

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790176

研究課題名(和文) 走査型電子顕微鏡の新しい手法によるゴルジ装置の立体微細構造機能解析
 研究課題名(英文) Three-dimensional structural and functional analysis of the Golgi apparatus by new method of scanning electron microscopy.

研究代表者

甲賀 大輔 (KOGA DAISUKE)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30467071

研究成果の概要(和文)：本研究では、光学顕微鏡の手技と走査電子顕微鏡観察法を効果的に組み合わせ、高分解能三次元形態観察法を新たに開発した。この手法は、下垂体前葉のような多数の細胞が混在する組織において特に有効であり、これまで困難であった「走査電顕による下垂体前葉細胞の同定」が可能となった。さらに、各下垂体前葉細胞のゴルジ装置の立体微細構造と機能の関係を超高分解能走査電顕により詳細に解析した。

研究成果の概要(英文)：A novel high resolution three-dimensional observation method was developed by an effective combination of light microscopic technique and scanning electron microscopic observation. This method was especially useful for investigation of tissues containing various kinds of cell, enabling the classification of anterior pituitary cells which has hitherto been difficult by using scanning electron microscopy. Furthermore, the three-dimensional ultrastructure in relation to its function of each anterior pituitary cell of the Golgi apparatus was precisely analyzed by high-resolution scanning electron microscopy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：解剖一般 (含組織学・発生学)

キーワード：ゴルジ装置、細胞小器官、下垂体前葉、走査型電子顕微鏡、オスミウム浸軟法、ポリエチレングリコール、試料作製法

1. 研究開始当初の背景

下垂体前葉細胞はもっとも代表的な内分泌細胞であり、分泌のメカニズムの研究に最適な細胞である。下垂体前葉細胞の分類と微細構造に関する研究は、これまで光学顕微鏡(光顕)と透過電子顕微鏡(透過電顕)を用いて行われてきた。しかし、このような従来の方法では、細胞内の諸構造はおおむね平面に理解されるだけで、複雑な三次元形態をもった細胞小器官、とくにゴルジ装置の解析には不完全な点も多い。一方、申請者はこれまでに、走査電顕により多様な細胞のゴルジ装置の三次元微細構造を明らかにしてきた。また、その研究のなかで、特に下垂体前葉細胞のゴルジ装置が良く発達しており、かつ他の器官の細胞とは異なる特殊な立体構築をとっていることを見出した。さらに、この走査電顕による観察では、下垂体前葉細胞のゴルジ装置がきわめて多様な立体構造を示すことを知ることができた。しかし、走査電顕観察だけでは、どの前葉細胞がどの特徴あるゴルジ装置を有するのかを把握することは困難であった。そこで本研究では、この限界を克服する新たな観察法の開発と、ゴルジ装置の機能解析を試みた。

2. 研究の目的

本研究は、ポリエチレングリコール(PEG)による包埋・脱包埋法による光顕的手技と走査電顕観察法を効果的に組み合わせた、高分解能三次元形態解析法を新たに開発し、下垂体前葉細胞の明確な同定と各前葉細胞の細胞小器官、特にゴルジ装置の立体微細構造の関係を解析する。

3. 研究の方法

(1) 試料作製法の開発

本研究では、光顕切片と走査電顕標本を対比させるために、ポリエチレングリコール(PEG)による包埋・脱包埋法を試みた。PEGは水溶性のため、試料を包埋・切片作製後に簡単に脱包埋し、残りのブロックを走査電顕試料として利用することができた。

(2) 走査電顕による下垂体前葉細胞の分類

免疫組織化学的に染色した下垂体前葉細胞に光顕像をもとに、隣接ブロックの対応部を走査電顕で観察し、染色された細胞と同一細胞の走査電顕観察を行った。

(3) 下垂体前葉細胞の細胞小器官の立体微細構造の解析

PEG法により分類可能となった各前葉細胞の細胞小器官を、高分解能走査電顕により詳細に観察し、各細胞のゴルジ装置、ミトコンドリア、小胞体、分泌果粒の形大きさなどを詳細に記録した。

