

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月13日現在

機関番号：14501
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580048
 研究課題名（和文） 感染応答タンパク質の高度保存のための酸素バブリング・アルデヒド新規免疫電顕固定法
 研究課題名（英文） Immunoelectron microscopy using aldehyde fixation with oxygen-bubbling for highly preserving protein in pathogen-infected and uninfected plant tissues
 研究代表者 朴 杓允
 神戸大学・大学院農学研究科・名誉教授
 研究者番号：20147094

研究成果の概要（和文）：優れた細胞像を得られる化学固定法を開発した。植物に酸素バブリングとアルデヒド(GA)固定を30分行くと、糖タンパクの保存が従来法より促進され、タンパクを高度に保全できた。植物細胞の細胞膜、オルガネラ膜と基質、細胞成分の固定は極めてよい。特に固定の難しいとされるミトコンドリア内膜と基質の保存に成功した。しかし、酸素バブリング・GA固定が免疫電顕法に利用できるかどうかは現在のところまだ明らかにされなかった。

研究成果の概要（英文）：A new chemical fixation method was developed successfully in this project. On fixing plants with glutaraldehyde together with oxygen bubbling, the higher preservation of glycoproteins was achieved, resulting in observing fine ultrastructure under electron microscope. The cell images involving membranes and matrix of organelles, cytoplasm and cell components were excellent. However, it was not yet apparent whether the bubbling fixation was good enough to the preservation of protein for immunoelectron microscopy or not.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：酸素バブリング、感染応答タンパク、糖タンパク、グルタルアルデヒド、微細構造、冠根、トルイジン青、液胞

1. 研究開始当初の背景

現在の生命科学では細胞の働きを理解することにより科学の発展に貢献できる。その細

胞の働きはタンパクの機能の理解することで得られ、タンパク機能を知るためには細胞での局在、すなわち形態学と機能の双方を知

ることが何より求められる。しかしながら、現在の形態学を支える電顕法は習得することが困難な手法と云える。その中核の技術は化学固定剤を用いた試料作製方法にあるが、試料作製法を使用する研究者の多くは恒常的に高質の細胞像を得られないと云う不安をかかえている。タンパクの高度保存を示す美しい細胞構造を確実に得ることは研究者の基礎能力であるにもかかわらず、しばしばグルタルアルデヒド(GA)固定に失敗する。美しい細胞像は機能を把握する最良の道の1つである。このため、固定機序に立脚したタンパクの標準固定法の確立の必要性を日頃から感じている。思索の途上、タンパクのGA固定は酸素要求性の反応であることを知り、本課題の着想を得た。

2. 研究の目的

化学固定剤を用いた電顕試料作製法にはまだ改良の余地がある。現状の化学固定法では生命機能を司るタンパクの保存効果をもう少し高くできると思う。タンパクの固定機序を学習すると、その保存は酸素要求性であることが分かる。従って、酸素バブリングを行いつつグルタルアルデヒドで植物組織を固定する時、細胞タンパクの固定効果が高精度・短時間で上がることが期待できる。また、短時間のGA固定のためタンパクの抗原性決定基は喪失しないで残ると予想するため、凍結試料の免疫電顕法と遜色ない新規の免疫電顕の開発が期待できることも目標の1つである。

3. 研究の方法

グルタルアルデヒド(GA)と四酸化オスミウム(OsO_4)と云う化学固定剤を使ってコムギ根・葉の電顕試料作製を行った。組織を入れたGA前固定液に酸素バブリングしつつ固定を行った。対照は酸素無処理・GA前固定である。バブリング固定のために研究代表者が考案して

作成した酸素バブリング装置を用いた。GA固定中は溶存酸素量(mg/mL)を常に計測して実験の再現性を保証した。それ以降は常法通り試料作製を行った。生物試料を包埋した樹脂ブロックから $0.75\mu m$ の厚切の試料切片を作製してトルイジン青液(TB)で染色した。この色素は核、軟骨基質、ニッスル小体の COO^- , SH, SO_4^{2-} と結合するので糖タンパクを染めることが分かっている。青く染まった染色性の程度がタンパク保存の基準となる。電顕レベルでのタンパクの保存性は、固定が最も難しいと云われているミトコンドリア(Mit)を使って調べられた。調査基準はMit内膜面積/Mit面積比である。計測値は統計分析されて、酸素処理区と無処理区で有意差があるかどうか検定する。GAの優れた固定効果により抗体と反応する抗原決定基が破壊されている可能性があるが、免疫染色を行い免疫電顕に酸素バブリングが有効であるかどうかを調査している。

