

第23回 神戸大学細胞構造研究会 講演会

化学固定機序とクライオTEM



灰色カビ病菌胞子(glutaraldehyde前固定、 KMnO_4 後固定)
井上加奈子講師 提供 (大阪大学超高压電顕センター)

神戸大学研究基盤センター・細胞構造研究会 共催

11月29日(木)~(金) 神戸大学研究基盤センターセミナー室

目次

- 第1章 はじめに (朴杓允)
- 第2章 電子顕微鏡試薬の特性 (朴杓允)
 - 2-1. 化学固定剤の概観
 - 2-2. 光顕固定剤と電顕固定剤
 - 2-3. アルデヒド系固定剤の特性
 - 2-4. 金属系固定剤の特性
 - 2-5. 準固定剤の特性
 - 2-6. 添加剤の特性
 - 2-7. 緩衝液の特性
 - 2-8. 浸透圧
- 第3章 電顕試薬の作り方 (朴杓允)
 - 3-1. 緩衝液の作製法
 - 3-2. 固定剤の作り方
 - 3-3. 脱水剤の作り方
 - 3-4. 中間溶媒の準備
 - 3-5. 樹脂混合液の作り方
- 第4章 生物試料作製の実際 (朴杓允)
 - 4-1. 固定方法の概略
 - 4-2. TEM 試料作製法のステップ
 - 4-3. 細切
 - 4-4. 前固定
 - 4-5. 水洗
 - 4-6. 後固定
 - 4-7. 水洗
 - 4-8. ブロック染色
 - 4-9. 脱水
 - 4-10. 中間溶媒処理
 - 4-11. 樹脂熱重合
 - 4-12. 熱重合反応
 - 4-13. 樹脂ブロック
 - 4-14. 各種の固定法
- 第5章 化学固定機序 (朴杓允)
 - 5-1. 化学固定
 - 5-2. グルタルアルデヒド (GA)
 - 5-3. ホルムアルデヒド (FA)
 - 5-4. アクロレイン (AR)
 - 5-5. 四酸化オスミム
 - 5-6. 過マンガン酸カリウム
- 第6章 クライオ TEM の紹介 (細木直樹)
 - 6-1. はじめに
 - 6-2. クライオ TEM の試料作製・観察法
 - 6-3. 三次元再構成法
 - 6-4. クライオ TEM に求められる物
 - 6-5. クライオ TEM 高分解能観察に必要なこと
 - 6-6. アーティファクトについて
- 第7章 オルガネラ物語 (朴杓允)
 - 7-1. オルガネラの定義
 - 7-2. オルガネラ像の解釈
 - 7-3. 細胞膜
 - 7-4. 細胞核
 - 7-5. ミトコンドリア
 - 7-6. ゴルジ装置
 - 7-7. 液胞
 - 7-8. 脂肪滴
 - 7-9. 細胞壁

第5章 化学固定機序

5-1. 化学固定

化学固定は生物試料の電顕固定法に普通に使われる方法のため、この方法によく知る必要がある。化学固定により細胞に保存できる成分はタンパク・核酸・脂肪・多糖類の4つの高分子物質である。タンパクを熱変性し、アルコール変性させる光顕試料用の固定法は使えない。生物組織の固定を説明するために色々な表現が行われている。細胞を瞬時に殺してこれを永久保存する。組織の細胞成分を安定化して保存する。これら用語の中で、重要な表現は安定化・保存・不溶化という言葉にある。固定とは細胞成分を化学的に不溶化して細胞外に成分が流出されず保存することを言う。不溶化するためには細胞成分と固定剤が結合し、交差鎖(cross-linkage)を形成する必要がある。よい固定のためには、動物組織の死後変化(自己融解)を最小限にするため、迅速で低温条件での固定が必要となるが、植物にはそのような措置は必要がない。しかし、およそ現在使用されている化学固定剤はすべての細胞成分(ペプチド、低分子物質、イオン、アミノ酸、少糖類、各種分子量の有機物)を不溶性にできず、固定できるのは一部にすぎない(表20)。化学固定剤により固定されて細胞に残るのは、巨大分子や膜と結合した物質である。その他の低分子物質は、固定により膜透過性が崩壊した細胞では、全て細胞外に流れ去る。高分子物質に対する固定効果は化学固定剤の種類によって異なる。

5-1-1. 固定剤の存在状態と浸透圧速度

1 気圧、室温のGAとacroleinは液体であり、四酸化オスミウムは固体である。しかし、FAはガス成分として存在する。ガスは水ではFA水和物となり、溶解しないFAはガス分子として水分子の間を漂う(表21)。

5-1-2. 自己融解

動物組織が生体から切り離されると、組織は血管からの酸素と栄養の供給が停止する。この状態を虚血という。切り離された組織における細胞は酸素不足になると、ミトコンドリアのATP合成が即座に停止し、ATPが不足する。ミトコンドリアのクエン酸回路を利用できなくなった細胞は、代わりにグルコースを酸化分解する解糖系を利用してATP生産する。その回路の最終生産物はピルビン酸であるが、この有機物質は酸素のない状態ではミトコンドリアのTCA回路に入れられない。その為ピルビン酸は酸化分解して乳酸を多量に生成することになる。乳酸により細胞質の環境は酸性に傾き、ライソゾーム膜が破れ、内部のライソゾーム酵素が遊離する。この酵素は酸性状態で効果を発揮して細胞構造を簡単に壊す。ライソゾーム酵素の発現を抑えるのが緩衝液の主な働きである。中性付近に調製された高い緩衝効果のある緩衝液の作用により、酸性状態でし

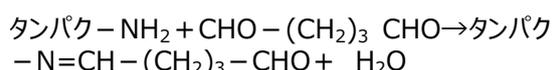
か作用できないライソゾーム酵素の作用を抑える働きを緩衝液は行う。また、組織の浸透圧を保持する機能も緩衝液にある。固定液の緩衝液の成分は固定剤よりも早く組織深部に達する。そのため、緩衝剤は組織に対して有毒なものよりその生理に適したものが選ばれている。また、緩衝液は固定剤を組織深部まで送り届ける乗物であり、固定液の浸透性に緩衝液が重大な貢献を果すと主張する研究者もいる。

5-1-2. 自己融解を起こさない生物組織

自己融解は酸素の供給停止でおこる細胞崩壊であるので、血管・血液を有する生物組織のみの反応である。したがって、血管を有さない生物組織、酸素を外界から供給できる組織細胞では動物組織でみられるautolysisは発生しがたい(表22)。自己融解の起こりにくい生物組織の低温固定は必要ないと思う。

5-2. グルタルアルデヒド (GA)

GAは水の中ではGA水和物やGAモノマー、GAポリマーとして存在する。この試薬のアルデヒド基は細胞成分のアミノ基、イミノ基と結合しやすい。細胞でアミノ基を有する分子はタンパクであるため、タンパクの保存にきわめて優れた効果を発揮する。その代わり、脂肪や脂肪酸の保存には向いていないが、膜のリン脂質の親水性基にアミノ基を有する脂質分子は固定できる。遊離のアミノ基は、タンパクやペプチドを構成するアミノ酸の側鎖や遊離N末端に存在する。タンパクアミノ基はGAのアルデヒド基と共有結合してSchiff塩基を形成する。



5-2-1. 細胞成分へのグルタルアルデヒドの結合部位

GAと結合する反応部位は、タンパクやペプチドのN末端、リジンのεアミノ基(図58A)、アルギニンのεアミノ基(図58Y)、オルチニンのδアミノ基(図58AG)、チロシンのフェノール環(図58AH)、システインのSH基(図58H)、ヒスチジンのNH基(図58L)である(Jones, 1973)。GA、FA、OsO₄と結合する反応部位を一覧しておく(表23)。

5-2-2. GAとタンパクの固定反応群

GAとタンパクの反応は複雑である。両者には以下のような6種の化学反応が同時進行で生じる。
①固定の準備反応がGAモノマーのポリマー化である。これは試料とGAが接触する前から固定液中で進行しているし、固定中も進行している。固定時に必要なのはGAモノマーである。GAモノマーは浸透性がよいので細胞にすばやく固定剤が浸み込むのに

5-5.四酸化オスミム

5-5-1. 脂質の固定

水に難溶性である非イオン性の OsO_4 は室温下で脂質の不飽和脂肪酸と極めて迅速に反応するが、飽和脂肪酸には反応しない。しかし、 OsO_4 液を 60°C にすると、飽和脂肪分子も固定できると理論的に云われている(Hayat,1981)。不飽和脂肪分子も飽和脂肪分子も生体膜の脂質二重層や脂肪滴に含まれる。 OsO_4 は組織の電荷に富んだ表面から内部にゆっくりと浸透し、不飽和脂肪分子とジエステル結合して膜や脂肪滴成分を化学的に不溶化する(図 65A)。生体膜を構成するリン脂質分子は親水性部(アルコール部とリン酸部からなる)と疎水性部(飽和脂肪酸或いは不飽和脂肪酸からなる)から構成されている(図 65B)。不飽和脂肪酸の二重結合部(-C=C-)は屈曲しこの部位に OsO_4 が結合する(図 65C)。リン脂質分子は水平方向、回転、屈曲運動を膜中で激しく行っている。以下に脂肪分子と Os との反応のプロセスを記述する。

1) 不飽和脂肪酸の OsO_4 による酸化

不飽和脂肪酸の二重結合部(-C=C-)と OsO_4 がエステル結合する。これが Os と脂肪酸との間の初発反応である。反応は極めて迅速で低エネルギーで生じる(図 65D)(Criegee,1936,1938, Criegee et al.1942)。

2) 不安定なモノエステルの形成

Os と二重結合部位の反応により不飽和脂肪酸の屈曲部に不安定なモノエステルが形成される(図 65D)(Riemersma,1968)。

3) Monoester の分解

Monoester が膜の脂質二重層に形成されるが、この構造は不安定なことで有名である。近くの水と反応して加水分解されて diol とオスミウム酸イオン(osmate ion)が生じる(図 65E)。Diol 基とは 2 個の水酸基が 2 個の異なる炭素に結合している脂肪族あるいは脂環式化合物の総称を言う。

1) 安定な Diester の形成

Monoester の分解で形成された diol は隣接の

monoester と反応して、安定な diester を作る(図 65F)(Korn,1967)。或いは Os が 2 量体を作り、これが不飽和脂肪酸の二重結合部とエステル結合して 2 量体 Os との diester を形成することもある(図 65G,65H)(Collin et al.1973)。 OsO_4 はと不飽和脂肪酸との間の別の反応も報告されている(Wigglesworth,1957)(図 65G)。また、2 量体 Os と不飽和脂肪分子と diester を形成することもある(図 65H)。2 つの不飽和脂肪酸分子間を 2 個の OsO_4 が 2 つの monoester を形成する場合もある(図 65J)。これら反応により脂肪成分は不溶化されている。

5-5-2. 生体膜の三層構造(単位膜)の見え方

OsO_4 の脂肪固定の機序が理解されるにつれて電顕下で見える膜の三層構造(単位膜)を説明できない。 Os の結合部位が膜の脂質二重層二重結合部であれば膜の中央の疎水性部に Os が単線で一本沈着することになる(図 66A,66B)。しかし、観察できる膜は膜の外縁に 2 本の Os 沈着部がある(図 66C)。この沈着像が単位膜と云われている。化学結合理論と観察事実が合わない。これを説明できる驚くべき仮説が提出されている。膜と Os との反応物 (Os 酸化物) は疎水性部から親水性部へと転移し、親水性頭部に沈着するという仮説である。 OsO_4 と不飽和脂肪酸の-C=C-との間の初発反応は迅速かつ発熱的なもので、外部から反応を促進する要因を考慮する必要はない(Subbaraman et al.1972)。最初に形成された monoester(不飽和脂肪酸と OsO_4 の反応物)は不安定なので、一部は加水分解されて osmate ion($\text{OsO}_2(\text{OH})_4$)と diol に分解される。Osmate ion は膜内部から拡散して、膜リン脂質の親水性頭部や膜タンパクと結合すると云われている(図 65E)。一部の monoester は周辺の diol 分子と反応して diester, または 2 量体となる。いろいろな

第6章 オルガネラ物語

6-1. オルガネラの定義

オルガネラとは何か、と云うことを初めに考えてみる。普通、オルガネラとは細胞内小器官のことをさす。そうすると、核、ミトコンドリア、葉緑体、粗面及び滑面小胞体、ゴルジ体、ライソゾーム、ペルオキシソーム（マイクロボディ）、液胞の8つがそれに該当する。しかし、細胞にはオルガネラ以外の構造体もあるので、意味を広げて細胞内外で一定の機能を果たしている構造体とオルガネラを定義すると、等が広義のオルガネラの中に追加される。ここでは、これら構造体の話をまとめてみる。口演の目標は多種多様な生物種のすべての構造体を理解しようという大それたことにある。電顕屋は将来どのような異種の生物の構造解析を頼まれるのか分からない。しかし、全てを理解することは不可能であるため、生物種の細胞に共通して存在するオルガネラの基本的な構造と機能だけを理解しておくクライアントの要望に沿えるような気がする。

6-2. 生物構造の理解方法

近世に発明された顕微鏡を使わなければ生物のミクロな構造を知ることはできなかつたであろう。電子顕微鏡は1950年代に開発され、この装置を使う電顕屋にはいつも高度なスキルと情報の解析力が求められてきた。しかし、クライアントの要請は電顕屋には過重なものに時折思える。社会的な要請を書くと以下になる。①電顕屋は通常、わずかな生物種（例えば哺乳類と植物とか微生物）しか試料作製を行えないが、他の多数多種の生物組織を試料作製を行ったことはない。②つぎに、試料作製した生物組織の細胞構成を知り、含まれる細胞タイプを識別できていない。なにしろ哺乳類だけでも、約200種の異なる細胞タイプがあるといわれているほど複雑な体系を持つ（氏名不詳,2016）。しかし、一人の電顕屋が、実際に200種の動物細胞タイプを知り、且つ、双子葉や単子葉植物でもその構造や細胞を理解し、加えて、微生物群とウイルス、昆虫、原生動物の構造が分かる電顕屋はいるだろうか？③電顕スキルを考えると、生物に含まれる多様な硬軟度を示す組織に対応できる超薄技術を持っているのか疑問である。現在のところ、骨や隕石、金属にはマイクロームやダイヤモンドナイフも太刀打ちできない。僅かFIBがこれに対応できる。軟組織でも標的構造が蛇行していれば、現在の技術では、その標的の見たい部位の観察と3次元解析は困難である。④また、きめ細かく高コントラストの電顕像を保障できる電子染色技術に長けた能力も求められる。原理的に染色できない飽和炭化水素鎖を染めることも現実にも求められる。⑤高分解能の電顕を補正・操作して、蛍光版の細胞像から意味ある情報を選択し、画像解析できる能力が必要となる。一体、どのような教育を施せば得ることができ

るのだろうか。⑥蛍光版で沈黙する電顕像を見て、構造と機能を一致させることはできるのだろうか。このうち最後の「電顕像の解釈」は電顕屋には、取り分け厄介である。像の解析力の獲得は電顕初心者にはとりわけ難しい。高いレベルに達するには少しずつ勉強していく以外にない。電顕像の理解には解釈の背景が無いと評価できないことが多いので、ここではその細胞情報を提供したい。細胞の理解のためオルガネラの解説を行うこととする。動物・植物・微生物といった多様な生物種には構造に相違があるため、電顕像の解釈は困難である。しかし、オルガネラレベルでは生物種の違いに差はなくなり同じ土俵で評価できる。

6-3. 細胞膜

オルガネラ・細胞構造を中心にした電顕像の解釈の講演を行う前に、オルガネラに共通する生体膜について初めに記述して「オルガネラ物語」の導入とする。

6-3-1. 細胞膜の構造

オルガネラは膜で外界と内部を仕切って、内部でオルガネラ独自の機能を遂行している。膜を理解すると、オルガネラも理解しやすくなると思う。脂質を多く有する生体膜は疎水性で水を近寄せない。高分子物質はもとより、酸素、炭酸ガス、低分子物質のような細胞必要物質であっても、容易に細胞を出入りできない。細胞の物質選択性は細胞膜の疎水性構造（脂質二重層）から必然的に生じていることを理解して頂きたい。

1) 細胞膜の組成

細胞膜を含めた生体膜はタンパクと脂質からなるため疎水性である。この理由は細胞膜を構成する脂質の性質による。膜脂質にはリン脂質、コレステロール、糖脂質が存在する(図77A)。電顕下では細胞膜は厚さ8nmの単位膜として見える(図77B-1)。単位膜はあたかも2本の線路が続いているようにみえる。細胞膜の線路像は非対称性であるから、細胞外側の線路が内側の線路より、より濃く見えるのである(図77B-2)。これは外側と内側で物質の分布が異なることを意味する。外層には糖鎖が多く、糖鎖が強く染めだされることが、細胞膜の非対称性の理由である。

2) 細胞膜の脂肪酸とリン脂質

細胞膜の脂質の主成分は脂肪酸である。脂肪酸は長い疎水性の炭化水素鎖(炭素は必ず偶数個)の末端に、親水性のCOOH基が結合している。飽和脂肪酸の炭素原子間は一重結合で繋がっているが(図77C)、不飽和脂肪酸では炭素原子間で2重結合を含む(図77D)。2重結合部位では炭化水素鎖は空間的に折れ曲がっていることが膜の流動性を高めることに繋がる。脂質分子の2本の脂肪酸が激しく動いている。つまり折れ曲がった不飽和脂肪酸では、稼働している空間が広いということ