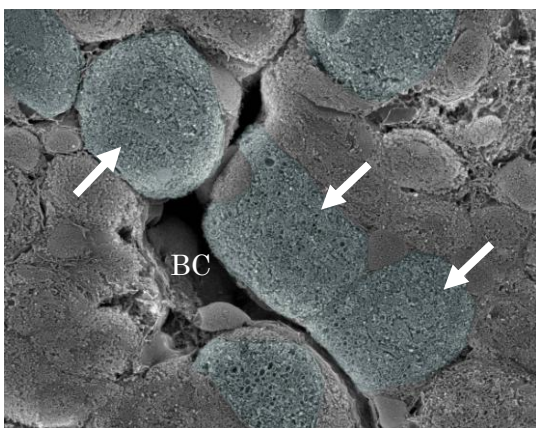
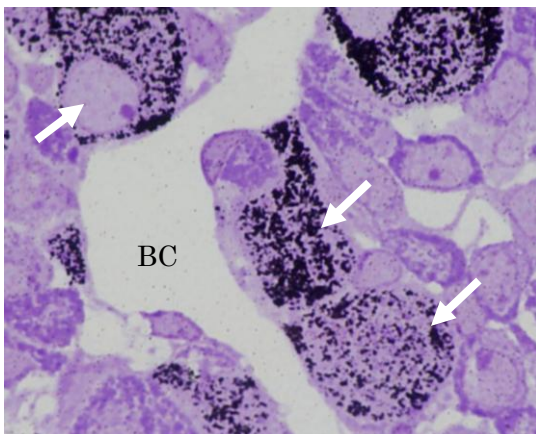
(4) ゴルジ装置の機能形態解析

ゴルジ装置の機能形態解析を行うため、ゴルジ装置のシス・トランスの極性、層板構造、ゴルジ装置と粗面小胞体との立体的な配置関係を明らかにした。また、下垂体前葉は各内分泌細胞ごとに刺激と応答の因果関係が明瞭である。このことを利用し、特定の細胞の機能を亢進させることで、その変化を経時的に解析し、機能状態とゴルジ装置の微細構造の関係を、時間軸を加えた形で解析することができる。そこで、去勢により機能亢進状態になった標的細胞と正常時の細胞とを比較し検討した。

4. 研究成果

(1) 試料作製法の開発

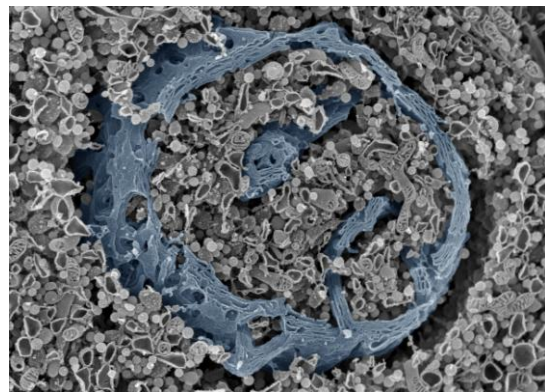
光顕免疫組織化学染色切片と走査電顕標本を正確に対比する方法を開発することに成功した。具体的には、免疫組織化学的に染色した光顕像をもとに、隣接ブロックの対応部を走査電顕で観察し、染色された細胞と同一の細胞の走査電顕観察を行う方法である。この手法は、下垂体前葉のような1つの組織中に多数の細胞が混在する複雑な組織において特に有効であり、今まで困難であった「走査電顕による下垂体前葉細胞の同定」が可能となった。今後は、下垂体に限らず、複雑な組織中での目的細胞の変化を解析するための他の研究に大いに貢献することが期待できる(例えば、内分泌腺では、膵島や消化管の散在性内分泌細胞で起こる病態の解析など)。



PEG法の応用例: 光顕免疫染色切片像(上)と隣接ブロック走査電顕像(下)。相補的に観察することで、正確な同定が可能となった。

(2) 下垂体前葉細胞の細胞小器官の立体微細構造の解明

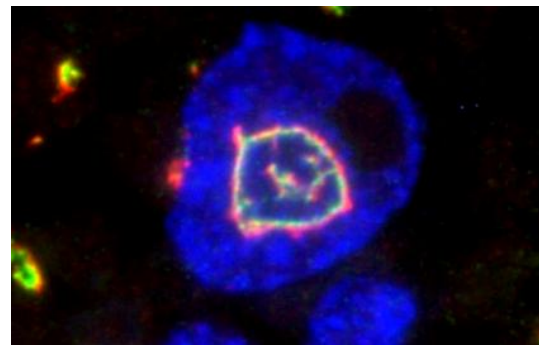
PEGによる包埋・脱包埋を用いることで、下垂体前葉細胞のなかで、性腺刺激ホルモン産生(GTH)細胞のゴルジ装置がもっとも良く発達しており、球体という特殊な形状を示すことがわかった。その結果、このGTH細胞のゴルジ装置は、形態学的研究に最適な材料であることがわかった。



