

## 低温・低真空走査電子顕微鏡による植物組織・細胞の観察

### Observation of plant tissues and cells by low temperature/low vacuum SEM

教育学部生物学研究室 金子 康子

Biology Section in the Faculty of Education

Yasuko KANEKO

#### Abstract

Novel three dimensional images were obtained from rapidly frozen plant tissues and cells with a combination of the Alto 1000 cryo system and a low vacuum scanning electron microscope (Hitachi S-3400N). Segments of plant tissue were frozen in slush nitrogen and set in the cryo system. The sample was then fractured with a cooled knife and placed onto the specimen stage in the SEM. After appropriately subliming ice, a back scattered electron (BSE) image was obtained in low vacuum mode. While the fine structure of the cell surface could be observed with an accelerating voltage of 5 kV, intracellular ultrastructure was clearly visible through the cell wall at an accelerating voltage of 15 kV. The method allows the study of internal ultrastructure of plant cells and function close to the living state without lengthy specimen preparation process.

低温・低真空走査電子顕微鏡が平成 21 年度に科学分析支援センターに導入された。これは、汎用のナチュラル SEM (Hitachi S-3400N) に新開発の簡易型クライオシステム (Alto 1000) を装着し、凍結生物試料の長時間におよぶ観察を可能にした装置である。この装置を活用して、主に植物試料を対象に、どのような観察を行うことができるのか、現状と今後の可能性について紹介したい。走査電子顕微鏡は、数十倍程度の低倍像から数万倍にいたる高倍像まで幅広い倍率で、焦点深度の深い立体的なイメージを得ることができることから、様々な生物試料表面の微細構造観察に用いられてきた。走査電子顕微鏡で観察するために、水分を含む生物試料では通常、化学固定の後、脱水、乾燥、金属コーティングという煩雑な試料作製過程を経ることが多かった。しかし、特に植物組織では、短時間の観察であれば生の試料を切り出して直接観察することが可能であることが示され<sup>(1)</sup>、この方法によって多様な植物の表面微細構造や形態形成過程を手軽に追跡できるようになった<sup>(2)</sup>。しかし、生試料の直接観察は観察時間が数分間に限られ、数千倍を超える高倍での観察は難しいという限界があった。

細胞を生きている状態でそのまま観察することができる光学顕微鏡とは異なり、電子顕微鏡観察においては、生きている状態にできるだけ近い試料をいかに調整するかが大きな課題である。急速凍結は生物の活動を瞬時に固定する物理的な固定であり、氷晶のない凍結状態が得られた試料では、細胞の微細構造と共に、細胞が含有するすべての物質をその場にとどめていることが期待できる<sup>(3)</sup>。低温・低真空走査電子顕微鏡は、このように良好な状態に凍結された生物試料の観察に威力を発揮する。写真は、急速凍結したマンネンロウ (ローズマリー) の葉をクライオシステム内で割断し、適度に氷を昇華させた後、低真空モード (30 Pa) で反射電子像観察を行ったものである。図 1a は低倍像で、表皮、葉肉細胞、維管束、腺毛など葉の断面の全体像を把握することができる。さらに、葉肉細胞には棒状の柵状組織細胞と、複数の突起をもつ海綿状組織細胞があり、細胞間には細胞間隙が広がっている様子などを鮮明に観察することができる。図 1b, c は表皮細胞の一部と柵状組織細胞の拡大像で、同じ視野を b は加速電圧

5kV, cは加速電圧 15 kV で観察したものである。図 1b では、切断により生じた破断した細胞壁片の形状がよくわかる。図 1c では、細胞膜の内側に沿って並ぶ、白玉のような形の葉緑体を、細胞壁を透過して観察することができた。本装置では、操作中に加速電圧を変えることは極めて容易で、次々と異なる加速電圧像を取得することができる。また、長時間にわたる観察中、観察試料はほとんど変化せず安定した状態を保っていた。

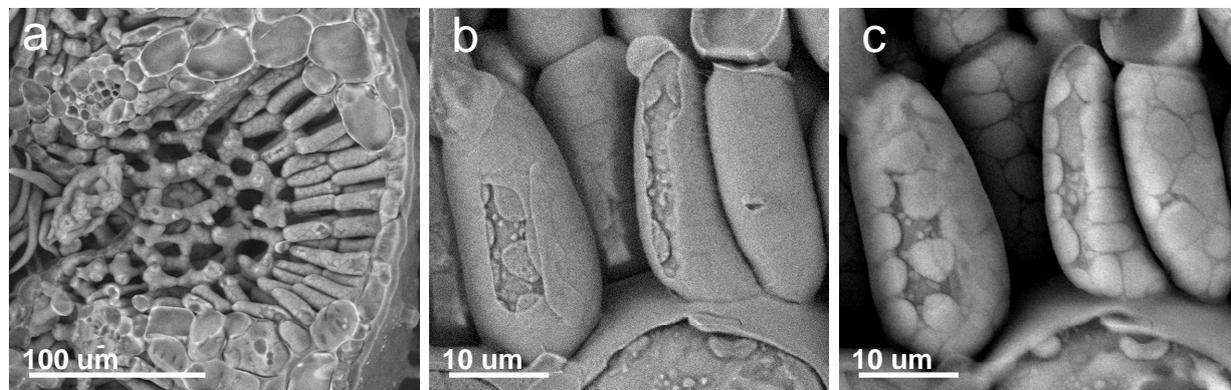


図 1

凍結生物試料観察を目指した旧来のクライオ SEM 装置では、試料表面に付着する霜や、電子線照射時の帯電が障害となり、鮮明な画像を得ることは極めて困難であった。本装置では、試料ステージの上方に、常時試料ステージより低い温度を保つアンチコンタミネーターが設置されており、観察試料表面に霜が付着することを防いでいる。また、低真空モードで観察することにより、試料表面が帯電することもない。加速電圧を変えることにより、試料表面からの深度を反映した全く異なる反射電子像(図 1b, c)が得られることは、新たな発見であった。長時間にわたる電子線照射が可能であることから、附属する EDX (エネルギー分散型 X 線分析装置) で元素分析を行うこともできる。生きている状態に近い細胞構造と物質の局在を保持している急速凍結試料の特徴を活かして、細胞の微細構造観察と同時に、元素の組成や分布を測定することにより、機能を探ることも夢ではなくなった。

## 文献

1. Kaneko, Y., Matsushima, H., Wada, M., Yamada, M. A study of living plant specimens by low-temperature scanning electron microscopy. *J. Electron Microsc. Tech.* 2: 1-6 (1985)
2. Arai, M., Saito, T., Kaneko, Y., Matsushima, H. Observation of flower bud formation by a simple direct SEM viewing method. *J. Electron Microsc.* 45: 168-170 (1996)
3. Nitta, K., Kaneko, Y. Simple plunge freezing applied to plant tissues for capturing the ultrastructure close to the living state. *J. Electron Microsc.* 53: 677-680 (2004)