

〈ミニノート〉

高圧凍結・凍結置換固定法による細胞内微細構造の観察

Ultrastructural observation of plant cells prepared by high pressure freezing and freeze substitution

理学部生体制御学科 金子 康子

Department of Regulation-Biology, KANEKO Yasuko

High pressure freezing and freeze substitution methods were applied for ultrastructural observation of pea plumule cells. Compared to conventional chemical fixation, cellular membranes were smoother without undulation, and organelles appeared more turgid. Structures which connect two membranes were observed frequently in the high pressure frozen and freeze substituted materials. The connections were seen between ER and plastid membranes, plastid and mitochondrial membranes, and inner and outer membranes of plastids.

生物の細胞を構成する細胞小器官や膜、繊維や管状構造など、微細な構造を明らかにするためには、透過電子顕微鏡による観察が欠かせない。しかし、生物試料を透過電子顕微鏡により観察するためには、通常、グルタルアルデヒドやオスミウム酸で化学固定した後、脱水・樹脂包埋を経てから超薄切片を作製する過程を必要とする。細胞内の構造は常にダイナミックに変化しており、組織・細胞内への浸透に時間のかかる化学固定法では、細胞の瞬間像を捉えることは難しく、アーテファクト導入の可能性が危惧されてきた(1)。これを避けて、より生きている細胞に近い状態で固定するために、凍結固定法が考案され、金属圧着法や液体プロパン浸漬法など、様々な試みがなされてきたことは、本誌Vol 15に解説されている(2)。ここ1、2年の間に日本国内においても用いられるようになった高圧凍結法は、生物試料の広い範囲にわたる良好な凍結像を得ることを目的として、1960年代後半にRiehleとMoorにより考案された凍結固定法である(3)。その後、試作機の改良が重ねられ、高圧凍結装置として市販されるようになった。この装置は、試料の凍結時に瞬間的に2100 barの高圧をかけることにより、氷晶の形成を防ぎ、0.6 mmくらいまでの厚さの生物試料を良好な状態で凍結することを目指したものである(3)。この方法により、植物組織を構成する細胞を凍結固定して観察することも可能となった。高圧凍結・凍結置換法を用いてエンドウ発芽時の幼芽の細胞内微細構造の観察を行った。

吸水後のエンドウ種子から、幼芽を厚さ0.2 ~ 0.4 mmになるように切り出し、アルミニウム製の試料ホルダーにはさみ、空隙に1-hexadecene (4) を満たした。試料は直ちに高圧凍結装置 (Balzers HPM 010) を用いて凍結し、2%オスミウム酸を含むアセトンで凍結置換後、樹脂包埋し、超薄切片を作製した。切片は電子染色の後、透過電子顕微鏡 (Hitachi H-700H) により観察した。

