

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月17日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24658180

研究課題名（和文） 自然水界中における現場細胞スナップショット解析技術の開発

研究課題名（英文） Snap-shot observation methods for natural aquatic microorganisms

研究代表者

長崎 慶三 (KEIZO NAGASAKI)

独立行政法人 水産総合研究センター 研究推進部 研究開発コーディネーター

研究者番号：00222175

研究成果の概要（和文）：微細藻類細胞の本来の形態を維持しつつ透過型電子顕微鏡(TEM)で観察するために、急速凍結置換固定法の適用を試みた。その結果、液化プロパンおよびポータブルディープフリーザーで冷却したアセトンを用いた固定液置換を行うことで、複数種の微細藻類について良質な TEM 試料の作製に成功した。同法の概要をウェブサイトで公開した (http://feis.fra.affrc.go.jp/keisou_Virus/kimura_freeze.html)。

研究成果の概要（英文）：The objective of the present study is to establish a novel method for TEM observation of microalgae by using the “rapid freezing and freeze substitution” techniques. By using a portable deep freezer and half-frozen acetone, several strains of microalga were nicely prepared for TEM observation. The new technique is introduced at a website for its dissemination: (http://feis.fra.affrc.go.jp/keisou_Virus/kimura_freeze.html).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード： (1) 透過型電子顕微鏡 (2) 植物プランクトン (3) 凍結置換法
(4) 赤潮 (5) 微細藻類 (6) 水圏微生物生態学

1. 研究開始当初の背景

沿岸域生態系の中核をなす単細胞性植物プランクトン（微細藻類）の動態を理解するため、これまでに多種多様な調査研究が行われてきた。その結果、多くの現場環境情報や各プランクトンの生態学的特性に関する情報が蓄積され、植物プランクトンに影響を及ぼす様々な環境パラメータに関するデータが蓄積されてきた。これに対して、植物プランクトン自身の生理状態・生理学的性状の評価については、ATP・呼吸・光合成活性等に

関する測定に多くを負っている一方、細胞内で生じる様々な生理的变化を簡便に把握・推定するための新技術の構築が長く望まれてきた。多くの植物プランクトンは単細胞であるため、生理状態の変化は細胞内微形態の変化に直接反映されると考えられる。したがって、それぞれの細胞内微細構造の変化が意味する事象を明らかにすることで、将来的には植物プランクトン細胞の性状・挙動をこれまでとは全く異なった観点から理解（診断）するための方法論が構築されるものと期待される。

通常、植物プランクトン細胞内部の微細構造観察には透過型電子顕微鏡 (TEM) が必要となる。一般に、TEM 試料の調製には煩雑な操作と作業者の熟練が要求される上、通常行われている化学浸潤固定法を用いた試料の作製過程では、多くの場合、人工的な形質変化 (アーティファクト) が生じ、本来の微細構造を完全に保った状態での試料観察はほぼ不可能である。そのため、現場環境中に存在するプランクトン細胞の生理状態を、電子顕微鏡観察により解釈・推定することはきわめて困難とされてきた。

本研究ではこの難問を解決すべく、微細藻類 TEM 試料作製工程への『急速凍結置換固定法』の導入・適用を着想した。これは、細胞を瞬時に超低温条件下で凍結し、あるがままの状態で細胞内微構造を固定・観察する手法である。多細胞生物研究の分野では、古くからこの手法の有効性が理解されており、細胞内微構造の観察に頻用されてきた。しかしながら、この固定法の適用には、生物種に合わせた微調整と方法論の構築が必要不可欠であり、多様な生物種を対象とする微生物生態学の分野では、諸条件の検討を課題としたまま『急速凍結置換固定法』の適用は見送られてきたのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究では、自然水界中に存在する単細胞性植物プランクトン細胞を、瞬時に超低温条件下で凍結・固定し、その細胞内微構造を、自然界中にあるそのままの状態を観察するための究極の技術開発に挑戦した。すなわち、天然のプランクトン細胞全体の時間をストップさせ、その微細構造をスナップショットとして詳細に捉えるための斬新な技術構築を目的とした。さらにこの「現場細胞スナップショット解析技術」を多くの研究者に利用してもらうため、可能な限り簡便かつ安価に実施することができるよう諸条件の一般化を行い、簡易マニュアルの確立・公表を目指した。本挑戦的萌芽研究を通して開発される技術が海洋研究分野において広く使われることで、プランクトン細胞の生理学的状態の推定、さらには赤潮個体群の増殖活性の推定等への適用も可能になるものと期待される。

3. 研究の方法

(1)急速凍結置換法の一般化： 沿岸海域を代表するプランクトン種の培養細胞に対して急速凍結置換固定を適用し、固定方法の一般化・最適化と固定成功率の向上を試みた。

(2)急速凍結置換固定の現場適用化： 現場の優占植物プランクトン種の定期的なサン

plingを行い、急速凍結置換法によって直接固定し電子顕微鏡観察に供した。夏季以降に小課題2を開始した関係上、それまでの春季～夏季を目途に手法の一般化(上記(1))をほぼ終了させた。

4. 研究成果

(1)急速凍結置換法の一般化に向け、複数系統群にまたがる5種の植物プランクトン *Heterosigma akashiwo* (ラフィド藻)、*Chattonella antiqua* (ラフィド藻)、*Heterocapsa circularisquama* (渦鞭毛藻)、*Chaetoceros tenuissimus* (珪藻)、*Teleaulax amphioxeia* (クリプト藻) について急速凍結置換法を試用した。これまで急速凍結置換法は細胞内での氷晶形成を抑えることが最も重要であり、液化プロパン中に急速にサンプルを投入し凍結すること、水分含有量を減らすこと、固定液置換中に-80度以下を保つことでこの氷晶形成が抑えられると報告されている。既存の急速凍結置換法では、特殊な機械を利用し急速にサンプルを液化プロパン中に投下する手法が有効とされているが、本研究では手動で資料を液化プロパン中に投入する手法で、急速凍結が充分可能であることを示した。さらに-80度以下の温度保持についても、市販のポータブルディープフリーザー中でアセトン冷やすことでこの温度を保つことができることが判明した。上記の結果は、手法を簡便化するという目的だけでなく、現場調査に機材として持ち込み、現場のサンプルを即急速凍結に供するために、本手法がきわめて有効である可能性を示している。

一方、これまで多細胞生物の組織で急速凍結置換を行う際は、多細胞組織であるがゆえに水分含有量を減らすこと、ならびに作業時の細胞塊の保持等が簡便であったが、本研究対象生物は単細胞であり、作業中に細胞塊(ペレット)が崩れやすいという難点があった。そのためヌクレオポアフィルター上にペレットを乗せ、その下からろ紙で水分を吸収したうえで、そのろ紙上で凍結置換作業をする手法を開発・適用した。本手法を上記5種の植物プランクトンに適用したところ、全種で良好な急速凍結置換固定像を観察することに成功した。

本研究により、植物プランクトンに対して急速凍結置換法を一般的に利用できる手法へと深化させ、さらに現場調査等にも応用しやすい手法にすることに成功した。

(2)現場細胞への適用試験： 本手法の現場適用化に向けて、夏季以降に優占した植物プランクトン種について、現場海水を直接急速凍結置換に供した。現場海域では、*Heterosigma akashiwo* や *polykrikos* sp. といったプランクト

ン種がブルームとして確認された。*H. akashiwo* での実験の結果、培養細胞時と同様の手法（急速凍結置換固定）により、氷晶を作ることなく良質の TEM 試料が得られることを確認した。さらに興味深いことに、現場サンプル中の *H. akashiwo* 細胞は、培養中の細胞に比べて液胞が発達していることが観察された。液胞は固定液の浸透圧によって、その形態に影響を受けやすい構造であることが知られており、液胞構造の発達を観察できたのは急速凍結置換法を用いた観察ならではの結果であると考えられた。また *H. akashiwo* では液胞の発達により塩分濃度変化に耐性を持っている可能性が示唆された。この結果は、*H. akashiwo* のブルーム発達機構の解明に本観察技法が応用できる可能性を示すものと思われる。

一方、*Polycrykos* sp. のブルーム期間中に本手法を適用してみたところ、観察したすべての細胞で良好な固定像は得られなかった。*Polycrykos* sp. は、細胞がきわめて巨大であり、平均的に急速凍結置換固定法が成功するサイズよりもかなり大きい。今後、本手法を発展応用する場合、対象とする植物プランクトンの細胞サイズを考慮しなければならないと考えられた。

本研究により、プランクトン細胞に急速凍結置換固定法を適用するための、簡便かつ汎用性の高い手法を開発することに成功した。さらに現場（船上）調査のように大型機器を使用しにくい環境下でも本手法を使用できる可能性を示した。植物プランクトン細胞が様々な環境でどのような形態を呈するかについて、現場レベルで調査できる道筋を示したことは本研究における最大の成果と言え、萌芽研究として意義ある研究となった。

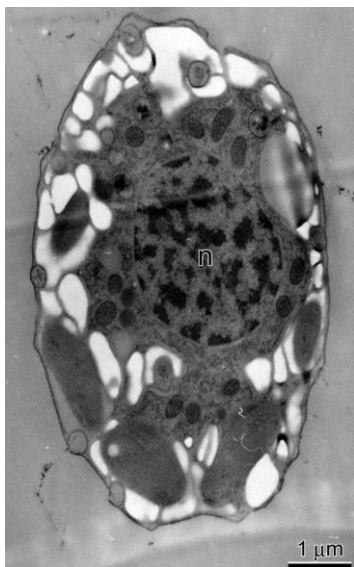


図1. 天然 *Heterosigma akashiwo* 細胞の断面像。培養細胞に比べ明らかに液胞が多い点が注目される。

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1件）

- ① Kei Kimura, Yuji Tomaru, Keizo Nagasaki. (2012) Ultrastructural observation of natural field phytoplankton cells by using rapid freezing and freeze substitution. *Plankton Benthos Res.* **7(3)**: 126-134. 査読有

〔学会発表〕（計1件）

- ① Keizo Nagasaki. Nano-sized wonder in red tides: surprised attack and peaceful coexistence. Abstract book of Viruse of Microbes meeting III, p.30 2012.7.18

〔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

http://feis.fra.affrc.go.jp/keisou_Virus/kimura_freeze.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

長崎 慶三 (KEIZO NAGASAKI)

独立行政法人 水産総合研究センター
研究推進部 研究開発コーディネーター
研究者番号：00222175

(2)研究協力者

木村 圭 (KEI KIMURA)

日本学術振興会特別研究員