

# 低温・低真空走査電子顕微鏡 (SEM) を活用した植物組織・細胞の 生きている状態に近い微細構造と機能の解明

プロジェクト代表者：金子 康子 (教育学部・教授)

分担者：西田 生郎 (理工研・教授)

竹澤 大輔 (理工研・准教授)

## 1 研究の目的

低温・低真空 SEM により、生きている状態に極めて近い植物細胞微細構造と細胞内外の物質局在を同時に可視化する方法を確立し、新たな研究領域の開拓を目的とする。様々な蛍光標識の開発により、光学顕微鏡レベルでは生きている細胞内の構造と分子の挙動を追跡することが可能となった。しかし、光顕に比べて遥かに高い分解能が期待できる電子顕微鏡では、化学固定、樹脂包埋等による試料作製法が一般的で、生きている状態に近い微細構造や物質の局在を観察することはいまだ困難である。本学の科学分析支援センターに導入された低温・低真空 SEM (S-3400N、AULTO1000) を活用し、急速凍結した植物組織・細胞の三次元高分解能観察と同時に元素分析を行い、多様な植物の生理機能を生きている状態に近い細胞構造と物質局在から追究することを目指す。

## 2 シロイヌナズナ根の表皮細胞

モデル植物として多様な研究に用いられているシロイヌナズナ芽生えの根表皮細胞の観察を試みた。極めて細く乾燥しやすい試料であるため、試料調整の過程で試行錯誤を要した。図 1a-d は急速凍結後、試料をクライオステージに装着し、適度に水分を昇華させた後、低真空モードで反射電子像を観察したものである。微細な根毛を含む表皮細胞の形状が保たれ、加速電圧を変えることにより、細胞内表層部の微細構造を観察することができた。細胞内構造の見え方は加速電圧によって変化した。

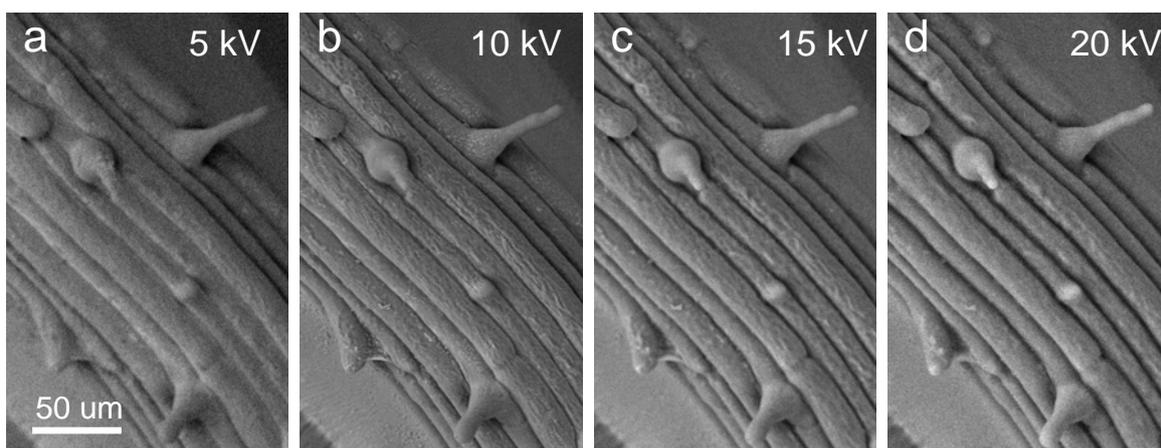


図 1

## 3 ヒメツリガネゴケ原系体の観察

コケ植物のモデルとして研究に用いられるヒメツリガネゴケの原系体を同様に観察した。急速凍結後クライオ試料ステージに装着し、適度に水分を昇華させた後、低真空・反射電子像観察を行った (図 2a-d)。低加速電圧 (5 kV) では細胞の表面形状が観察でき (図 2a)、加速電圧を上げていくと 15 kV では、細胞内の葉緑体を鮮明に観察することができた (図 2c)。加速電圧によって同じ視野でも画像化される構造が異なった。加速電圧が高いほど、より細胞内部の情報を反映していると考えられる。

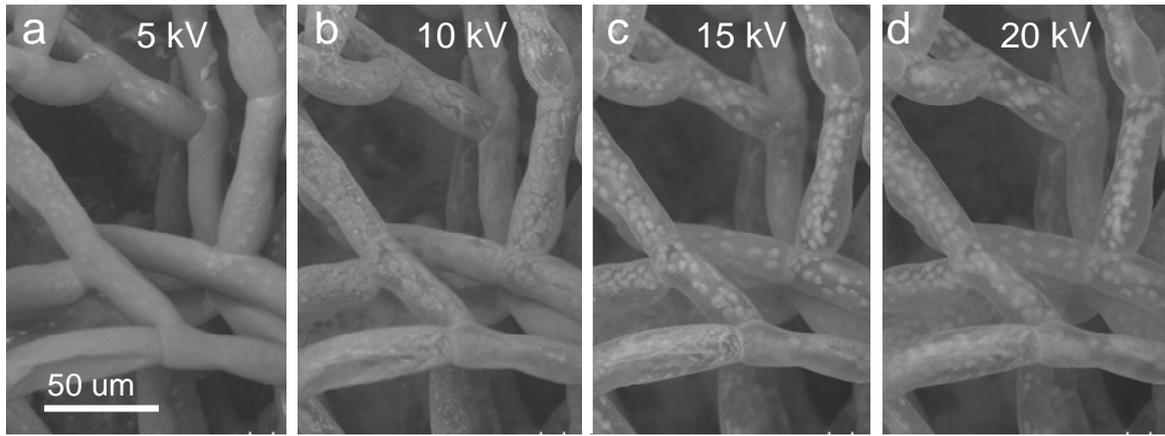


図 2

#### 4 ムジナモ捕虫葉消化腺毛の観察

ムジナモは稀少な水生食虫植物で、2枚貝様の捕虫葉で獲物を挟み込むように捕えると、捕虫葉上の消化腺毛から消化酵素を分泌する。ムジナモ捕虫葉を切り出して急速凍結後、捕虫葉上の消化腺毛を低温・低真空 SEM で観察した。図 3a は、細胞内の水分を昇華させる前の消化腺毛の反射電子像で、細胞内の構造を識別することはできなかった。図 3b は細胞内の水分を適度に昇華させた後、3a と同じ加速電圧 15 kV で観察したものである。細胞内の微細な構造を観察することができた。図 3c は加速電圧 10 kV で観察したもので、3b とは細胞内構造の見え方が異なった。

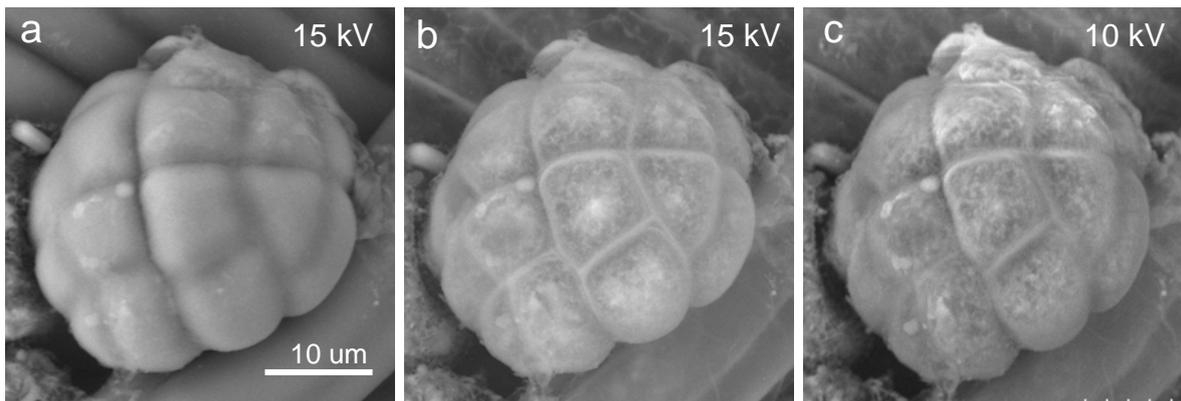


図 3

#### 5 細胞内構造の同定と元素分析の試み

急速凍結後、低温・低真空 SEM 内のクライオステージ上で細胞内水分を適度に昇華させた後、反射電子像として観察することができる微細構造を同定するために、蛍光標識試料の光顕観察や、超薄切片の透過電子顕微鏡 (TEM) 観察を進めている。また、低温・低真空 SEM 内で試料の凍結状態を保ったまま、微細構造観察と同時に元素分析を行う試みも開始し、予備的な結果を得ることができた。

#### 6 まとめと今後の課題

低温・低真空 SEM により、急速凍結しただけの植物組織・細胞の生きている状態に近い微細構造を、煩雑な操作を経ることなく観察することができた。細胞内の水分を適度に昇華させた後、加速電圧を変化させることにより、細胞表面から細胞内部まで、表面からの深度が異なる構造の情報が得られていると考えられるが、この点については、対応する試料の超薄切片 TEM 観察により、さらに詳細な検討を行いたい。また、急速凍結した試料は物質局在も保っているため、元素分析を組み合わせることにより、生きている状態に近い構造と物質局在をもとに新しい細胞像の構築をめざしたい。