GTH細胞のゴルジ装置: 走査電顕では、ゴルジ装置を三次元的に観察することができる。

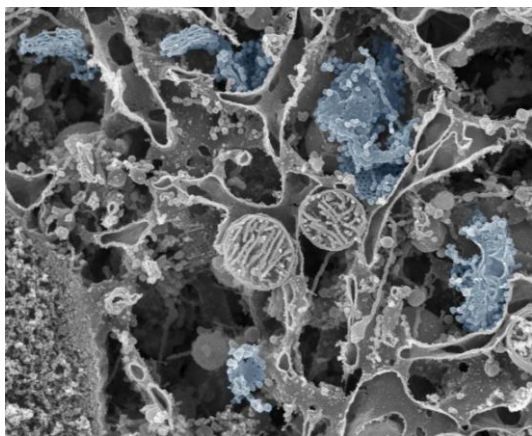
(3) ゴルジ装置の機能形態解析

本研究では、特にGTH細胞のゴルジ装置に注目して、その微細構造の解析をおこなった。走査電顕による形態学的解析と光顕免疫組織化学的解析により、球体のゴルジ装置の外側がシス面、内側がトランス面であることがわかった。



ゴルジ装置の極性を示す免疫染色像(GTH細胞): 球状のゴルジ装置の外側にシス面(赤)、内側にトランス面(緑)が位置する。

また、去勢により機能亢進させた GTH 細胞のゴルジ装置の構造を経時的に観察し、その微細形態変化を観察した。その結果、去勢後早期には、正常時には球体であったゴルジ装置の断片化、特殊な形状の粗面小胞体の出現など、細胞生物学的に興味深い構造変化を確認することができた。



去勢後早期にみられたゴルジ装置の断片化を示す走査電顕像

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 3 件)

① Watanabe T, Sakai Y, Koga D, Bochimoto H, Hira Y, Hosaka M and Ushiki T: A unique ball-shaped Golgi apparatus in the rat pituitary gonadotrope: its functional implications in relation to the arrangement of the microtubule network. J. Histochem. and Cytochem. 査読有、2012 (in press).

② Koga D, Nakajima M and Ushiki T: A useful method for observing intracellular structures of free and cultured cells by scanning electron

microscopy. J. Electron Microsc. 査読有、61、105-111

③ 牛木辰男, 伊東祐博, 伊藤広, 岩田太, 甲賀大輔、リアルタイム 3D 走査電子顕微鏡の医学生物応用、顕微鏡、査読有、45 巻 3 号、2010

[学会発表] (計 10 件)

① 甲賀大輔、光顕免疫染色切片像と超高分解能走査電子顕微鏡の直接対比法による細胞内膜系観察法の開発とその応用、日本解剖学会、2012 年 3 月 26 日、山梨大学

② 甲賀大輔、The classification of cell types in the pituitary gland by high-resolution stereoscopic scanning electron microscopy. X X I International Symposium on Morphological Sciences, 2012 年 2 月 15 日, Sao Paulo, Brazil

③ 甲賀大輔、培養細胞の細胞内立体微細観察に適した走査電顕オスミウム浸軟法の開発、2011 年 5 月 16 日、日本顕微鏡学会、福岡国際会議場

④ 甲賀大輔、Changes in the ultrastructure of membranous cell organelles during mitosis, 日本解剖学会、2011 年 3 月 30 日(誌上開催)、横浜(誌上開催)

⑤ 甲賀大輔、Morphological change of membranous cell organelles in the gonadotroph of the rat anterior pituitary gland after castration. X X I

International Symposium on Morphological Sciences, 2010年9月20日, Taormina, Italy

⑥ 甲賀大輔、去勢による性腺刺激ホルモン産生(GTH)細胞の細胞内膜系の立体形態機能変化、日本顕微鏡学会、2010年5月24日、名古屋国際会議場

⑦ 甲賀大輔、ゴルジ装置の多様な形態と機能変化、日本解剖学会、2010年3月28日、岩手県民会館

⑧ 甲賀大輔、バイオ研究におけるSEMの活用とその可能性、SCAN TECH、2009年9月4日、日本女子大学

⑨ 甲賀大輔、走査型電子顕微鏡で下垂体前葉細胞の細胞内膜系の立体微細構造を観察する、日本下垂体研究会、2009年8月28日、青森県三沢市

⑩ 甲賀大輔、去勢によるラット下垂体前葉細胞の細胞内膜系の変化、日本顕微鏡学会、2009年5月27日、仙台国際センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲賀 大輔 (KOGA DAISUKE)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：30467071

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし