ}\text{C}$ の冷蔵庫内で紫外線を照射して重合させる。

### (3) 薄切と電子染色

トリミングや薄切の方法は、化学固定の場合と同じである。Lowicryl Resin や LR White などは、エポキシ樹脂より水和性が高いので、切片がボートに浮かばずにナイフ面にへばりつく傾向があるが、少し厚目の切片にして、試料面から水分を頻繁に拭き取ることで解決する。電子染色は、化学固定の場合と同じく、通常、鉛とウランウムによる二重染色を行う。免疫電子顕微鏡処理した切片に関しては、汚れを最小限にするためにウランウムだけで染色する場合もある。

これまでに何度か、いくら電子染色をおこなってもコントラストの全くあがらない試料に遭遇した。この場合、脱水時のメタノール処理の温度や時間を変えることで、解決できると考えられる。

### 3. 凍結領域と細胞内オルガネラの様子

シロイヌナズナの子葉を高圧凍結した結果、キャリアーの接触面から、 $20\text{ }\mu\text{m}$  ぐらいまではきわめて良好な凍結状態であり、オルガネラの瞬間的な動きや微細構造の観察が植物の組織を材料にしても十分行なうことができる（林 2002）。また、凍結面から  $50\text{ }\mu\text{m}$  内部の細胞（第2図）においても、ほどほどの凍結像が観察されているので、微細

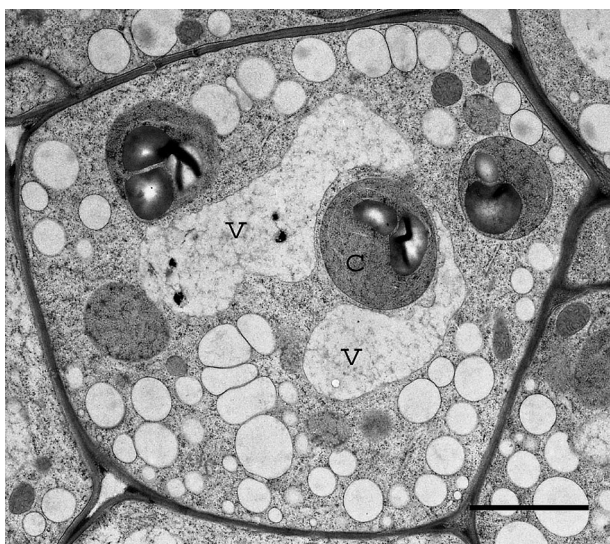
構造にはそれほどこだわらず、タンパク質の局在を知るための免疫電子顕微鏡解析用試料として考えると、試料の両側からの凍結固定をおこなうことで約  $100\text{ }\mu\text{m}$  までの厚さの試料への応用が可能であると思われる。

詳細に観察してみると、細胞質のリボソームはもとより、ミトコンドリアや葉緑体内部のオルガネラ内リボソームも明瞭に観察できる。ゴルジ体シスターネの脂質二重層も明瞭に認められる。また、化学固定法での液胞は、脱水作業の過程で内部の物質がほとんど流失してしまい電子密度を持たない白い領域として観察されることが通常であるが、高圧凍結法によって作成した試料では、水分に溶けているはずの液胞内部の物質もきちっと保持されている場合が多い（第2図）。細胞壁直下を切った試料では、植物細胞の表層微小管が規則正しく配向していることが確認できる。このことから、凍結時の高圧状態による微小管の脱重合は起こらないと考えられる。ただし、葉緑体の電子密度に関しては、どうしても逆転してしまう結果となり、今後も固定法の改良が必要だと思われる。

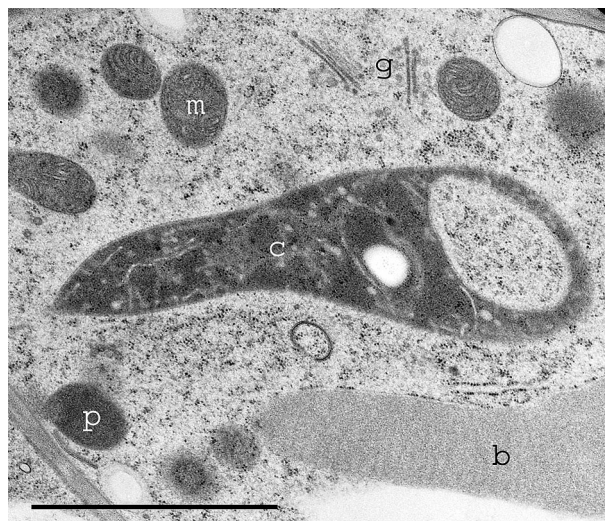
### 4. 凍結固定法の成果

凍結固定法の良さを理解してもらうために、高圧凍結法による試料を用いることによって我々が得られた研究結果について簡単に説明する。

一つ目は、シロイヌナズナの表皮細胞に特異的に存在する ER-body の発見である。化学固定によって作製した試料では、大きさは通常のペルオキシソームに比べてかなり巨大ではあったが、電子密度等からペルオキシソームだと判断していた構造体があった。しかし、凍結固定法による試料では、ペルオキシソームとは全く異なる電子密度を示し、また内容物は縞模様となって観察された（第3図）。また、外膜にリボソームが付着していることから、小胞体由来の