4. 研究成果

細胞タンパクは多様な生命機能を遂行する。凍結固定と比べると化学固定はタンパクをまだ十分保存していないし、得られた細胞像の結果も安定しない。本課題では化学固定時のタンパク高度保存性と良質細胞像の確保に及ぼす酸素バブリングの効果を調査した。初めに結晶タンパクを*in vitro*でグルタルアルデヒド(GA)で固定した。固定によりGA液中の酸素は15分で全て消費され、タンパクは沈殿して固定が完了した。このことからGA固定に酸素が必要であることが再確認された。次に、固定効果を上げるために酸素バブリングを行いながら、コムギ葉と根を15~90分間GA固定し、その後、常法により試料作製した。組織から作製した切片をトルイジン青(TB)で染色した。TBは塩基性色素であるため陰荷電した糖タンパクを好染する。糖タンパクの捕捉度をTB染色の程度により調べた。TBにより酸素

バブリング区の液胞と根冠細胞質が強陽性に染まったが、酸素バブリングフリー区では弱く染まっただけである。これは酸素バブリングフリー区の固定よりも酸素処理区では糖タンパクの保全が更に改善されたことを示す。表皮細胞と根冠細胞の液胞成分と液胞膜も高いコントラストを示したので酸素はこれら構造の固定に優れていることが分かった。3番目に固定がどれだけ短縮できるかコムギ根を使って調査した。酸素処理と無処理で根を30分～90分間GA固定し、その後60分間 OsO_4 固定した。TB染色した切片で固定効果を調べた。30分間酸素処理しGA固定した根で十分よい結果を得た。この区の分裂組織と根冠細胞の核と細胞質は最もよい染色性を示した。更にタンパクの固定効果を電顕レベルで調べるために、固定の良否に敏感なミトコンドリア(Mit)の構造、特に内膜面積/Mit面積比を計測学解析を行った。その結果、酸素バブリングフリー区に比べて酸素処理区の内膜/Mit比は有意に高く、内膜の構造保存がよいことが実証された。今まで得られた結果は、酸素バブリングを使えば30分のGA固定で糖タンパクが保存できることが証明された。しかしながら、酸素バブリング・GA固定が免疫電顕法に利用できるかどうかは現在のところ明らかにされなかった。国内外のミトコンドリアの研究者にとりミトコンドリアの崩壊を伴う試料作製に困っていた。崩壊の原因はミトコンドリアの酸素感受性によるものであることが分かった。酸素バブリング・グルタルアルデヒド固定を使うと状況を改善できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

1. Ikeda, K., Inoue, K., Kida, C., Uwamori,

T., Sasaki, A., Kanematsu, S., Park, P. (2013). Zinc compounds potentiated mycovirus transmission by attenuation of heterogenic incompatibility in *Rosellinia necatrix*. *Applied and Environmental Microbiology*, 査読有, in press.

2. Hatano, H., Mizuno N., Matsuda, R., Shitsukawa, N., Park, P., Takumi, S. (2012). Dysfunction of mitotic cell division at shoot apices triggered severe growth abortion in interspecific hybrids between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii*. *New Phytologist*, 査読有, 194: 1143-1154.

3. Inoue, K., Morita, Y., Kanematsu, S., Park, P., Ikeda, K. (2012). Comparative study of ultrathin section shrinkage in various epoxy blocks: Sectioning from Spurr's block causes shrinkage in the longitudinal direction. *Journal of Electron Microscopy Technology for Medicine and Biology*, 査読有, 26: 8-11.

4. Inoue, K., Tsurumi, T., Ishii, H., Park, P., Ikeda, K. (2012). Cytological evaluation of the effect of azoxystrobin and alternative oxidase inhibitors in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters*, 査読有, 326: 83-90.

5. Uchihashi, K., Nakayashiki, H., Okamura, K., Ishihara, A., Tosa, Y., Park, P., Mayama, S. (2011). *In situ* localization of avenanthramide A and its biosynthetic enzyme in oat leaves infected with the crown rust fungus, *Puccinia coronata* f. sp. *Avenae*, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 査読有, 76: 173-181.

6. Mizuno, N., Shitsuka, N., Hosogi, N., Park, P., Takumi S. (2011). Autoimmune responses and repression of mitotic cell division occurring inter-specific crosses between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii* Coss. That show low temperature-induced hybrid necrosis. *The Plant Journal*, 査読有, 68: 114-128.

7. Inoue, K., Kanematsu, S., Park, P., Ikeda, K. (2011) Cytological analysis of mycelial incompatibility in *Helicobasidium mompa*.

FEMS Microbiology Letters, 査読有, 315: 94-100.

