

化学固定と凍結固定によるトレボキシア藻 *Chlorella vulgaris* の 電子顕微鏡観察

山本真紀

専修大学商学部・自然科学研究所

Chemical fixation and freezing technique for fine structural electron microscopy in *Chlorella vulgaris*
(Chlorophyta, Trebouxiophyceae)

Maki Yamamoto

Senshu University, Kawasaki, Kanagawa, Japan

緒言

藻類細胞を電子顕微鏡で観察する際には、一般に化学固定法か凍結固定法が用いられる。化学固定法はグルタルアルデヒド、四酸化オスミウム、過マンガン酸カリウムなどの水溶液中に、ある一定時間細胞を浸すだけでできる固定法で、特別な装置を必要としない点が長所である。しかし、固定液が細胞内に浸透するまでに時間を要するため、アーティファクトを引き起こしやすい、ミリ秒単位での細胞内のイベントを観察するには向かない、などの欠点がある (Mersey and McCully 1978)。一方、凍結固定法は、瞬時に細胞構造を凍結するため、生きている状態により近い像を得ることができる。しかし、6～7割を占める細胞内の水分が氷晶を形成すると細胞構造を破壊してしまうため、氷晶形成をどのように妨げるという課題が常につきまとう (Galway et al. 1995、鈴木 2005、林 2007)。急速凍結固定はこの課題をスピードで解決しようとする手法である。常圧下で氷晶が成長するよりも速いスピード、すなわち、10,000℃/秒で細胞を冷却することができれば、氷晶のサイズは10-15nm以下に抑えられるため、電子顕微鏡下での観察に影響がない (Dubochet et al. 1988、村田 2001)。藻類細胞の急速凍結固定は主に液体プロパンに試料を投入する方法が採用されているが、この場合、良好な硝子様凍結状態の領域は表層からおおよそ10 μm程度である。加圧凍結固定は、圧力をかけることで氷晶形成を遅らせようとする手法である。2,100barの圧力下で凍結することにより、100-500℃/秒程度のスピードで凍結された範囲まで良好な硝子様凍結状態の領域が広まる (Studer et al. 1989、村田 2001)。したがって、陸上植物や多細胞性の藻類を電子顕微鏡で観察する際には、加圧凍結装置を使用することができる研究環境においては、加圧凍結固定をまずは試すことになるだろう。実際、1990年代以降、多数の植物細胞の加圧凍結が試みられてきた (Kiss et al. 1990、Stahelin et al. 1990、Kaneko and Keegstra 1996、Davidson and Newcomb 2000)。

一方、単細胞性の微細藻類の場合には、細胞のサイズが $10\ \mu\text{m}$ よりも小さければ、急速凍結の適用範囲となる。また、加圧凍結を行うことも可能である。そこで、このような微細な藻類を電子顕微鏡で観察する場合、化学固定、急速凍結、加圧凍結の像にはどのような違いがあるか、それぞれの特徴を比較観察することを本研究の目的とした。観察対象にはトレボキシア藻綱に属する単細胞微細緑藻 *Chlorella vulgaris* を用いた。

材料と方法

C. vulgaris の培養

C. vulgaris IAM C-536は東京大学分子細胞生物学研究所IAMコレクションから入手した。培地にはTAP培地 (Sugiyama et al. 1998) を用い、連続明期 ($15\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) 23°C で培養した。

グルタルール・オスミウム二重化学固定

培養した細胞を3,300g、1分間の遠心で回収し、2.5%グルタルールアルデヒド含有0.0025Mリン酸緩衝液で2時間前固定した。0.0025Mリン酸緩衝液で20分ずつ3回洗浄した後、1%四酸化オスミウム含有0.0025Mリン酸緩衝液で2時間後固定した。0.0025Mリン酸緩衝液で20分ずつ3回洗浄した後、エタノールシリーズ(50%、70%、80%、90%、95%)で20分ずつ脱水し、無水エタノールに置換した。さらに、無水エタノール:ドライアセトン=1:1に20分置換した後、20分ずつ3回、ドライアセトンで洗浄した。