第2図 キャリアー接触面から約  $50\text{ }\mu\text{m}$  の深さのシロイヌナズナ子葉葉肉細胞の電子顕微鏡写真。v: 液胞, c: 色素体, バー:  $2\text{ }\mu\text{m}$ 。



第3図 高圧凍結法によるシロイヌナズナ子葉表皮細胞内のさまざまなオルガネラ像。m: ミトコンドリア, p: ペルオキシソーム, c: 色素体, b: ER-body, g: ゴルジ体, バー:  $2\text{ }\mu\text{m}$ 。



構造体であることが明らかとなった (Hayashi ら 2001). この観察結果から始まった ER-body の研究は、大きく発展し、ストレスに関わるジャスモン酸によって本葉でも形成が誘導されることや、主な内容物が PYK10 であることなどが明らかとなっている (Matsushima ら 2003).

その他の研究成果としては、もともと細胞の中に微量にしか存在していないような膜タンパク質の局在検出が挙げられる。化学固定法で作成した試料では、オルガネラ内部での局在同定までは無理だと考えられていた acyl-CoA 合成酵素や、おそらく ATP/ADP キャリアータンパク質と思われる分子がペルオキシソームの膜上に存在することを明らかにした (Fukao ら 2001, Hayashi ら 2002). また、小胞体から液胞へのタンパク質輸送経路の研究からは、液胞膜上の新奇のタンパク質が、液胞の前駆体タンパク質を運ぶ特殊な小胞 (PAC 小胞) によって運ばれていること、その小胞の膜上には液胞タンパク質輸送受容体 PV72 が存在することなどを明らかにした (Mitsuhashi ら 2001, Shimada ら 2002).

## 5. おわりに

このように、Bal-Tec, HPM010S 型の使用によって、植物の組織細胞においても、凍結法による電子顕微鏡の試料作成が可能となっている。特に、免疫電子顕微鏡解析においては、優れた試料作成法である。細胞内微細構造解析についても、いままでの化学固定法では見分けられなかったような細胞内構造体の微妙な電子密度の違いが判別可能となるので、いままでは区別・同定されていなかった構造体がこれからも発見される可能性が高い。そのためにはまず、さまざまな細胞内構造体の化学固定像と凍結固定像の比較・再整理が必要となるのではないかとと思われる。

## 引用文献

- Fukao, Y., Y. Hayashi, S. Mano, M. Hayashi and M. Nishimura 2001. Developmental Analysis of a putative ATP/ADP carrier protein localized on glyoxysomal membranes during the peroxisome transition in pumpkin cotyledons. *Plant Cell Physiol.* 42 : 835–841.
- Hayashi, H., L. De Bellis, A. Kato, Y. Hayashi, K. Nito, M. Hayashi, I. Hara-Nishimura and M. Nishimura 2002. Molecular characterization of an *Arabidopsis* acyl-CoA synthetase localized on glyoxysomal membranes. *Plant Physiology* 130 : 2019–2026.
- 林八寿子 2002. 高圧凍結および凍結置換法によるシロイヌナズナ子葉の電子顕微鏡像. 西村幹夫編集. 植物細胞. 朝倉書店. 口絵写真.
- 林八寿子・西村幹夫 2005. モデル植物の実験プロトコール. 5-3 免疫電子顕微鏡法, 秀潤社. 211–216.
- Hayashi, Y., K. Yamada, T. Shimada, R. Matsushima, N.K. Nishizawa, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura 2001. A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cell of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 42 : 894–899.
- Matsushima, R., Y. Hayashi, K. Yamada, T. Shimada, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura 2003. The ER body, A novel endoplasmic reticulum-derived structure in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 44 : 661–666.
- Mitsuhashi N., Y. Hayashi, Y. Koumoto, T. Shimada, T. Fukasawa-Akada, M. Nishimura, I. Hara-Nishimura 2001. A novel membrane protein of protein bodies that is transported to protein-storage vacuoles via precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell*, 13 : 2361–72.
- Moor, H., G. Bellin, C. Sandri, K. Akert 1980. The influence of high pressure freezing on mammalian nerve tissue. *Cell Tissue Res.* 209 : 201–216.
- Riehele, U. 1968. Fast freezing of organic specimens for electron microscopy. *Chem. Ing. Tec.* 40 : 213.
- Shimada, T., E. Watanabe, K. Tamura, Y. Hayashi, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura 2002. A vacuolar sorting receptor PV72 on the membrane of vesicles that accumulate precursors of seed storage proteins (PAC vesicles). *Plant Cell Physiol.* 43 : 1086–1095.