

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450059

研究課題名(和文)植物病理学のための酢酸ウランに代わるノンアイソトープ電子染色剤の新規開発

研究課題名(英文) New development of non-isotope heavy metals as alternative electron stains of uranyl acetate for plant pathology samples

研究代表者

朴 杓允 (Park, Pyoyun)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：20147094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生物試料の切片の電顕観察にはウラン塩が最も有効であるが、細胞壁やデンプン粒と言った多糖類を多く含む植物病理学の試料に多く含まれる多糖類をウラン塩は好染できない。また、ウラン塩は放射活性を有するため日本では管理と使用が制限されるため、細胞構造と多糖類の双方のコントラストを上げる非放射性的ウラン代用重金属染色剤の開発が求められている。画像の客観的評価のための相対的画像コントラスト比法を使って、5種の重金属のいくつかの生物種に対する電子染色効果を調べた。その結果、positive染色剤としてGdAc3とHfCl4が優れ、negative染色剤としてGdCl3が良いことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Uranyl salts are effective to observe the cells of sections from plant pathology samples with much polysaccharides, but not to increase the contrast of cell walls, starch grains, glycogen particles and collagen fibers. Because of the radioactive salts, the use and purchase have been restricted only in Japan. The non-isotope heavy metals, positive to stain both the cell structures and the polysaccharides, are requested now. The staining effects of 5 different metals (SmCl3, SmAc3, GdCl3, GdAc3 and HfCl4) was examined ultrastructurally in cells of plant leaves and roots, insects, and fungi. Among them, GdAc3 and HfCl4 were excellent as positive electron stains whereas GdCl3 was good as a negative stain.

研究分野：農学

 キーワード：酢酸ウラン 透過電子顕微鏡 非放射性的重金属剤 塩化ハフニウム ガドリニウム塩 サマリウム塩
細胞コントラスト ネガティブ染色

1. 研究開始当初の背景

電顕形態学に近年問題が生じている。生物の微細構造を観察するにはウラン塩の使用が必要となるが、ウランが生物災害物質であることが問題視されている。生物試料の切片にウラン重金属液を処理すると、細胞成分に重金属が結合して微細構造のコントラストが上がり、超薄切片下の細胞を可視化できる。あらゆる生物種の細胞に対してほぼ万能の染色効果を持つウラン塩であるが、多糖類や膠原繊維を好染しにくい欠点をもつ。このため植物病理学で取り扱う感染植物では、感染攻防時のカビと植物の双方の細胞壁にコントラストを付与できないため、感染応答の構造変化を精密に観察が出来ない。多糖類と膠原繊維に対する貧染色性以外に、加えて、ウランには使用規制の問題がある。ウラン塩が放射活性を有するために、その使用や購入・管理が制限されつつある。この結果、日本では電顕形態学の研究が抑制される雰囲気が出現しつつある。これら理由のため、現在、放射性ウラン塩に代わる「多糖類を好染する非放射性重金属電子染色剤」の新規開発が求められている。

2. 研究の目的

酢酸ウランは優秀な positive と negative 電子染色剤であるために、いくつかの欠点があるにもかかわらず、Watson(1958)のウラン塩の電子染色剤の報告以後、殆どそれに代わる重金属染色剤の新規開発は行われなかった。ウランの欠点は3つある。1)ウランは核分裂性²³⁵Uを含み、2)その強い毒性と放射活性のため生物災害を誘起する物質である。3)ウラン塩は多糖類と膠原繊維を好染しないため、この成分を多く含む生物形態を観察し難いと云う欠点がある。1)と2)の理由により、核アレルギー社会である日本ではその保有・使用・購入が制限され、ウランは管理強化の対象となっている。3)の理由で、多糖類を多く含有する植物とカビの細胞壁やデンプン構

造の正確な評価は困難となっている。ウランの欠点や使用制限を解除するために、「多糖類を好染する非放射性重金属の新規開発」が現在求められている。ウラン代替重金属として Hf 元素とランタノイド族元素 (Sm と Gd) の塩化物・酢酸塩を候補として取り上げ、5種の重金属塩の細胞構造・多糖類・膠原繊維の電子染色効果を調べることにした。