グルタルール・過マンガン酸二重化学固定

培養した細胞を3,300g、1分間の遠心で回収し、2.5%グルタルールアルデヒド含有0.0025Mリン酸緩衝液で2時間前固定した。0.0025Mリン酸緩衝液で20分ずつ3回洗浄した後、2%過マンガン酸カリウム水溶液で2時間後固定した。蒸留水で20分ずつ3回洗浄した後、エタノールシリーズ(50%、70%、80%、90%、95%)で20分ずつ脱水し、無水エタノールに置換した。さらに、無水エタノール:ドライアセトン=1:1に20分置換した後、20分ずつ3回、ドライアセトンで洗浄した。

急速凍結固定

急速凍結の方法はBaba and Osumi(1987)に従った。ただし、置換液はオスミウム含有アセトンからグルタルールアルデヒド含有アセトンに変更した。培養した細胞をまず3300g、1分間の遠心で回収し、急速凍結装置 (Leica EM CPC、Leica Mikrosystems) を用いて、液体プロパンで急速凍結した。凍結したサンプルは2.5%グルタルールアルデヒド含有ドライアセトン溶液に移し、 -80°C で108時間インキュベートした。その後、徐々に -80°C から 0°C へと5時間かけて上昇させ、 0°C の状態を1時間保った後に、さらに 0°C から 23°C へと1時間かけて上昇させ、 23°C で1時間インキュベートした。サンプルをドライアセトンで20分ずつ3回洗浄し、2%四酸化オスミウム含有ドライアセトン溶液で 40°C 4時間の後固定を行った。その後、ドライアセトンで20分ずつ3回洗浄した。

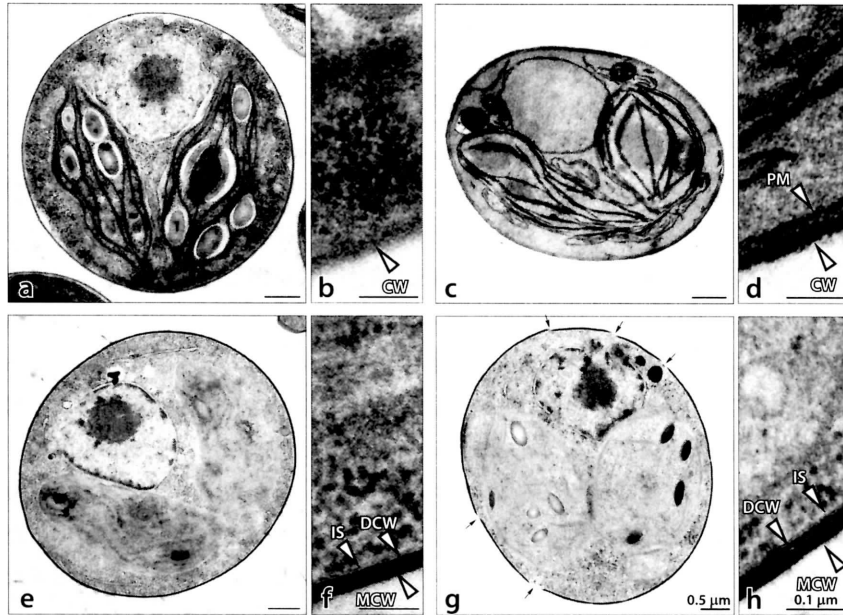


図1 *Chlorella vulgaris* の化学固定像と凍結固定像

a, bはグルタルール・オスmium二重固定像、c, dは過マンガン酸・オスmium二重固定像、e, fは急速凍結固定像、g, hは加圧凍結固定像。PMは細胞膜、ISは細胞膜の脂質二重層の内側、CWは細胞壁、DCWは娘細胞壁、MCWは母細胞壁を示す。

加圧凍結固定

培養した細胞を3300g、1分間の遠心で回収し、2枚のキャリアーに挟み込み、加圧凍結装置(HPM010、BAL-TEC)を用いて加圧凍結した。凍結したサンプルは2.5%グルタルアルデヒド含有ドライアセトン溶液に移し、 -80°C で108時間インキュベートした。その後、徐々に -80°C から 0°C へと5時間かけて上昇させ、 0°C の状態を1時間保った後に、さらに 0°C から 23°C へと1時間かけて上昇させ、 23°C で1時間インキュベートした。サンプルをドライアセトンで20分ずつ3回洗浄し、2%四酸化オスmium含有ドライアセトン溶液で 40°C 4時間の後固定を行った。その後、ドライアセトンで20分ずつ3回洗浄した。

樹脂包埋・超薄切片作成・透過型電子顕微鏡観察

グルタルール・オスmium二重化学固定、グルタルール・過マンガン酸二重化学固定、急速凍結置換、加圧凍結置換を行ったサンプルを1%スパー樹脂(Spurr 1969)含有ドライアセトン溶液に置換した。スパー樹脂の濃度を2、4、6、8、12.5、25、50、75%と数時間おきに上昇させ、最後には100%スパー樹脂に置換し、重合した。超薄切片($0.06\text{--}0.07\mu\text{m}$)はダイヤモンドナイフを用いてウルトラミクロトーム(Leica Ultracut UCT、Leica Mikrosystems)で作製し、フォルムバルでコートした銅グリッドに載せた。その後、切片は3%酢酸ウランで室温2時間、クエン酸鉛で10分間電子染色し、蒸留水で洗浄後、透過型電子顕微鏡(H-7600、Hitachi Co.、Tokyo, Japan)100kVで観察した。

結 果

いずれの固定法においても、*Chlorella vulgaris*の細胞内の核、葉緑体、ミトコンドリア、小胞体、液胞などの細胞小器官が観察できた(図1)。しかし、その像はそれぞれに特徴が見られた。グルタルール・オスミウム二重固定は細胞膜、チラコイド膜などがポジティブに観察されたが、いずれも波打っていた(図1a, b)。グルタルール・過マンガン酸二重固定は細胞膜に加え、葉緑体、チラコイド膜、ミトコンドリア、小胞体などの膜系の小器官が最も明瞭に観察されたが、脂質二重層は二層ではなく、一層に観察された。またリボソームが観察されなかった(図1c, d)。急速凍結固定は、化学固定に比べて、細胞内内容物の密度が高く、細胞小器官が丸みを帯びていた。また、細胞膜は波打っておらず、細胞膜の脂質二重層の内側と外側の層が観察できた。内側の層に比べて外側の層が厚く電子密度も高く観察された。凍結置換の際にオスミウム含有アセトンを置換液に用いると、チラコイド膜や核膜、小胞体膜などの膜系がネガティブに観察される傾向があった(data not shown)。そこで、置換液をグルタルールアルデヒド含有アセトンに替え、オスミウム含有アセトンの後固定の過程を追加したところ、チラコイド膜がポジティブに観察できるようになった(図1e, f)。しかし、核膜と小胞体膜はネガティブなままであった。加圧凍結固定の場合、細胞内内容物の密度は急速凍結固定と同等であったが、細胞壁に裂け目が生じ、ダメージを受けている様子が観察された(図1g矢印)。細胞膜の脂質二重層は急速凍結固定と同様に観察された(図1h)。

考 察

*Chlorella vulgaris*はクロレラ属のタイプ種であり、1995年にFriedlがトレボキシア藻綱を提唱するよりも以前から、電子顕微鏡観察の対象となってきた(e.g. Brandes and Elston 1956, Codd et al. 1973)。しかし、当時の観察は古典的な化学固定法によるものだった。本研究で観察した凍結固定像からは、化学固定より詳細な細胞内微細構造を観察することができた。急速凍結固定、加圧凍結固定のいずれでも、細胞膜の脂質二重層の内側に比べて外側の層は厚く電子密度が高かった。これは、細胞膜表面上で娘細胞壁が新生されているためと考えられる(Yamamoto et al. 2004)。このような像は化学固定では得られないものである。

一方、急速凍結固定と加圧凍結固定を比較した場合、微細な藻類は加圧凍結時の2,100barに対して無傷ではいられないことも示唆された。多細胞性の陸上植物と違って、急速凍結固定の適用範囲内である微細藻類を観察するには、急速凍結固定がより望ましいといえる。

謝 辞

本研究は、文部科学省科学研究費助成事業(若手研究B、課題番号22770059)の支援を受けて実施された。化学固定と凍結固定、樹脂包埋、超薄切片作成、電子顕微鏡観察は河野重行先生(東京大学)、平田愛子先生(東京大学)のご指導の下、東京大学大学院新領域創成科学研究科植物生存システム研究室で実施した。ここに謝意を表す。

参考文献

- Baba M, Osumi M (1987) Transmission and scanning electron microscopic examination of intracellular organelles in freeze-substituted *Kloeckera* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. *J. Electron Microsc.* 5: 249-261.
- Brandes D, Elston RN (1956) An electron microscopical study of the histochemical localization of alkaline phosphatase in the cell wall of *Chlorella vulgaris*. *Nature* 177 274-275.
- Codd GA, Schmid GH, Kowallik W (1973) Further enzymatic studies and electron microscopy of the microbodies of a mutant of *Chlorella vulgaris*. *Arch. Mikrobiol.* 92: 21-38.
- Davidson AL, Newcomb W (2000) Novel ultrastructural observations of pea (*Pisum sativum*) root nodule cells by high-pressure freezing and propane-jet freezing techniques. 213: 55-66.
- Dubochet J, Adrian M, Chang JJ, Homo JC, Lepault J, McDowell AW, Schultz P (1988) Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys* 21: 129-228.
- Galway ME, Heckman Jr JW, Hyde GJ, Fowke LC (1995) Advances in high-pressure and plunge-freeze fixation. *Methods Cell Biol.* 49: 3-19.
- 林八寿子 (2007) 高圧凍結および凍結置換法による電子顕微鏡試料作成. *日作紀* 76: 128-130.
- Kaneko Y, Keegstra K (1996) Plastid biogenesis in embryonic pea leaf cells during early germination. 195: 59-67.
- Kiss JZ, Giddings Jr TH, Staehelin LA, Sack FD (1990) Comparison of the ultrastructure of conventionally fixed and high pressure frozen/freeze substituted root tips of *Nicotiana* and *Arabidopsis*. 157: 64-74.
- Mersey B, McCully ME (1978) Monitoring of the course of fixation of plant cells. *J. Microsc.* 114: 49-76.
- 村田長芳 (2001) 高圧凍結：過去、現在、未来. *電子顕微鏡* 36: 95-98.
- Spurr AR (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26: 31-42.
- Staehelin LA, Giddings Jr TH, Kiss JZ, Sack FD (1990) Macromolecular differentiation of Golgi stacks in root tips of *Arabidopsis* and *Nicotiana* seedlings as visualized in high pressure frozen and freeze-substituted samples. *Protoplasma* 157: 75-91.
- Studer D, Michel M, Müller M (1989) High pressure freezing comes of age. *Scanning Microsc. Suppl.* 3: 253-269.
- Sugiyama J, Yokota A, Unami E, Onodera Y, Nishida H, Miura Y, Isobe M, Kasahara Y, Sakamoto K (1998) IAM catalogue of strains, 2nd edn. Center for Cellular and Molecular Research, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, pp291-294.
- 鈴木克己 (2005) 急速凍結固定—凍結置換法. *日作紀* 74: 374-375.
- Yamamoto M, Fujishita M, Hirata A, Kawano S (2004) Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *J. Plant Res.* 117: 257-264.