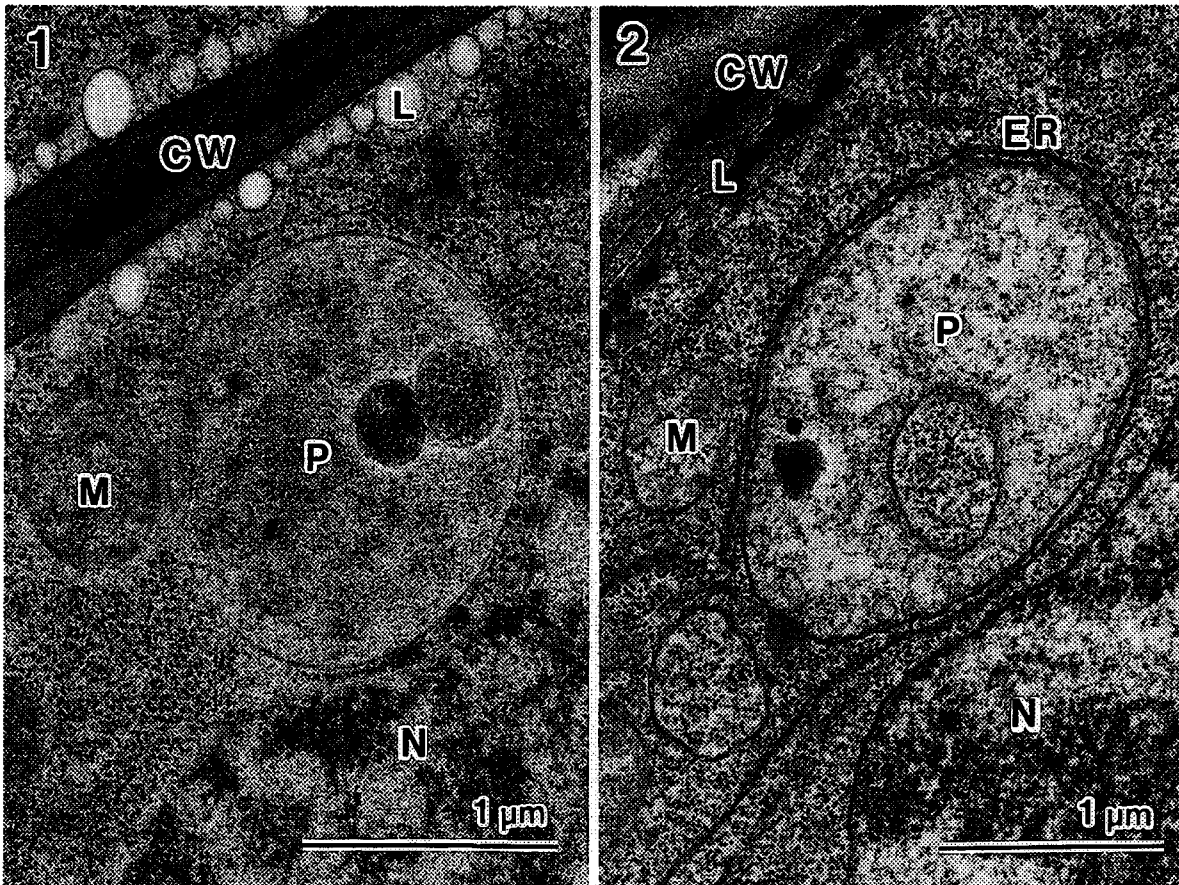


Fig 1. Portions of pea plumule cells prepared by high pressure freezing and freeze substitution(HPF-FS). CW: cell wall; L: lipid body; M: mitochondrion; N: nucleus; P: plastid.

Fig 2. Portions of pea plumule cells prepared by conventional chemical fixation(CCF). CW: cell wall; ER: endoplasmic reticulum; L: lipid body; M: mitochondrion; N: nucleus; P: plastid.

凍結固定された細胞では、細胞内小器官はなめらかな膜で囲まれており、まるまるとふくらんでいた (Fig 1)。通常の化学固定を経ると、細胞内の膜は波打っていることが多かった (Fig 2)。凍結固定では、細胞膜はなめらかで細胞壁に密着しており、小胞体、核、プラスチド、ミトコンドリアなど、どれもなめらかな膜で囲まれていた (Fig 1)。微小繊維や微小管も良く保存されていた。

さらに、隣接する2種類の膜の間に頻繁に架橋のような構造が観察された。プラスチドとプラスチドを取り囲む小胞体膜の間には、特に高頻度で架橋構造が観察された (Fig 3)。同様の架橋構造は化学固定によっても観察することができたが (Fig 4)、これまで化学固定によるアーテファクトであると指摘されてきた (A. Staehelin 私信)。しかし、同様の構造が全く原理の異なる2種類の固定法により観察されたことにより、これが単なるアーテファクトであるとは考えにくくなった。しかも凍結固定による結果、この架橋構造はより頻繁に、高密度で観察された。また、同様の架橋構造は、他にもプラスチドの内膜と外膜の間 (Fig 5)、ミトコンドリアとプラスチドの間 (Fig 6)、プラスチドと核の間にも観察できた。

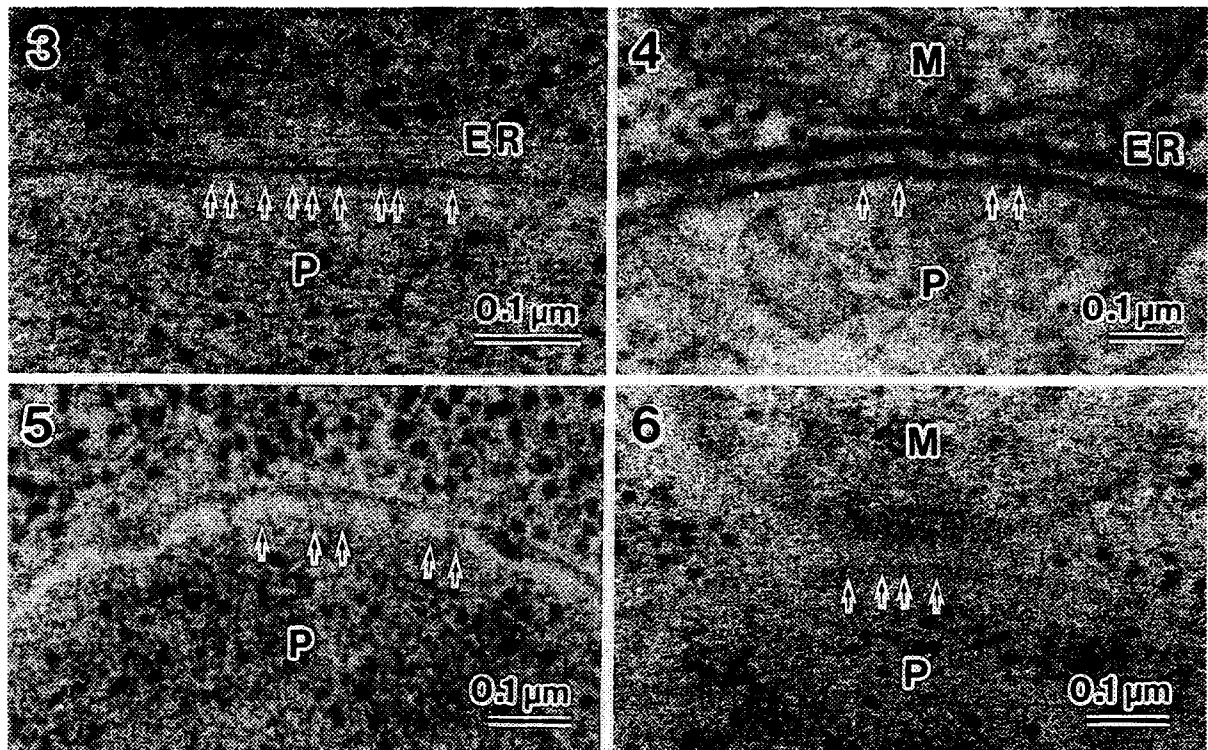


Fig 3. Connections(arrows) between plastid(P) and ER membranes. HPF-FS.

Fig 4. Connections(arrows) between plastid(P) and ER membranes. CCF. M: mitochondrion.

Fig 5. Connections(arrows) between inner and outer membranes of plastid(P). HPF-FS.

Fig 6. Connections(arrows) between mitochondrion(M) and plastid(P). HPF-FS.

細胞内の構造物はただ単にランダムに浮遊しているわけではないはずである。それぞれ目的を持って特定の場所に位置し、あるいは移動し、隣り合った構造の間で、物質の移動や情報の交換を行い、すべての細胞内構造が協調することにより細胞が機能すると考えられる。しかし、これまで隣り合った細胞内構造をつなぐ構造については報告されてこなかった。今回観察することができた架橋構造が、どのような役割を持っているのか、実際に細胞内の物質の移動や情報の交換に関与しているのか、今後の研究で明らかにしていきたい。

高圧凍結装置の使用に際しては、ウィスコンシン大学 Integrated Microscopy Resource の Dr. Paul Walther と Dr. Ya Chen の両氏にお世話になりました。

文献

- 1) Mersey B, McCully M: Monitoring of the course of fixation of plant cells. J Microsc 114: 49-76 (1978)
- 2) 井上金治: 透過電子顕微鏡のための試料作成技術と今後の展望, CACS FORUM 15:20-25 (1996)
- 3) Moor H: Theory and practice of high pressure freezing. In: Cryotechniques in Biological Electron Microscopy. Steinbrecht RA and Zierold K eds. Springer Verlag, Berlin, pp175-191 (1987)
- 4) Studer D, Michel M, Müller M: High pressure freezing comes of age. Scanning Microsc, Suppl 3: 253-269 (1989)