3. 研究の方法

植物、糸状菌、昆虫、哺乳類に対するランタノイド族の化合物 ($\text{SmCl}_3, \text{SmAc}_3, \text{GdCl}_3, \text{GdAc}_3$) と HfCl_4 の positive 電子染色の効果を調べた。全ての組織細胞は化学固定した後、試料をエタノールで脱水した。脱水試料を樹脂に浸漬して重合樹脂ブロックを作製した。ブロックからナイフとマイクロトームを使って超薄切片を作製した。次に 2% ~ 4% ランタノイド族重金属水溶液及び 4% HfCl_4 の重金属水溶液あるいはメタノール液を調整した。切片を重金属液で前染色した後、鉛液で切片を後染色した。無染色、重金属単染色、各種の二重染色を処理区として設定した。各々の処理区からの切片を透過電子顕微鏡で観察した。調査した生物組織は植物葉細胞と根細胞、糸状菌菌糸、昆虫の中腸細胞、腎臓である。調査細胞を無作為に 2000 倍 ~ 4000 倍で写真撮影してネガを作製した。このネガを 8000 倍に拡大し印画紙に現像した後、写真画像をスキャナーに取り込んだ。調査対象はヘテロクロマチン、オルガネラ膜と基質、細胞壁、デンプン粒、グリコーゲン、膠原繊維で、ここでは、これらを標的構造と称する。以下に画像相対的コントラスト比法について説明する。初めに写真上の最小電子密度を示す樹脂部位の電子密度を ImageJ により無作為に 20 ヶ所計測して最低電子密度の強度数値を算出した。次に無作為に 20 ヶ所の標的構造の電子密度の強度数値を計測した。標的構造の電子密度数値を樹脂の最低電子密度数値で割った値を画像相対的コン

トラスト比とした。20ヶ所の得られた相対的コントラスト比の数値から平均値と標準偏差を出して、異なる染色処理区間で統計処理して有意差を調べた。ついで、5種の染色剤の negative 染色効果も調べた。

4. 研究成果

ウラン代替重金属として4種のランタニド族元素の塩化物と酢酸塩 ($\text{SmCl}_3, \text{SmAc}_3, \text{GdCl}_3, \text{GdAc}_3$) と1種の HfCl_4 の positive 電子染色性と negative 染色性を調査した。細胞構造のコントラストの増減を客観的に評価するために相対的画像コントラスト比法を開発した。この方法を使って、重金属水溶液の positive 電子染色効果を調べた結果、5種の重金属処理により細胞構造はウランの染色効果の約80%のコントラスト増を示すことが分かった。無染色切片と比較して80%コントラスト増加した細胞像は、電顕観察に十分に効果ある結果であった。また、高倍率観察のために電子染色剤には細胞画像の微細性が求められるが、この点に関しては GdAc_3 と HfCl_4 が最も優れた画像を示した。加えて、調査した重金属は多糖類をウランよりも強く染色したので、植物病理学の多糖類を多く含む試料の観察にウラン塩よりも適していることが分かった。次に、TMV を材料として重金属の negative 染色効果を調べた。5種の重金属のうち、TMV のネガティブ像の質、構造保持、汚染の量の点で GdCl_3 が最も優れていた。以下に我々の一連の業績を記載する。ラット腎臓・アラビドプシス葉・カビに対する HfCl_4 メタノール液の電子染色効果について本課題の採択前に2つの論文を掲載した(Horiuchi et al. 2007)(Ikeda et al. 2011)。 SmCl_3 がウラン代替電子染色剤として使用できるとの論文を掲載した(Kaku et al. 2015)。別途に「 HfCl_4 染色した昆虫中腸における相対的 TEM コントラスト比を用いた電子染色効果」及び「 $\text{SmCl}_3, \text{SmAc}_3, \text{GdCl}_3, \text{GdAc}_3$ 染色したコムギ根における相対的 TEM コントラ

