

凍結置換法と連続切片法による酵母のストラクトーム解析

Structome of Yeast Cells Determined by Freeze-Substitution
and Serial Ultrathin Sectioning Electron Microscopy山口 正視^a, 岡田 仁^{a, b}, 並木 侑一^a

Masashi Yamaguchi, Hitoshi Okada and Yuichi Namiki

^a千葉大学・真菌医学研究センター^b認定NPO法人 総合画像研究支援

要 旨 細胞の微細形態は、電子顕微鏡観察をはじめとした、これまでの多くの研究によって明らかにされ、すべてが解明されているかのような印象がもたれている。しかし、細胞あたりのリボソームの数や、小胞体の数や細胞内分布など、細胞構造の定量的、三次元的解析はほとんどなされていなかった。われわれは、structure と -ome を組み合わせて、「ストラクトーム」という新語を造り、電子顕微鏡レベルにおける細胞の定量的、三次元的全構造情報を意味する新しい概念として提唱した。本稿では、酵母エキソフィアラ・デルマチチジスを材料として、凍結置換法と連続超薄切片法によりストラクトーム解析を行い、1個の細胞にリボソームは約20万個存在すること、ミトコンドリアは17～52個存在し、体積の10パーセントを占めること、小胞体は5～10個存在し、体積はわずか0.2パーセントを占めるにすぎないことなどを明らかにした。

キーワード：ストラクトーム、酵母、凍結置換法、連続超薄切片法、三次元再構築

1. はじめに

ヒトの身体を構成する細胞の数は約60兆個、ヒトの脳は150億個の細胞からなることがわかっている。しかし、例えば一個の酵母細胞に何個のリボソームが存在するのか、また、小胞体はどれだけの体積を占め、どのように分布しているのかなどは、わかっていない。「ストラクトーム」とは、structure と -ome から作られた造語であり、細胞のすべての成分の電子顕微鏡レベルでの三次元的、定量的全構造情報を意味する¹⁾。

ミトコンドリアをはじめとする細胞成分の電子顕微鏡レベルでの三次元的解析は、連続超薄切片法を用いて1969年よりなされてきた²⁾。特に、1973年のScienceに掲載された、サッカロミセスのミトコンドリアがすべてつながっていて一つであったという報告³⁾は有名である。この後も、ある細胞成分に着目した三次元的解析（たとえば分裂時における核微小管の定量的、三次元的解析⁴⁾）はなされているものの、細胞の全構成成分に関する解析は、なされていなかった。

本稿では、凍結置換法と連続超薄切片法を用いて行った、酵母エキソフィアラ・デルマチチジスのストラクトーム解析^{1,5)}について紹介する。

2. 材料と方法

材料は、千葉大学真菌医学研究センターで保存している *Exophiala dermatitidis* IFM 4844 株を用いた。酵母は、30°C で YPD 液体培地で好氣的に培養し、指数増殖期の細胞を遠心で集めて、2枚の銅版に細胞が一層になるようにはさみ、液体プロパンにより急速凍結した(図1)⁶⁾。2%オスミウム・アセトンで-80°Cで凍結置換したあと、エポキシ樹脂に包埋し、～90 nmの厚さの連続超薄切片を作製した。切片は、2スリットグリッドに拾い、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電

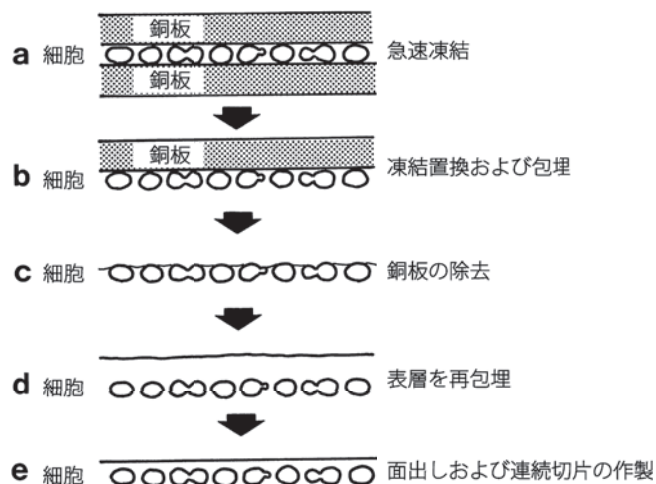


図1 凍結置換と連続超薄切片作製のための酵母の包埋法(文献6より)。

^a 〒260-8673 千葉市中央区玄鼻1-8-1

TEL: 043-226-2796 又は 043-222-7171 (内線 5928) ;

FAX: 043-226-2486

E-mail: yama@faculty.chiba-u.jp

2010年8月12日受付

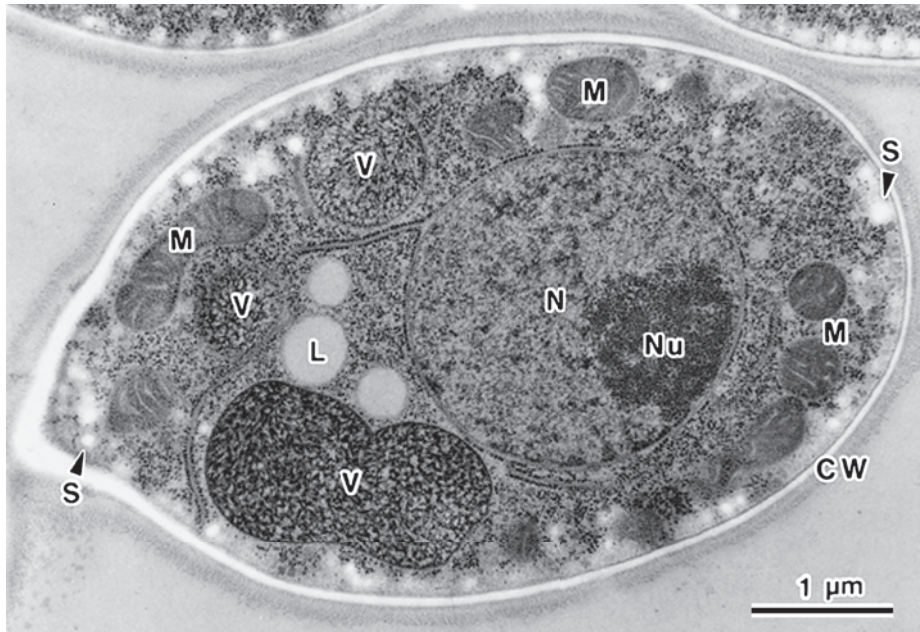


図2 酵母エキソフィアラ・デルマチチジスの凍結置換法による超薄切片像。

細胞壁 (CW), 脂肪滴 (L), ミトコンドリア (M), 核 (N), 核小体 (Nu), 貯蔵物質 (S), 液胞 (V) が明瞭に観察できる (文献7より)。

子染色して、日本電子JEM-1200EX 電子顕微鏡により、1万倍で撮影を行った。

本解析のために2,003枚のネガを撮影した。また、16個の細胞の連続超薄切片を1枚も欠けることなく撮影したが、細胞成分の数と体積の計測には、このうち、G1期の細胞を5個選んで用いた。

3. 結果と考察

図2に *E. dermatitidis* の超薄切片像を示す。凍結置換法は、細胞構造の自然な形態を保持したまま、高い解像度で観察することを可能にした。図3は、細胞壁と原形質膜 (a)、液胞と液胞膜 (b)、核膜と粗面小胞体 (c)、ミトコンドリア (d)、ゴルジ装置 (e)、小胞 (f)、オートファゴソーム (g)、紡錘極体 (h)、多胞体 (i)、グリコーゲン顆粒 (j)、微小管 (k)、微小繊維 (l) を拡大して示したものである。表1は、さまざまなオルガネラや細胞成分の数、表2は、それらの長さや直径、表3は、さまざまなオルガネラの膜の厚さを計測したものである。また、図4は、サイトゾル、細胞壁、ミトコンドリア、核、液胞などの体積の割合、図5は、個々のミトコンドリアの体積の分布を示したものである。

本稿では、電子顕微鏡写真 (図2, 3)、定量的データ (表1-3, 図4, 5)、および三次元再構築像 (図6) を総合的に分析して、細胞のストラクチャー解析を行った。

3.1 細胞

E. dermatitidis のG1期の細胞は、直径が $\sim 3.6 \mu\text{m}$ 、長さが $\sim 4.9 \mu\text{m}$ (表2)、体積は $\sim 36 \mu\text{m}^3$ であった。

3.2 細胞壁

3層からなっており、厚さは $\sim 225 \text{nm}$ であった (図2,

3a)。また、体積は $\sim 7.8 \mu\text{m}^3$ で細胞の体積の ~ 22 パーセントを占めていた (図4)。

3.3 原形質膜

厚さは $\sim 16.6 \text{nm}$ で、3層からなっていた (図3a, 表3)。

3.4 核、核膜、核孔、および核小体

G1期の核の直径は、 $\sim 1.8 \mu\text{m}$ 、体積は $\sim 2.6 \mu\text{m}^3$ で、細胞の体積の ~ 7 パーセントを占めていた (図4)。核膜は、外膜、内膜ともに、厚さは $\sim 9.5 \text{nm}$ であった (表3)。核孔は直径が $\sim 100 \text{nm}$ で、核小体は体積が $\sim 0.4 \mu\text{m}^3$ で、核の体積の ~ 16 パーセントを占めていた。

3.5 ミトコンドリア

直径は $\sim 0.4 \mu\text{m}$ 、長さは $0.2 \sim 4 \mu\text{m}$ で (表2)、明瞭なクリステが観察された (図3d)。個々の細胞におけるミトコンドリアの体積分布を図5に示す。細胞あたり17-52個のミトコンドリアが観察されたが、細胞あたりの体積はほぼ一定で ~ 10 パーセントを占めていた (図4)。Stevens⁸⁾は、サッカロミセスで、ひとときわ大きいジャイアントミトコンドリアを観察しているが、本研究で用いたエキソフィアラでは、そのようなミトコンドリアは観察されなかった。

3.6 小胞体とリボソーム

小胞体は、細胞あたり5-10個存在し (表1)、 ~ 0.2 パーセントの体積を占めるにすぎず、動物細胞の場合とは、大きく異なることがわかった。リボソームは、細胞あたり ~ 20 万個存在することがわかった (表1)。

3.7 ゴルジ装置と小胞

エキソフィアラでは、層板をなすゴルジ装置 (図3e) はほとんど観察されなかった (表1)。小胞は $\sim 55 \text{nm}$ で、中に電子密度の高いものと電子密度の低いものがあることがわ

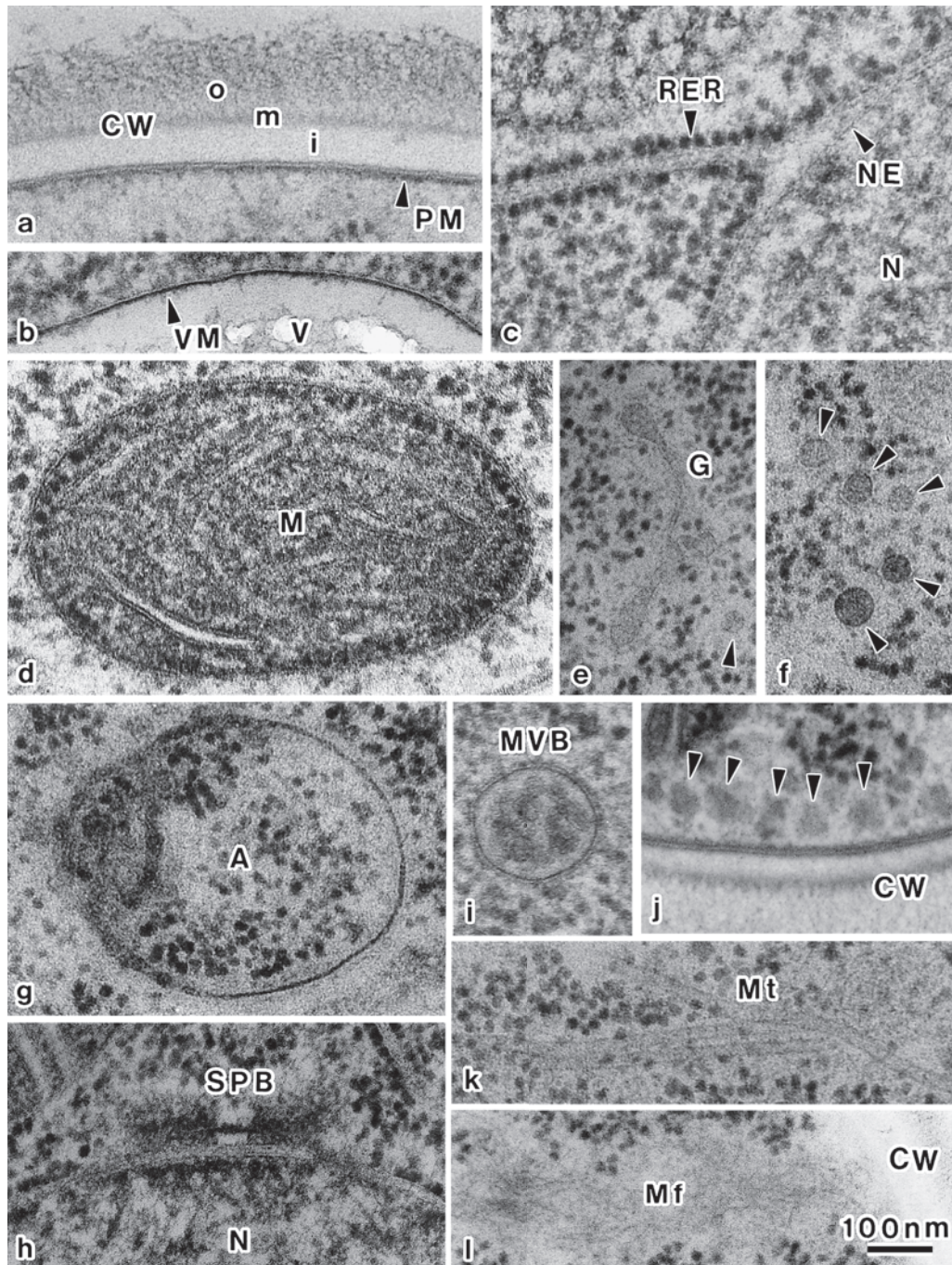


図3 いろいろな細胞成分の拡大像。

(a) 細胞壁 (CW) と原形質膜 (PM). o: 細胞壁外層, m: 細胞壁中層, i: 細胞壁内層, (b) 液胞 (V) と液胞膜 (VM), (c) 粗面小胞体 (RER), 核膜 (NE) および核 (N), (d) ミトコンドリア (M), (e) ゴルジ装置 (G) と小胞 (矢頭), (f) 小胞 (矢頭), (g) オートファゴソーム (A), (h) 紡錘極体 (SPB), 核 (N), (i) 多胞体 (MVB), (j) グリコーゲン顆粒 (矢頭), 細胞壁 (CW), (k) 微小管 (Mt), (l) 微小線維 (Mf), 細胞壁 (CW), (a-1) スケール=100 nm (文献1より).

かった (図3f).

3.8 液胞, オートファゴソーム, 多胞体, および脂肪滴
液胞は, 細胞あたり1-4個存在し (表1), 4-10パーセントの体積を占めていた. オートファゴソームは, 細胞あたり1-7個存在し (表1), ~0.1パーセントの体積を占めていた. 多胞体は, 小胞の中に直径~40 nmの小胞をもつオルガネ

ラで (図3i), リソソーム系の一部であると考えられている. 脂肪滴は, 電子密度が小さく, 球状を呈する (図2).

3.9 紡錘極体, 微小管, および微小線維

紡錘極体は, 核膜の外側に位置し, 2個の円盤状構造物が線維状のものでつながった構造を持つ (図3h). 紡錘極体の細胞周期における動態については, 文献9-10を参照された

表1 酵母エキソフィアラ・デルマチチジスのオルガネラおよび構成成分の細胞あたりの個数（文献5より）

オルガネラ／構成成分	細胞1	細胞2	細胞3	細胞4	細胞5	平均±標準偏差
核	1	1	1	1	1	1±0
核小体	1	1	1	1	1	1±0
ミトコンドリア	19	18	17	22	52	25.6±14.8
小胞体	8	10	5	8	8	7.8±1.8
リボソーム	119,000	220,000	112,000	191,000	336,000	195,000±90,000
リボソーム/μm ³	10,100	11,400	10,600	9,700	13,400	11,000±1,500
ゴルジ装置	0	0	0	0	1	0.2±0.4
小胞	18	25	36	26	67	34.4±19.3
液胞	4	1	4	2	4	3.0±1.4
オートファゴソーム	6	1	2	7	1	3.4±1.9
多胞体	1	2	3	2	2	2±0.7
脂肪滴	2	4	7	9	9	6.2±3.1
紡錘極体	1	1	1	1	1	1±0
微小管	21	39	14	13	36	24.6±12.2
グリコーゲン顆粒	686	820	580	730	2040	970±600

表2 酵母エキソフィアラ・デルマチチジスの細胞と各成分の長さ
と直径（平均±標準偏差）（文献5より）

細胞成分	長さ	直径	計測数
細胞	4.88±0.59 μm	3.62±0.38 μm	20
核		1.79±0.24 μm	20
ミトコンドリア		0.39±0.10 μm	76
リボソーム		22±3 nm	40
小胞		55±11 nm	112
液胞		1.11±0.55 μm	20
オートファゴソーム		0.24±0.10 μm	20
多胞体		0.19±0.03 μm	10
脂肪滴		0.28±0.17 μm	22
グリコーゲン顆粒		62±13 nm	63
微小管		24.7±1.0 nm	20
微小管	0.78±0.78 μm		87

い。微小管（図3k）は、直径～25 nmで、細胞あたり13-39本存在していた（表1）。微小線維は直径～7 nmで、原形質膜につながっている像もえられた（図3l）。

3.10 グリコーゲン顆粒と貯蔵物質

グリコーゲン顆粒は、電子密度の高いロゼット様の顆粒で、～62 nmの直径を持つ（図3j）。貯蔵物質は、球状の電子密度の低い構造物で（図2）、細胞の体積の4-11パーセントを占めていた（図4）。

3.11 サイトゾル

細胞の体積の43-53パーセントを占めていた（図4）。

3.12 膜系

エキソフィアラ細胞の膜系は、厚さと構造の違いから、次の3つのグループに分けられると考える。即ち、14-17 nmの厚さを持ち、3層構造を持つ原形質膜、液胞膜、多胞体のグループ、9-10 nmの厚さを持ち、3層構造を持つミトコンドリアの外膜とクリステ、小胞体、核膜のグループ、～12 nmの厚さを持ち、3層構造を持たないオートファゴソームのグループである（表3）。

表3 各オルガネラの膜の厚さ（平均±標準偏差）（文献5より）

	合計の厚さ (nm)	外葉 (nm)	中葉 (nm)	内葉 (nm)	計測数
原形質膜	16.6±2.0	4.5±0.9	5.1±1.2	7.0±1.3	20
液胞膜	14.7±3.6	3.8±0.9	4.9±2.2	6.0±1.3	16
多胞体	14±1.9	4.3±0.9	3.5±0.7	6.2±0.8	15
核膜	外膜	9.2±0.9			20
	内膜	9.5±1.3			20
小胞体	9.6±1.6				14
ミトコンドリア	外膜	9.9±1.8	3.4±0.6	3.1±0.8	20
	クリステ	10.2±0.8			20
オートファゴソーム	12.0±3.3				7

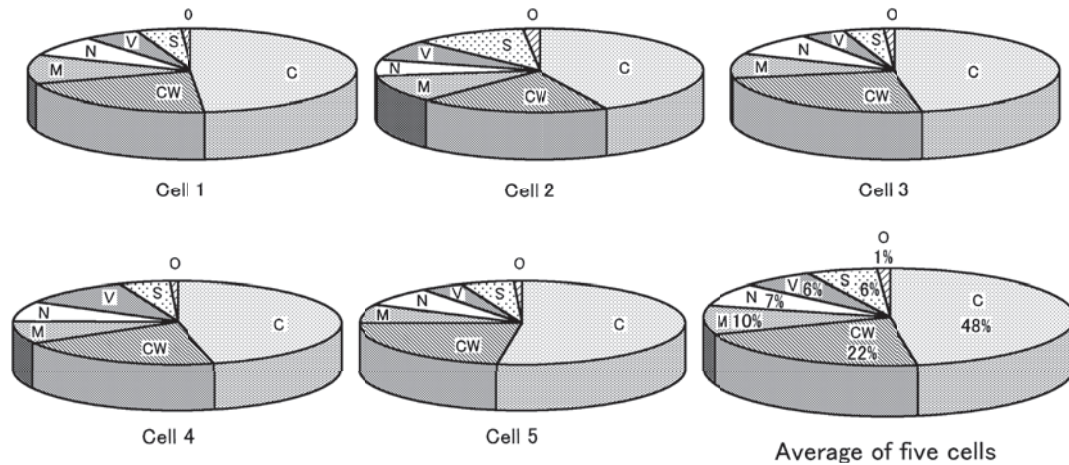
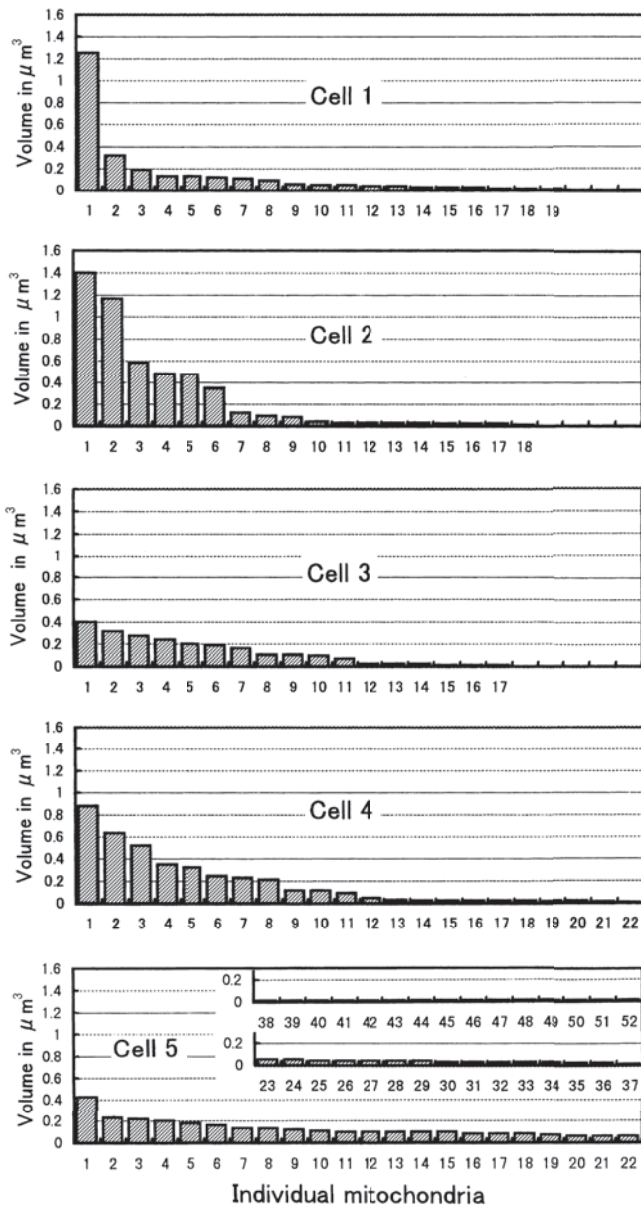


図4 5個の細胞におけるサイトゾル (C), 細胞壁 (CW), ミトコンドリア (M), 核 (N), 液胞 (V), 貯蔵物質 (S) およびその他の成分 (O) の細胞に占める割合. 右下の図は5個の細胞の平均値. その他の成分は, 小胞体, ゴルジ装置, オートファゴソーム, 多胞体, 脂肪滴, 紡錘極体, 微小管, 微小線維およびグリコーゲン顆粒を含む (文献5より).



4. おわりに

ゲノムは, 生物の全遺伝子情報であり, 周知のように, ヒトをはじめとする多くの生物で解析がなされている. また, プロテオームは, 生物の全タンパク質情報であり, この解析も盛んになされている. 「ストラクトーム」は, ゲノム, プロテオームと並ぶ基本的, かつ重要な概念であり, 細胞を単位とした生命現象を理解するための必須の情報である. われわれは2003年に, 世界初の酵母のストラクトーム解析を行ない, 細胞あたり, ミトコンドリアは17-52個存在し, 体積の10パーセントを占めること, 小胞体は5-10個存在し, わずか0.2パーセントの体積を占めるにすぎないこと, リボソームは, 1細胞に約20万個存在することなどを明らかにした⁵⁾. (ただし, 「ストラクトーム」という新語は, この解析から3年後に提案された¹⁾.)

最近, われわれが提案した「ストラクトーム」と同様な考え方のもとに, 電子線トモグラフィー¹¹⁻¹³⁾, 走査電子顕微鏡¹⁴⁾, ソフトX線トモグラフィー¹⁵⁾, およびX線回折顕微鏡¹⁶⁾などを用いて, 全細胞構造の三次元再構築がなされている. また, 「ストラクトーム」の情報を, 遺伝子情報と同様に世界的に登録してネットで共有しようという提案がなされ, The Cell Centered Database (CCDB) が立ち上げられた¹⁷⁾. 現在, 個々の細胞内タンパク質を電子顕微鏡レベルで同定する技術がさらに進化しつつあり, 全遺伝子とタンパク質と細胞構造を直接結びつけることが可能となれば, ストラクトーム解析は, 細胞機能を理解する上で重要な役割を果たすものと思われる.

図5 5個の細胞における個々のミトコンドリアの大きさの分布. エキソフィアラには, いろいろな大きさのものが多数存在する (文献5より).

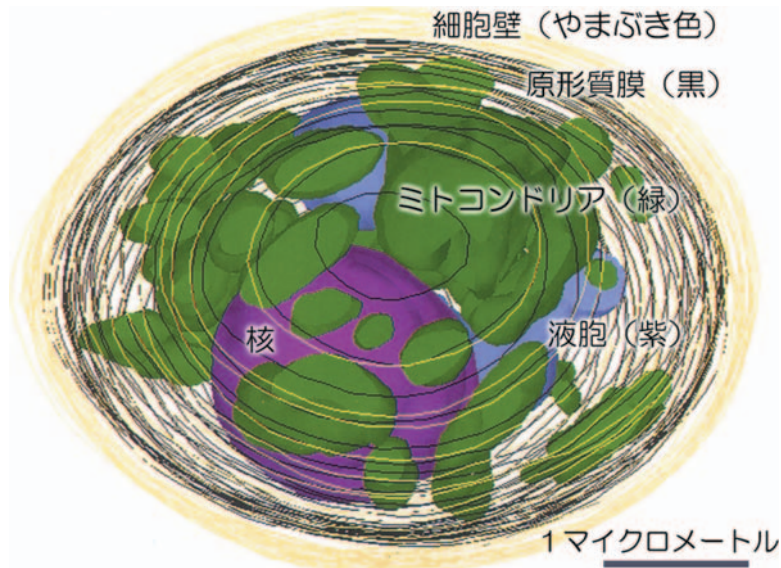


図6 酵母エキソフィアラ・デルマチチジスの細胞の三次元再構築像 (文献5より)。

5. 謝 辞

本研究にご協力いただいた Sondip Kumar Biswas 博士と直江紀英氏に心から感謝したい。また、本研究は2007～2008年度の文部科学省科学研究費 (No. 19570053) の補助を受けた。

文 献

- 1) Yamaguchi, M.: *Current Trends in Microbiology*, 2, 1–12 (2006)
- 2) Keddie, F.M. and Barajas, L.: *J. Ultrastructure Res.*, 29, 260–275 (1969)
- 3) Hoffmann, H.P. and Avers, C.J.: *Science*, 181, 749–751 (1973)
- 4) Winey, M., Mamay, C.L., O'Toole, E.T., Mastronarde, D.N., Giddings, T.H.Jr, McDonald, K.L. and McIntosh, J.R.: *J. Cell Biol.*, 129, 1601–1615 (1995)
- 5) Biswas, S.K., Yamaguchi, M., Naoe, N., Takashima, T. and Takeo, K.: *J. Electron Microsc.*, 52, 133–143 (2003)
- 6) Yamaguchi, M., Okada, H. and Namiki, Y.: *J. Electron Microsc.*, 58, 261–266 (2009)
- 7) Yamaguchi, M., Biswas, S.K., Kita, S., Aikawa, E. and Takeo, K.: *J. Electron Microsc.*, 51, 21–27 (2002)
- 8) Stevens, J.B.: *Biol. Cellulaire*, 28, 37–56 (1977)
- 9) Yamaguchi, M., Biswas, S.K., Suzuki, Y., Furukawa, H., Sameshima, M. and Takeo, K.: *Exp. Cell Res.*, 279, 71–79 (2002)
- 10) Yamaguchi, M., Kuwabara, Y., Shimizu, M., Furukawa, H., Nishioka, H. and Takeo, K.: *Eur. J. Cell Biol.*, 82, 531–538 (2003)
- 11) Höög, J.L., Schwartz, C., Noon, A.T., O'Toole, E.T., Mastronarde, D.N., McIntosh, J.R. and Antony C.: *Dev. Cell*, 12, 349–361 (2007)
- 12) Noske, A.B., Costin, A.J., Morgan, G.P. and Marsh, B.J.: *J. Struct. Biol.*, 161, 298–313 (2008)
- 13) Koning, R.I. and Koster, A.J.: *Ann. Anat.*, 191, 427–445 (2009)
- 14) Denk, W. and Horstmann, H.: *PLoS Biol.*, 2, e329 (2004)
- 15) Uchida, M., McDermott, G., Wetzler, M., Le Gros, M.A., Myllys, M., Knoechel, C., Barron, A.E. and Larabell, C.A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 19375–19380 (2009)
- 16) Jiang, H., Song, C., Chen, C.-C., Xu, R., Raines, K.S., Fahimian, B.P., Lu, C.-H., Lee, T.-K., Nakashima, A., Urano, J., Ishikawa, T., Tamanoi, F. and Miao, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 11234–11239 (2010)
- 17) Martone, M.E., Tran, J., Wong, W.W., Sargis, J., Fong, L., Larson, S., Lamont, S.P., Gupta, A. and Ellisman, M.H.: *J. Struct. Biol.*, 161, 220–231 (2008)