

先端電子顕微鏡を活用した生きている状態に近い細胞微細構造と物質局在の 三次元イメージングによる細胞構造機能研究の新展開

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）

森安 裕二（理工研・教授）

竹澤 大輔（理工研・准教授）

1 研究の目的

元素分析装置を備えた低温・低真空走査電子顕微鏡（SEM）により、生きている状態に近い植物細胞微細構造を観察すると共に細胞内外の元素分布を画像化する方法を確立すること、さらに、電子顕微鏡画像の3次元立体構築化により微細構造間の正確な位置関係と相互の関わりを把握することを通して、植物細胞の機能を解明する新たな研究領域を開拓することを目指す。適切に急速凍結した植物試料では、細胞内の物質をすべて元の位置に保持したまま微細構造観察が可能となる。本学科学分析支援センターの分析・低温・低真空 SEM を活用し、急速凍結した植物組織・細胞の生きている状態に近い微細構造と元素の分布を画像化するための新たな方法を検討した。また、様々な植物の生理現象の仕組みを先端電子顕微鏡の活用により微細構造観察から解明することを試みた。

2 低温・低真空 SEM による植物凍結試料の観察と元素分析

様々な植物組織・細胞をスラッシュ室中で急速凍結したのち、クライオトランスファー（ALTO1000）を用いて SEM 鏡体内（S-3400N）に運び、凍結状態を維持したまま切断後、温度コントロールが可能な試料ステージに固定した。高真空モードで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。コケ植物の原糸体、タバコ培養細胞、シロイヌナズナ根、水生食虫植物ムジナモ捕虫葉など、様々な植物組織・細胞の構造を、霜の付着や帯電現象に煩わされることなく、長時間にわたって観察を続けることができた。また、観察時に加速電圧を変化させることにより、試料表面から深さの異なる情報を得られることが分かった。たとえばマンネンロウ（ローズマリー）葉の柵状組織細胞の場合、加速電圧 5 kV では、細胞表面を覆う細胞壁の形状が詳細に観察できた。一方加速電圧 15 kV では、細胞膜の内側に並ぶ葉緑体の形状を観察することができた。中間の 10 kV では、細胞壁に加えて、その内側に存在する葉緑体を同時に見ることができた。高加速電圧では、電子線が試料の深部まで透過し、そこから得られる情報を画像化するためであると考えられる。

急速凍結した組織細胞は、細胞内の物質を元の位置に保持しているため、元素分析により多くの情報を得られることが期待できる。低温・低真空 SEM で構造を観察した後、付属のエネルギー分散型 X 線分析装置（Bruker）で元素分析を試みたところ、いくつかの元素でマッピングを行うことができた。図 1 にマ

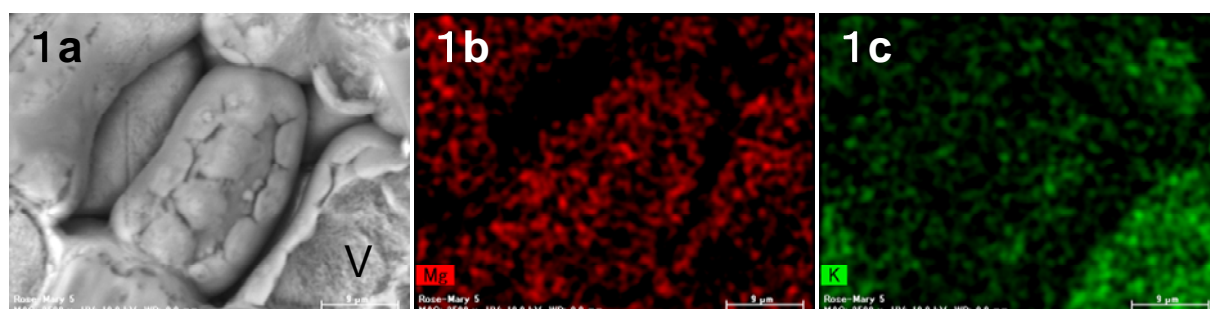


図 1 マンネンロウ葉柵状組織細胞の元素分析 (a) 反射電子像、(b) Mg マッピング (c) K マッピング

ンネンロウ葉の柵状組織細胞の反射電子像 (1a) と元素マッピングの結果 (1b, c) を示す。マグネシウムの分布は葉緑体位置と重なる傾向がみられ(1b)、カリウムは液胞に局在すること(1c)がわかった。元素分析の際にも、反射電子像と同様に加速電圧を変えることによって試料表面から深度の異なる部位からの情報が得られることを示す結果を得ており、今後、さらに詳細に検討していきたい。

同様の方法で次の観察を行った。1) タバコ培養細胞オートファジー過程における、生きている状態に近い微細構造観察と細胞内元素のマッピングを試み、予備的な結果を得た (図2)。2) 水生食虫植物ムジナモ捕虫葉上の消化腺毛や吸収毛などの生きている状態に近い微細構造を観察し、消化酵素の分泌に伴う特定元素の追跡を試みた。3) 異なる生理条件下におけるゼニゴケ無性芽の発生過程の観察を試みた。

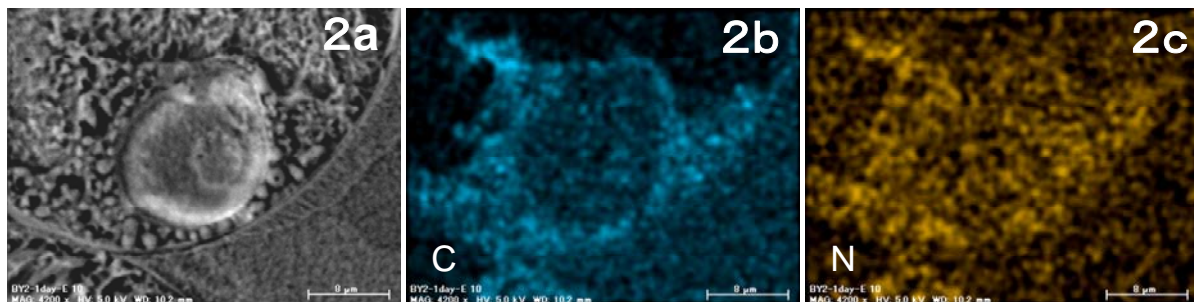


図2 タバコ培養細胞の元素分析 (a) 反射電子像 (b) C マッピング (c) N マッピング

3 植物細胞微細構造観察による細胞機能の解明

シロイヌナズナ変異体を用いて、植物の機能変化に関与する細胞内微細構造を電子顕微鏡観察により明らかにすることを試み、次の結果を得た。1) シロイヌナズナ種子サンプルの貯蔵タンパク質レベルを、ウルトラミクロトーム切片の染色で観察する方法を確立した。2) *pss1* 変異株の花粉異常の原因を探るために、花粉の電子顕微鏡観察を行った (論文準備中)。3) *cct1 cct2* 変異株の根では、低温特異的に根の伸長が止まるが、このときある種の脂質が蓄積することを明らかにした。今後さらに、200 kV 分析電子顕微鏡 STEM トモグラフィーを行い、細胞内微細構造の3次元立体構築を行うことにより、細胞内構造相互の関係をより正確に把握することをめざしたい。

4 まとめと今後の課題

科学分析支援センターの分析・低温・低真空 SEM を用いることにより、急速凍結した様々な植物組織・細胞の生きている状態に近い微細構造を、長時間安定した状態で観察することができた。また加速電圧を変化させることにより、試料表面から深さの異なる構造を画像化できること、さらに、急速凍結試料内に局在する元素のマッピングも同時に行うことができる方法を示した。この観察法はいろいろな植物組織・細胞に適用することが可能であり、今後この方法をさらに発展させていくことにより、植物細胞の生きている状態に近い微細構造と物質局在の画像化を通して、植物細胞の多様な生命現象を、新たな切り口から解析することが可能となるだろう。

先端生物電子顕微鏡法を用いた細胞構造機能解析を、機能変化の明らかな変異株や、制御可能な培養細胞を用いた生理・生化学的研究や、蛍光標識を用いた光学顕微鏡観察法などと組み合わせることにより、植物細胞の構造と機能を統合的に理解し、新たな細胞像を構築することを目指したい。

5 謝辞

低温・低真空 SEM の使用と元素分析に際しては科学分析支援センターの徳永 誠 技師に大変お世話になりました。