スト比を用いた電子染色効果」の2つの論文を作成中である。

次に、得られた成果の国内外の位置とインパクトについて記述する。本課題の調査により、いくつかの重金属がウラン代替染色剤として使用できることが証明できた。この発見は国内の電顕の使用者にとり有益である。また、ウラン使用・購入に問題の無い海外では、当分の間ウランの使用が続くであろうが、非放射性染色剤は海外の研究者・技術者の健康を保障するので、彼らにとっても役立つ情報となる。特に世界の植物病理学分野の電顕形態学者にとり多糖類を好染する安全な非放射線染色剤は待ち望まれていた結果といえる。本課題の成果は方法の開発なので、国内外の百万人にいるといわれている電顕使用者に安全、効果的、安価な重金属の電子染色剤を提供できるためその影響範囲は広く、効果年月は長い。

最後に、今後の展開と多様な視点について記述する。 GdAc_3 と HfCl_4 が現在のところ最も優れた positive 電子染色剤であるが、その染色機序については分かっていない。そのため染色効果の応用については期待できない。水溶液中の重金属イオンやアニオンは細胞成分とイオン結合して細胞コントラストを上げることは良く知られている。このイオン結合の理解には水に溶解している重金属の化学種を是非知る必要がある。この化学種は NMR 解析よってもたらされるが、NMR 解析できるランタニド族元素はイッテルビウムだけである。染色機序のモデル化合物として塩化イッテルビウムと硝酸イッテルビウムの染色効果を調べるべきである。その後、水のイッテルビウム化学種を NMR 解析すると、重金属染色機序の解明の道が開かれると期待している。

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)

Takagi, D., Ifuku, K., Ikeda, K., Inoue, K.,

- Park, P., Tamoi, M., Inoue, H., Sakamoto, K., Saito, R., Miyake, C. Suppression of chloroplastic alkenal/one oxidoreductase represses the carbon catabolic pathway in *Arabidopsis thaliana* during. *Plant Physiol.* 査読有, Vol.170、2016、2024-2039. , doi:10.1104/pp.15.01572
- Inoue, K., Kitaoka, H., Park, P., Ikeda, K. Novel aspects of hydrophobins in wheat isolate of *Magnaporthe oryzae*: Mpg1, but not Mhp1, is essential for adhesion and pathogenicity. *Journal of General Plant Pathology*, 査読有, Vol.82、2016、18-28. doi: 10.1007/s10327-015-0632-9
- Kaku, H., Inoue, K., Muranaka, Y., Park, P., Ikeda, K. Rapid contrast evaluation method based on affinity beads and backscattered electron imaging for the screening of electron stains. *Microscopy* , 査読有, Vol.6、2015、361-368. doi: 10.1093/jmicro/dfv041
- Ueno, S., Inoue, K., Ishii, H., Jiang S., Adachi, Y., Kanematsu, A., Park, P., Ikeda, K. Poly-cationic Ruthenium Red is Reactive with the Extracellular Matrix Produced by Plant Pathogenic Fungi. *J. Electron Microsc. Technol. Med. Biol.* Vol.28 (2)、2015、1-7. 査読有, Vol.28: 47-53.
- Nakano, H., Mizuno, N., Tosa, Y., Yoshida, K., Park, P., Takumi, S. (2015) Accelerated senescence and enhanced disease resistance in hybrid chlorosis lines derived from interspecific crosses between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii*. *PLoS ONE* , Vol.10(3)、2015、査読有, doi:10.1371/journal.pone. e0121583.
- Kitagawa, H., Shimoi, S., Inoue, K., Park, P., Ikeda, K. Durable and broad-spectrum disease protection measure against airborne phytopathogenic fungi by using the detachment action of gelatinolytic bacteria. *Biological Control* Vol.71、2014、1-6. 査読有 doi:10.1016/j.biocontrol.2013.12.008
- Jiang, S., Park, P. and Ishii, H. Penetration behavior of *Venturia nashicola*, associated with H₂O₂ generation, in Asian and European Pear Leaves. *J. Phytopathology.* 査読有, Vol.162、2014、770-778. DOI: 10.1111/jph.12260,
- Ikeda, K., Inoue, K., Kida, C., Uwamori, T., Sasaki, A., Kanematsu, S., and Park, P. (2013) Potentiation of mycovirus transmission by zinc compounds via attenuation of heterogenic incompatibility in *Rosellinia necatrix*. *Applied and Environmental Microbiology*, 査読有, Vol.79、2013、3684-3691. doi: 10.1128/AEM.00426-13.
- Morita, Y., Hyon, G.-S., Hosogi, N., Miyata, N., Nakayashiki, H., Muranaka, Y., Inada, N., Park, P., and Ikeda, K. Appressorium-localized NADPH oxidase B is essential for aggressiveness and pathogenicity in the host-specific toxin-producing fungus *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *Molecular Plant Pathology*, 査読有, Vol.14、2013、365-378. doi: 10.1111/mpp.12013.
- 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, Vol.79、2013、3684-3691. doi:10.1128/AEM.00426-13
- [学会発表](計14件)
- 朴 杓允, 酸素バブリング・アルデヒド固定と重金属染色, 第38回近畿電顕技術情報交換会, 2016.3.13. 神戸大学梅田インテリジェントラボラトリ教室、(大阪府)
- 朴 杓允, 超薄切片形成機構と切片を取り巻く最新の電顕技法, 第21回細胞構造研究会, 2016.1.30.~31, 大阪大学コンベンションセンター、(大阪府)
- Muranaka, Y., Inoue, K., Park, P. Evaluation of non-cluclear uranium by comparison with continuous ultra-thin sections of biological samples. 東アジア顕微鏡学会, 2015.11.24~27.ポスター発表(兵庫県)
- 朴 杓允, 電子染色機序, 植物電子顕微鏡サマーセミナー2015 (20th 細胞構造研究会@関東), 植物電子顕微鏡ネットワーク主催, 理研, 2015.9.26. (神奈川県)
- 朴 杓允, 定量形態学 (Stereologyの原理), 第19回細胞構造研究会, 2015.6.20~21. 大阪大学コンベンションセンター, (大阪府)
- 池田健一、嘉久大毅、井上加奈子、朴 杓允, 走査型電子顕微鏡を用いた代替電子染色剤の選抜法. 医学生物学電子顕微鏡技術学会第31回学術講演会, 名古屋市立大学, 2015. 6.19.~21. (愛知県)
- 朴 杓允, グルタルアルデヒド固定機序, 日本顕微鏡学会第71回学術講演会, 京都、国立京都国際会館, 2015.5.14.招待講演、(京都府)
- 朴 杓允, 末梢神経腫瘍におけるrudimentary ciliaの機能と役割, 第9回中四国電子顕微鏡研究会, 2014.10.4. 高知大学医学部 (高知県)
- 朴 杓允, 化学固定理論とアーティファクト, 植物電子顕微鏡サマーセミナー2014 (18th 細胞構造研究会@関東), 植物電子顕微鏡ネットワーク主催, 帝京大学宇都宮キャンパス 2014.8.26.~27. (栃木県)
- 朴 文守, 朴 杓允, 塩化ハフニウム水溶液の電子染色, 植物電子顕微鏡サマーセミナー 2014 (18th 細胞構造研究会@関東), 植物電子顕微鏡ネットワーク主催,

帝京大学宇都宮キャンパス、2014.8.26.～
27. (栃木県)

Muranaka, Y., Park, M-S. Park, P., Staining of
non-isotope metals to cell structure in serial
sections from animal. 日本顕微鏡学会,
2014.5.10.千葉幕張メッセ (千葉県)

朴 杓允 17th電顕のアーティファクト形
成機序神戸大学、細胞構造研究会、神戸
大学、2014.2.1 2. (兵庫県)

朴 杓允、16th超薄切片の作製機序と電
子

染色機序” 神戸大学、細胞構造研究会、
2013.7.13.～14. (兵庫県)

朴 杓允、透明人間(未固定成分)の可視
化、中四国電顕研究会、四国大学交流プ
ラザ、2013.8.18. (高知県)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 朴 杓允 (PARK, Pyoyun)
神戸大学・研究基盤センター、特命教授
研究者番号：20147094

(2)研究分担者 池田健一 (IKEDA, Kenichi)
神戸大学・大学院・農学研究科・准教授
研究者番号：40437504

(3)研究分担者 朴 文守 (PARK, Moon-Son)
神戸大学・大学院・農学研究科・学術推
進員
研究者番号：50600417

(4)連携研究者
研究者番号：