8. Inoue, K., Kanematsu, S., Park, P., Ikeda, K.
(2011) Cytological analysis of mycelial in compatibility in *Rosellinia necatrix*. *Fungal Biology*, 査読有, 115: 87-95.
9. Ikeda, K., Inoue, K., Nakamura, H., Hamanaka, T., Ohta, T., Kitazawa, H., Kida, C., Kanematsu, S., Park, P. (2011) Genetic analysis of barrage line formation during mycelial incompatibility in *Rosellinia necatrix*. *Fungal Biology*, 査読有, 15:80-86.
10. Ikeda, K., Inoue, K., Kanematsu, S., Horiuchi, Y., Park, P. (2011) Enhanced Effects of non-isotopic hafnium chloride in methanol as a substitute for uranyl acetate in TEM contrast of ultrastructure of fungal and plant cells. *Microscopy Research and Technique*, 査読有, 74 : 825- 830.

[学会発表] (計 15 件)

1. 朴杓允 (2013) 15th 化学からみた TEM・SEM 生物試料作製法の原則、細胞構造研究会、神戸、2013 年 2 月 8 日～9 日
2. 朴杓允 (2013) 電顕アーティファクト、理化学研究所横浜研究所、植物電子顕微鏡若手ワークショップ 2012, 2013 年 1 月 15 日～16 日
3. 朴杓允 (2012) アルデヒドの固定機序、近畿電顕技術情報交換会, 2012 年 11 月 25 日
4. 朴杓允 (2012) 化学固定剤の固定機序医学生物学電子顕微鏡技術学会・第 13 回電顕シンポジウム, 大阪, 2012 年 11 月 24 日
5. 朴杓允 (2012) 細胞を読む (基調講演)、医学生物学電子顕微鏡技術学会・第 13 回電顕シンポジウム, 大阪, 2012 年 11 月 24 日
6. 池田健一、井上加奈子、嘉久大毅、朴杓允 (2012) 代替電子染色の現状、第 25 回医学生物学電子顕微鏡技術学会研修会, 鳥取, 2012 年 8 月 23 日～25 日
7. 朴杓允 (2012) TEM 生物試料作製の原則, 24 回 Bio 電顕セミナー, 大阪, 2012 年 2 月 24 日
8. 朴杓允 (2012) TEM 生物試料作製の原則、第 24 回 Bio 電顕セミナー, 東京, 2012 年 2 月 23 日
9. 朴杓允 (2012) 細胞を読む(活性酸素とカ

ビ病原性)、第 25 回医学生物学電子顕微鏡技術学会研修会、鳥取、2012 年 8 月 23 日～25 日

10. 朴杓允 (2011) TEM のアーティファクト、医学生物学電子顕微鏡技術学会・第 12 回電顕シンポジウム、浜松、11 月 26 日
11. 朴杓允 (2011) 酢酸ウランの染色機序、医学生物学電子顕微鏡技術学会・第 12 回電顕シンポジウム、浜松, 2012 年 11 月 26 日
12. 朴杓允 (2011) 14th TEM 生物試料作製法の原則, 電顕講習会, 神戸, 2011 年 11 月 4 日～6 日
13. Ikeda, K., Inoue, K., Nakamura, H., Kanematsu, S., Park, P. (2010) Genetic analysis on mycelial incompatibility in *Rosellinia necatrix*. 9th International Mycological Congress, Edinburgh, 2012 年 8 月 1 日～8 月 6 日
14. Inoue, K., Ikeda, K., Kanematsu, S., Park, P.

(2010) Cytological analysis on mycelial incompatibility in *Rosellinia necatrix*. 9th International Mycological Congress, Edinburgh, 2012 年 8 月 1 日～8 月 6 日

15. 池田健一、井上加奈子、堀内喜高、兼松聡子、朴杓允 (2010) 生物組織の超薄切片における酢酸ウランと塩化ハフニウムの電子染色性比較. 医学生物学電子顕微鏡技術学会第 26 回学術講演会, 別府, 2010 年 5 月 14 日～16 日

[図書] (計 1 件)

1. 朴杓允 (2011). 透過電子顕微鏡生物試料作製講座 電子顕微鏡 技術講座シリーズ 1 (動画 DVD), 監修: 朴杓允, 村中祥悟, 株式会社モルフォバイオイメージング研究所, 9 時間講演 (動画のため頁なし)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
朴 杓允
神戸大学・大学院農学研究科・名誉教授
研究者番号: 20147094
- (2) 研究分担者
池田 健一
神戸大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 40437504
- (3) 連携研究者
()
研究者番号: