

SEMによるミトコンドリアネットワーク構造の可視化

Mitochondrial Network-Structures Visualized with Scanning Electron Microscopy

名黒 知徳, 中根 裕信, 稲賀すみれ, 亀家 俊夫, 海藤 俊行

Tomonori Naguro, Hironobu Nakane, Sumire Inaga, Toshio Kameie and Toshiyuki Kaidoh

鳥取大学医学部解剖学講座

要 旨 ラット嗅球の顆粒細胞に存在するネットワーク状に連結したミトコンドリアの三次元構造を走査電顕で調査・検討した。多様な形態を示すミトコンドリアのネットワークを形態的特徴によって4グループに分類した。タイプ1: ほぼ均一な太さ(約250–300 nm)の分岐した細管で構成される。タイプ2: 異なる2種類の太さ(約250–300 nmと約100 nm)の細管で構成される。タイプ3: 球状の部分(直径約1.0 μm)と糸状の部分(太さ約50 nm)で構成され数珠状を呈する。タイプ4: 多様な形の複数の部分で構成される。光学顕微鏡や透過電子顕微鏡で観察されたミトコンドリアのネットワークに関する最近の研究を紹介し、ネットワークの形態的多様性と機能的意義について考察するとともに、走査電顕での研究方法の利点と欠点を解説した。

キーワード: ミトコンドリア, 顆粒細胞, 嗅球, 電子顕微鏡, 走査電顕

1. はじめに

酵母のミトコンドリアが1つの連続したネットワークを形成していることを1973年にHoffmannとAversが発見¹⁾して以来、ミトコンドリアネットワークの存在について、多様な生物細胞で報告がされてきた。1970年代から80年代にかけては透過電顕(TEM)を用いた連続超薄切片の再構成によってネットワークの三次元構造が解析された。しかし、当時の研究材料は原生生物、藻類および一部の哺乳類の培養細胞に限定されていた²⁾。90年代初頭から培養細胞や単細胞生物の共焦点顕微鏡観察が盛んに行われて、ミトコンドリアの形態研究が急速に発展した。特に生細胞のミトコンドリアを、顕微鏡動画として捉えることが可能となったことによりミトコンドリアネットワークの動態が明らかになってきた^{3,4)}。さらに最近10年間に、ネットワークの動態と編成を調節する分子機序が明らかになりつつある。

今日では、多くの証拠に基づいて、ミトコンドリアは融合や分裂を継続的に繰り返しながら連続したネットワークを形成する動的な細胞小器官と考えられている⁵⁾。ミトコンドリアが形成するネットワークの機能的意義については、これまでに様々な培養細胞や単細胞生物の観察結果に基づいて盛んに議論されてきた。しかし、生体組織中の細胞を用いた研究報告は限られており、とりわけ生体の神経細胞においてミトコンドリアがネットワークを形成するかどうかは最近まで明らかでなかった。我々は、走査電顕(SEM)を用いてラッ

ト嗅球顆粒細胞のミトコンドリアを観察することにより⁶⁾、哺乳動物の生体内の神経細胞もミトコンドリアのネットワークを形成することを初めて明らかにした。本稿ではこの研究報告を中心に、SEMで観察したミトコンドリアネットワークの三次元構造を紹介し、その機能的意義について考察すると同時に、SEMによる細胞内構造研究の利点と問題点について解説する。

2. 顆粒細胞の細胞体(核周囲部)のミトコンドリア

哺乳類嗅球の顆粒細胞は小型の神経細胞で、1本の大きな樹状突起と数本の短い神経突起を持つが、軸索はない。AODO法と呼ばれるオスミウム浸軟法により作成した顆粒細胞のSEM像を図1に示す。この方法を用いると、試料作成過程の浸軟処理の段階で、細胞質基質が割断面から除去されるため、核、小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリアなどの膜性細胞小器官の三次元構造が立体的に露出される。その中で、ミトコンドリアの同定は割断面においてクリステと呼ばれる特徴的な内部構造が確認できれば容易である(図2)。図1では、直径約5 μmの核は小さな細胞体(約8 μm)の中央で大きな部分を占めているため、核が邪魔をしてミトコンドリアの空間配置のほとんどは覆い隠されている。そのため、ミトコンドリアは一見するとTEMの超薄切片画像と同じように、細胞体中に複数のものが別々に分散して存在しているように見える。ここで1つの重要な疑問が生じる。細胞内に分散しているように見える複数のミトコンドリアは、それぞれがバラバラに存在しているのか、あるいは実際には互いに連結しているのだろうか? これを検討するために、核が割断面から脱落した細胞を観察すると、ミトコンドリアは細胞体全体に分布する連続したネットワーク構造として出現する(図3~8)。

〒683-8503 米子市西町 86
TEL: 0859-38-6013; FAX: 0859-38-6010
E-mail: tomo796@med.tottori-u.ac.jp
2014年9月29日受付

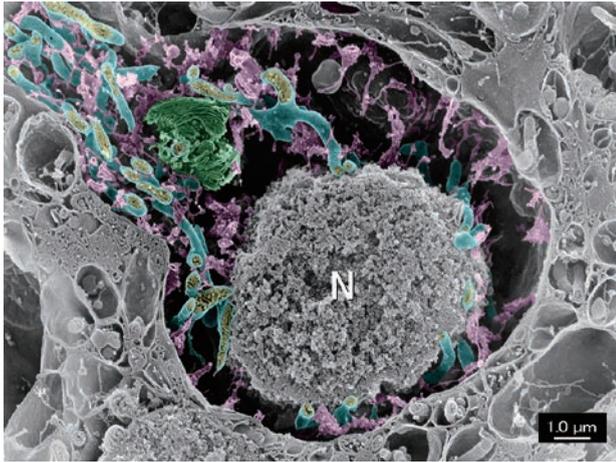


図1 ラット嗅球顆粒細胞の切断像. 小さな細胞体の大部分を核(N)が占めている. 細胞小器官の空間配置は不明瞭である. 顆粒細胞は一本の樹状突起(左上角)を持っている. ER(マゼンタ), ゴルジ装置(緑), ミトコンドリア外膜(青), クリステ(黄).

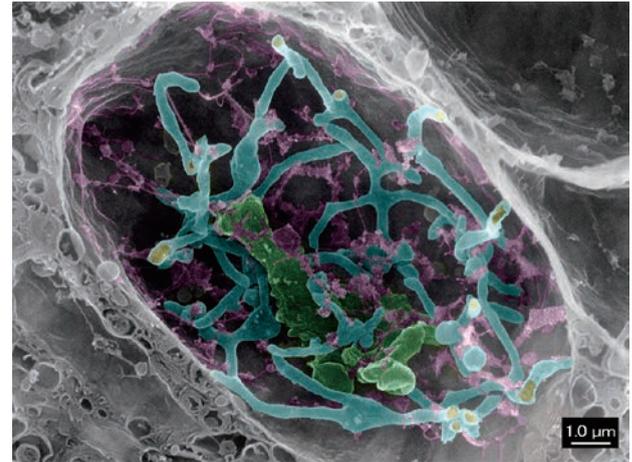


図3 ミトコンドリアネットワーク(タイプ-1)の弱拡大像. ミトコンドリア(青)は細胞体の全体に広がり, 1つの大きなネットワークを形成している. ネットワークを構成している管の幅はほぼ均一で約250-300 nmである. ゴルジ装置(緑), ER(マゼンタ), クリステ(黄).

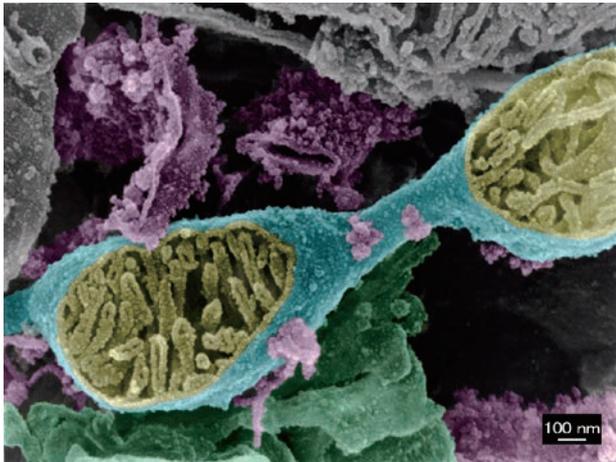


図2 ミトコンドリアネットワーク(タイプ-4)の一部拡大像. ミトコンドリア内のクリステ(黄)は保存状態が良く変形を認めない. ミトコンドリア外膜(青), ゴルジ装置(緑), ER(マゼンタ).

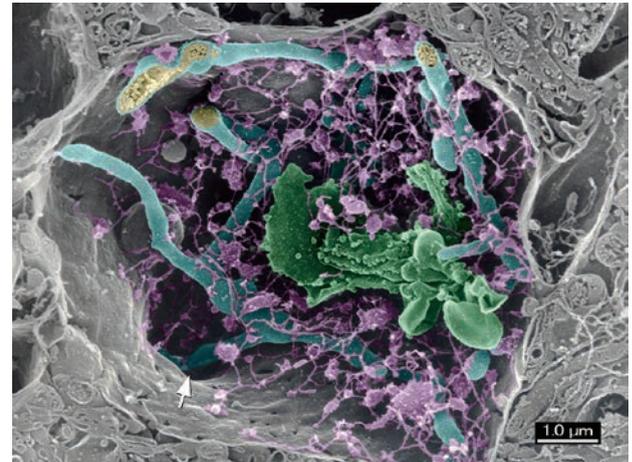


図4 ミトコンドリアネットワーク(タイプ-1). 左下の大きな穴は樹状突起への入口. 細胞体のミトコンドリアは長く伸びて樹状突起内に続いている(白矢印). rERは球状或不規則形の嚢を形成しながら常に糸状のsER(直径約25 nm)と連結している. それらはミトコンドリアネットワークとは異なるネットワークを形成している. ゴルジ装置(緑), ER(マゼンタ), ミトコンドリア外膜(青), クリステ(黄).

すなわち, 1つの顆粒細胞には単一のミトコンドリアネットワークを認める. ネットワーク構造は個々の細胞によって変化に富んでいるが, 形態的特徴に基づいて, 次項のように4つのグループに分類することが可能である.

3. ミトコンドリアネットワークの分類

3.1 タイプ-1 (図3, 4)

タイプ-1は最も典型的なミトコンドリアネットワークである. 分岐・吻合するネットワークは, ほぼ均一な太さの細管(幅約250-300 nm)で構成されており, 他のタイプと比べて最も単純である.

3.2 タイプ-2 (図5)

ミトコンドリアネットワークは太さの異なる2種類の細管

で構成されている. ネットワークの構成主体はタイプ-1と同じ太さの細管で, その細管から細長い糸状細管(太さ約75 nm)が伸びて自由端となっている. 両細管の移行部では, 細管の太さは急激に変化している. 糸状細管の長さは変化に富み数 μm に及ぶことがある. また, 糸状細管は時折, 二分している. このタイプの出現頻度は稀である.

3.3 タイプ-3 (図6, 7)

球状部分と細長い糸状細管部分が繰り返し連結し, いわゆる数珠状“beads on a string”のミトコンドリアネットワークを形成している(図7). ネットワークは独特な形状なので他のタイプとの区別は容易である. 球状部分は直径約

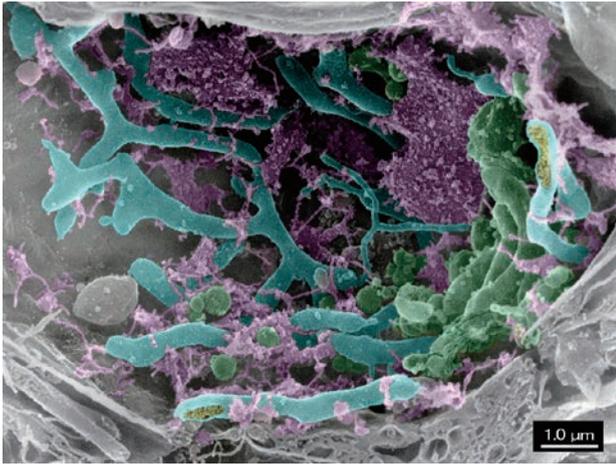


図5 ミトコンドリアネットワーク (タイプ-2). ネットワークは幅の異なる2つの部分で構成されている. 細い糸状部分(直径約75 nm)は普通サイズの管状部分(直径約250-300 nm)の端から始まっている. rERは多様な形と大きさを示す. 一方, sERは常に直径約25 nmの細い糸状をしている. ゴルジ装置(緑), ER(マゼンタ), ミトコンドリア外膜(青), クリステ(黄).

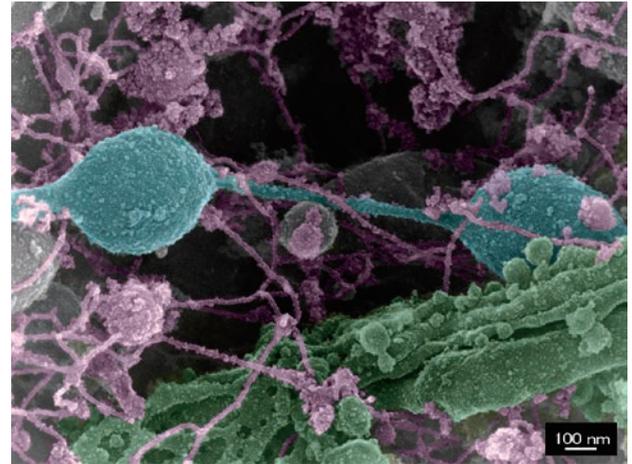


図7 ミトコンドリアネットワーク (タイプ-3)の一部拡大像. 二つの球状部分をつないでいる細い糸状部分の幅は直径45 nmである. このサイズはすぐ近くを平行に走っている糸状のsERのおよそ2倍の太さである. ゴルジ装置(緑), ER(マゼンタ), ミトコンドリアの外膜(青).

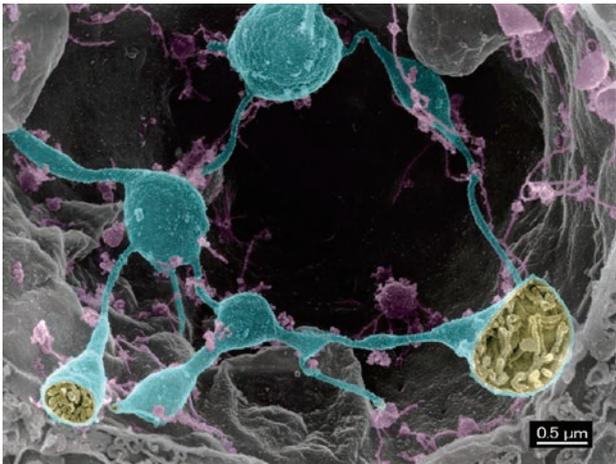


図6 ミトコンドリアネットワーク (タイプ-3). 大きな球状部分と細い糸状部分から構成されるネックレスのようなループを形成している. 切断された球状部分で観察される内部のクリステ(黄)は保存状態が良く変形を認めない. ミトコンドリア外膜(青), ER(マゼンタ).

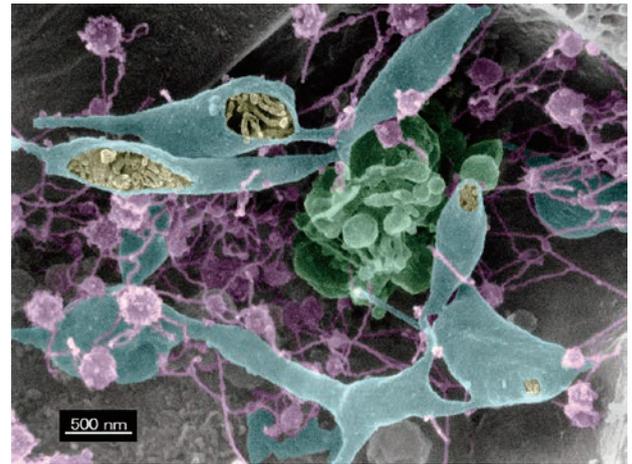


図8 ミトコンドリアネットワーク (タイプ-4). このタイプのネットワークは最も変化に富んでいる. 紡錘状, 球状, 細管状あるいは不規則な構造が短い糸状の部分によって連結されている. ゴルジ装置(緑), ER(マゼンタ), ミトコンドリア外膜(青), クリステ(黄).

1.0 μm で, 糸状細管部分は太さ45-100 nmである. 糸状細管の最も細いところは45 nmときわめて細く, 顆粒細胞のミトコンドリアネットワークでは最小である(図7). タイプ-3のネットワークはリング状に繋がって1つのネックレス様構造を形成することもある(図6). 球状部分が切断されると内部のクリステが観察される(図6). クリステの形態は正常で保存状態が良好である. このタイプのミトコンドリアネットワークの出現頻度は稀である.

3.4 タイプ-4 (図8)

4種類のネットワークの中で形が最も変化に富んでいる. 紡錘状, 球状, 細管状あるいは不規則な構造が短い糸状細管によって連結されている.

ミトコンドリアネットワークを分類した模式図を図9に示す. タイプ-1とタイプ-4の出現頻度が高いが, タイプ-2やタイプ-3の出現頻度は稀である. ミトコンドリアネットワークの多様性の意義については後述する(セクション6.3).

4. 樹状突起内のミトコンドリア

顆粒細胞の長く蛇行した樹状突起が, 長軸方向にうまく切断されると, 内部のミトコンドリアが観察できる(図10). 樹状突起内のミトコンドリアは顆粒状ではなく, 樹状突起の長軸方向に並ぶ細長い管状をしている. 図10中央の細長いミトコンドリアは, 右側にある細胞体のミトコンドリアとは連結していないように見える. しかし, 樹状突起基部の断面

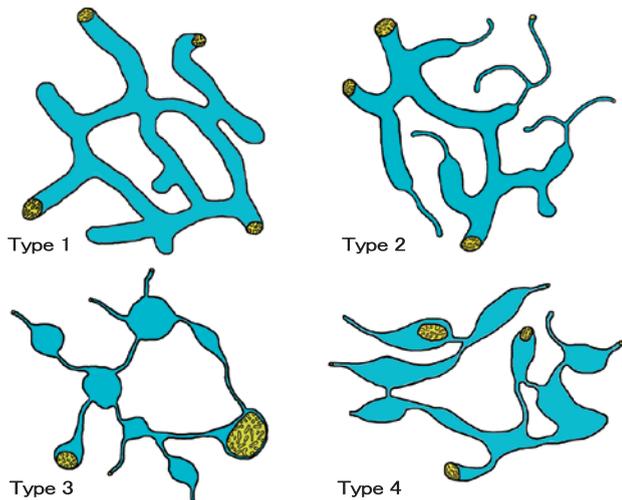


図9 ミトコンドリアネットワークの分類模式図. タイプ-1は比較的均一な太さの管状部分で構成される. タイプ-2は異なる2種類の太さの管状部分で構成される. タイプ-3は球状および糸状の2種類の部分で構成される. タイプ-4は多様で不規則な構造が短い糸状部分によって連結されている. ミトコンドリア外膜 (青), クリステ (黄).

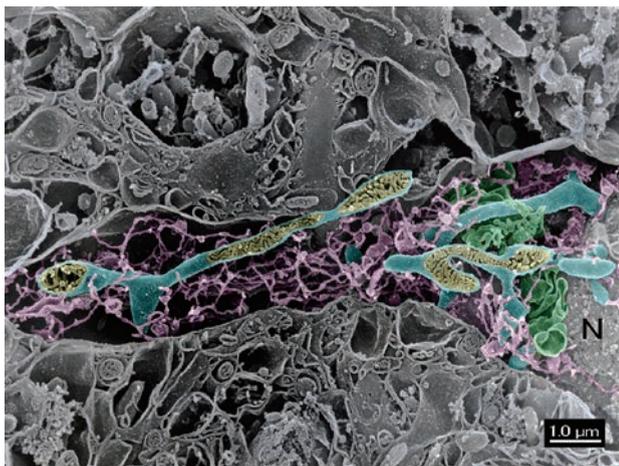


図10 嗅球顆粒細胞の樹状突起の断面(長軸方向). 樹状突起の長軸方向に沿って細長いミトコンドリア (外膜: 青, クリステ: 黄) が存在する. この写真では, 樹状突起内のミトコンドリアと細胞体のミトコンドリアネットワークとの連続性を確認できない (連続性は図4と図11を参照). 豊富な糸状のsER (マゼンタ) がネットワークを形成している. 核(N), ゴルジ装置(緑).

を観察すると, 細胞体のミトコンドリアが樹状突起に伸びている様子がしばしば認められ, 細胞体のミトコンドリアネットワークと樹状突起のミトコンドリアは連続していると思われる (図4, 11).

5. 顆粒細胞の小胞体とゴルジ装置

SEM像では, 粗面小胞体 (rER) は細胞質側に多数のリボソームが付着しているため, 他の細胞小器官と容易に区別できる (図2, 5, 7, 8, 10). 顆粒細胞は他の大きな神経細胞と比較すると rER の発達が極端に貧弱であり, 細胞質

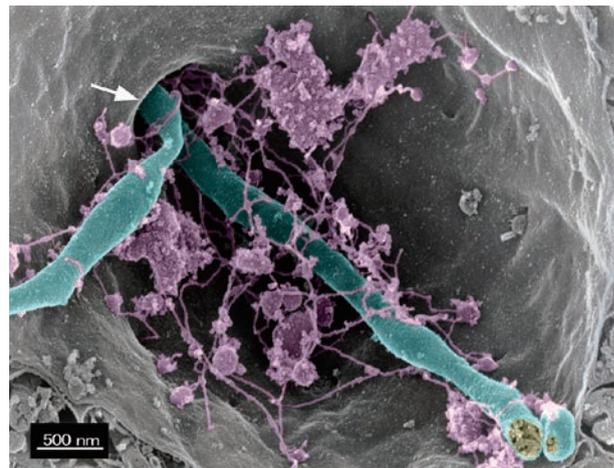


図11 顆粒細胞の細胞体側から見た樹状突起の起始部. 細胞体に位置する細長い管状のミトコンドリア (外膜: 青, クリステ: 黄) は樹状突起起始部の大きな穴 (白矢印) を通って樹状突起内部へと伸びている. ER (マゼンタ).

で rER が占める領域は少ない. 顆粒細胞の rER は小さく扁平な囊状構造 (図2, 5) あるいは小球状構造 (図4, 7, 8) を呈するが, 一般に rER が発達した細胞で観察される層板状構造を呈することはない. 一方, 滑面小胞体 (sER) はよく発達しており, 太さ約 25 nm の細管として認められる (図3, 4, 7, 10). ミトコンドリアとよく発達した sER は至る所で互いに隣接しており, 特に, 樹状突起内ではミトコンドリアは sER に囲まれている (図10).

顆粒細胞ではゴルジ装置の発達は悪いが, 数個のゴルジ嚢が積み重なった, いわゆるゴルジ層板が樹状突起の起始付近の核周囲部に認められる (図1, 3, 4, 5, 7, 8, 10). ゴルジ装置は他の多くの細胞ではもっと複雑な構造⁷⁻⁹⁾ であることが多いが, 顆粒細胞では比較的単純な形態をしている. 顆粒細胞のゴルジ装置はミトコンドリアとしばしば隣接している.

6. 分析と考察

6.1 連続したミトコンドリアネットワークの存在

ミトコンドリアネットワークは発見当初, 連続超薄切片法を用いて, 原生物, 藻類, 真菌などで観察されてきた (総説^{2,3,10)} 参照). これらの研究では, ネットワークは生物の特定の細胞周期に出現するという報告が多かったため, 細胞周期に関連する現象であると考えられていた. その後, 生きた培養細胞の研究から, ネットワークは特定の細胞周期以外に, 特定の生理的あるいは機能的状態でも出現することが証明された. 今日では, ネットワークの形成は非常に動的な現象であり, ミトコンドリアは常に融合と分裂を繰り返しながら形を変える細胞小器官であると考えられている^{5,11)}. 培養細胞では, ほとんどの真核細胞がミトコンドリアのネットワークを形成することが明らかとなってきたが, 哺乳類の生体内の細胞ではミトコンドリアが連続したネットワークを形成するという報告はわずかしかない²⁾. 今回, 我々はよく発達したミトコンド

リアのネットワークを生体内の神経細胞であるラット嗅球の顆粒細胞で明らかにした。ここで、興味ある疑問は、生体内において、細胞内のすべてのミトコンドリアが1つの連続したネットワークを形成している細胞が存在するか否かである。

精子は分化した細胞の中で1つの大きなミトコンドリアを有する顕著な例として、しばしば文献に引用される。ショウジョウバエ精子のミトコンドリア¹²⁾と同じように、マウス精子のミトコンドリアも融合して1つの連続した大きなミトコンドリアになると誤解されやすいが、実際には密接しているだけで精子形成の全過程を通して1つのミトコンドリアになることはない^{13,14)}。

骨格筋もミトコンドリアネットワークが発達した細胞の代表例としてよく知られている。哺乳類の骨格筋細胞におけるミトコンドリアネットワークは、連続超薄切片の再構築法^{15,16)}、超高圧電顕法¹⁷⁾、SEM法¹⁸⁾で調査されて、ネットワークの明瞭な三次元構造が報告された。しかし、これらの研究報告のいずれも筋線維内のすべてのミトコンドリアが連結して1つのミトコンドリアネットワークを形成する証拠は提供していない¹⁶⁾。従って、哺乳類の生体内の細胞では、我々が観察したような1つのミトコンドリアネットワークを形成する細胞の存在を証明した報告は未だない⁴⁾。精力的に研究されてきた培養細胞でさえも、1細胞あたり1つのミトコンドリアネットワークの存在の有無については未だに議論されている^{5,19)}。

ミトコンドリアネットワークの機能的役割を知るためには、哺乳類の生体内で、他にどのような細胞が発達したミトコンドリアネットワークを保有しているかを調査することが重要である。

6.2 ミトコンドリアネットワークのサイズ

著者らのSEMによる研究成果のなかで最も重要な発見の1つは、ミトコンドリアネットワークに幅45 nmの糸状の部分が存在する点である(図6-8)。この45 nmという小さな数値は普通の共焦点顕微鏡は言うまでもなく、4 pi共焦点顕微鏡の分解能さえも超えている。4 pi共焦点顕微鏡は高分解能(100 nm axial and 250 nm lateral)であり、近年ミトコンドリアなどの三次元構造の高分解能分析に用いられている^{4,20)}。しかし、ミトコンドリアの糸状の部分は幅50 nm以下なので、分解能の良い4 pi共焦点顕微鏡であっても検出できない。このことは共焦点顕微鏡での観察では、糸状の部分によって1つに連結しているミトコンドリアネットワークを数個のバラバラのミトコンドリアであると見誤る危険性があることを意味している。言い換えると、共焦点顕微鏡で観察される複数の独立したミトコンドリアは、本当は糸状部分によって連結している可能性がある。従って、光学顕微鏡での研究では、ミトコンドリアの分裂現象あるいは融合現象を正しく評価することは困難である³⁾。

Dlaskováら⁴⁾は4 pi共焦点顕微鏡を用いてINS-1E細胞およびHEP-G2細胞のミトコンドリアがほぼ完全に1つに連結したネットワークを形成し、均一な太さの細管(240-320 nm)がネットワークを構成していることを報告した。著者らの

SEM研究のタイプ-1とタイプ-2のミトコンドリアネットワークは基本的に太さ約250-300 nmの細管で構成されていた(図3, 4)。両者の計測値がほぼ一致していることから、この250-300 nmの値はミトコンドリアがネットワークを構成する場合の標準的な太さと推測される。

6.3 ミトコンドリアネットワークの多様性

著者らは、正常ラット嗅球顆粒細胞においてミトコンドリアネットワークに形態的な多様性があることを示した。ミトコンドリアは融合と分裂を繰り返す動的な器官であることを考慮すれば、常に形と数が変化することは驚くに値しない。しかし、もしミトコンドリアネットワークの形態が細胞の機能状態を反映するならば、形態的多様性を詳細に調べることが、細胞機能を推測する有用な手段となるに違いない。

我々はミトコンドリアネットワークの形態を4つのタイプに分類した。最も興味ある独特な形態はタイプ-3の数珠状のネットワークであった(図6, 7)。数珠状ネットワークは顆粒細胞では稀にしか出現しないので、何らかの特殊な機能状態を示していると思われる。いつ、どんな時に顆粒細胞にこの構造が現れるかを明らかにすることが機能状態を知る上で重要と思われる。同様の構造はCa²⁺を注入したゼノパスの培養内皮細胞で位相差顕微鏡とTEMを用いて観察されている²¹⁾。しかし、培養細胞で観察された当時は数珠状ネットワークの形態と細胞機能との関連はよくわかってはいなかった。次項ではこの構造とアポトーシスとの関連について考察する。

6.4 アポトーシスにおける数珠状 (beads on a string) 構造の形成

ミトコンドリアネットワークが崩壊してバラバラに分割される断片化現象はアポトーシスに伴って起こることが知られている。この現象はミトコンドリアの分裂に伴う基本事象としてすでに十分に立証されている²²⁻²⁵⁾。数珠状構造は、断片化の前段階に出現することが光学顕微鏡とTEMの両方で報告されている^{22,23)}。従って、数珠状構造の出現はアポトーシスで生じるミトコンドリア断片化の初期段階と考えられており、“the thread-beads transition”(糸から数珠玉への移行)と呼ばれている²³⁾。

ほとんどの嗅球顆粒細胞は出生後に発生して成熟期も追加され続けるため²⁶⁾、新たに発生した細胞が組み込まれる層でアポトーシスが観察されている²⁷⁾。このことから、我々が観察したタイプ-3のネットワークを持つ顆粒細胞はアポトーシスの初期段階であると推測される。しかし、ミトコンドリアが数珠玉状に膨化することは、アポトーシスの進行に不可欠な前提条件ではないようである。その理由は：(1)多くのアポトーシスにおいてミトコンドリアは膨化することなく形態学的に正常なままである²⁸⁾。(2)多くの細胞型においてミトコンドリアからのシトクロムCの放出はミトコンドリアの膨化前に起こるか、膨化することなく起こる²⁸⁾。(3)多くの研究で、劇的に断片化するミトコンドリアがアポトーシスとは関係のない健康な細胞でも観察されている²⁴⁾。ミトコンドリアの数珠状構造の出現はアポトーシスとは関係のない現象の

可能性もある。数珠玉状膨化現象を理解するには、この現象のトリガーが何なのか、今後さらなる解明が必要である。

6.5 *in vivo* の大きな細胞でのネットワーク形成

すでに述べたように、骨格筋のような好氣的代謝の高い組織はミトコンドリアネットワークがよく発達している。細胞周辺から中心部へ伸びるミトコンドリアネットワークは細胞周辺から中心部へエネルギーを供給する電気網と言える。言い換えれば、ミトコンドリアネットワークは細胞全体にプロトン勾配をもたらすケーブルとして働くと推測されている²⁹⁾。

神経細胞は動物の中で最も細長い細胞であり、細胞体から長い神経突起が伸びている。このため神経細胞では、エネルギーを消費する軸索や樹状突起のシナプスまでエネルギーが供給される必要がある。神経細胞のミトコンドリアにおいても筋細胞と同じようにケーブル理論を適用することは可能だろうか。筋細胞とは対照的に、神経細胞ではミトコンドリアが軸索や樹状突起の中を細胞骨格に沿って長い距離を移動して³⁰⁾、末梢でエネルギー供給と Ca^{2+} の緩衝を行うと考えられている^{31,32)}。しかし、ラット嗅球の顆粒細胞 (図 10) では樹状突起の基部に長いミトコンドリアが存在し、顆粒細胞の樹状突起内のミトコンドリアと細胞体内のミトコンドリアネットワークとの間には構造的な連続性が認められた (図 4, 11)。同様の連続性は海馬の神経細胞でも観察されている³³⁾。これらの所見は、樹状突起内の長いミトコンドリアと細胞体内のミトコンドリアネットワークは連続性があり、細胞体から樹状突起へのエネルギー供給を軸索とは異なる方法で行っている可能性を示している。

哺乳類嗅球の顆粒細胞は1つの大きな樹状突起と数本の短い神経突起を持つが軸索がない特殊な神経細胞である。その出力はスパインにある双方向樹状突起シナプスによって伝えられる。顆粒細胞は軸索を持たないためミトコンドリアを多数生成して軸索輸送に送り出す必要がない。このことが発達したミトコンドリアネットワークが顆粒細胞に存在する理由なのかも知れない。この仮説を明らかにするためには、今後、生体内における軸索を持った神経細胞のミトコンドリアを調査し比較検討する必要がある。

6.6 培養細胞でのネットワーク形成

最近、培養したマウス胚性線維芽細胞に対して細胞質ゾルのタンパク質合成を阻害すると、UV 照射またはアクチノマイシン D のようなアポトーシス刺激によって生じる現象と同じように、高度に連結したミトコンドリアが出現することが報告された。この現象はミトコンドリアの分裂に先だって生じる過融合 (hyperfusion) によって引き起こされる³⁴⁾。この過融合で生じる大きなミトコンドリアネットワークを形成する現象はストレス誘導性アポトーシスに逆らって、細胞の維持を助ける生存メカニズムと考えられており³⁴⁾、培養下の多くの老化細胞でも類似の現象が認められる³⁵⁾。その役割としては活性酸素などの有害分子に対して抵抗する防御機構が想定されている^{5,35)}。老化細胞での補足的な役割として、大きなミトコンドリアネットワークは分子の素早い分配や交換

をする一方で、ミトコンドリア活動のエネルギー消費を減少させる可能性がある³⁵⁾。

前述したように、ラット嗅球の顆粒細胞は成熟期を通して前駆細胞から発生を続ける。そのため、嗅球ではほとんどの顆粒細胞が正常状態であると同時に、アポトーシスまたは老化の段階にある顆粒細胞の小集団が常に存在することになる。顆粒細胞の大部分は正常な状態であるとする、顆粒細胞の発達したミトコンドリアネットワークは正常機能に寄与しており、アポトーシスには関係ないと考えられる。

7. 方法論の考慮事項

Tanaka and Naguro (1981)³⁶⁾ によって考案された ODO 法は、SEM により細胞内構造の三次元情報を得るための優れた方法であった。オリジナルの ODO 法は神経細胞の超微構造をより良く保存するために AODO 法³⁷⁾ に改良された。この AODO 法が本研究のミトコンドリアの形態調査に応用された (セクション 9 参照)。この方法の重要な特性は試料作製の浸軟処理と呼ばれる段階で、希薄なオスミウム水溶液に浸漬することによって細胞から可溶性タンパク質や細胞骨格などが除去される点である。このプロセスを通じてミトコンドリア、ER およびゴルジ装置などの膜性細胞小器官の超微形態を三次元的に SEM で観察することが可能となる。

8. AODO 法の長所と短所

今回の研究では、生体内の神経細胞に、1つに連結したミトコンドリアネットワークが存在することを示した。しかし、AODO 法を用いた場合には、ほぼ半分は切断された細胞を観察していることに注意する必要がある。残念ながら、残りの半分は多くの場合観察されないため、我々は細胞全体のミトコンドリアを観察したことはない。また、この方法では細胞内に個別に存在する小さなミトコンドリアが試料作製中にサンプルから脱落する可能性を排除できない。従って、我々が観察したミトコンドリアネットワークが細胞内のすべてのミトコンドリアが連結したものであるかどうかは定かでない。

AODO 法によるミトコンドリアネットワークの観察は、細胞質が僅かな細胞が適している。その理由は、大きな細胞は ER やゴルジ装置が発達した豊富な細胞質を有することが多く、それらの構造がミトコンドリアネットワークの観察を妨げるからである。また、上述したように微小管やアクチンフィラメントなどの細胞骨格は AODO 法の浸軟処理によって細胞から除去されるため、細胞骨格とミトコンドリアとの構造的な関係を調査することは不可能である。しかし、細胞骨格成分の消失はミトコンドリアと ER あるいはミトコンドリアとゴルジ装置といった膜性の細胞小器官どうしの関係を観察するには有利である (図 11)。

ミトコンドリアネットワークの形態を正しく評価するには、光学顕微鏡による動的構造変化の観察と SEM や TEM などの電子顕微鏡による高分解能の観察を併用することが重要である³⁸⁾。SEM と TEM を比較した場合、SEM 法は大き

な試料を観察できるので、1つの試料で一度に多数の細胞を容易に探索することが可能である。一方、TEM法は連続超薄切片やTEMトモグラフィーによる三次元再構成には手間が掛かるうえに、試料サイズに制限がある。近年、SEMで細胞内部を観察する新たな方法として、反射電子を用いるSBF-SEM (Serial Block Face-SEM) 法やFIB/SEM (Focused Ion beam SEM) 法が盛んになってきた。これらの方法は比較的大きな試料でも三次元再構築が容易なので、ミトコンドリアネットワークは格好の研究対象となり、今後飛躍的な研究の発展が期待される。

9. 材料と方法 (AODO法の技術的側面)

この研究では成熟雄性Wistar系ラットを使用した。動物は麻酔下に0.5%グルタルアルデヒドと0.5%パラホルムアルデヒドの混合液(pH 7.4のM/15リン酸緩衝液)を灌流したあと、嗅球を細切して、1%四酸化オスミウム液(同緩衝液)で後固定した(2時間)。同緩衝液で洗浄後、15%、30%、および50%のDMSO液中に浸漬した(各30分間)。試料は液体窒素で凍結してカミソリの刃とハンマーで切断した。切断試料を緩衝液で洗浄し、続いて0.1%四酸化オスミウム液(同緩衝液)に浸漬した(20°C, 3日間)。導電染色には2%タンニン酸水溶液と1%四酸化オスミウム液の処理を行った(各処理1時間)。標本は上昇エタノール系列で脱水し、臨界点乾燥法により乾燥した。乾燥標本にイオンスパッターコーター(E-1030, 日立)で白金を3nmコーティングし、加速電圧25kVで走査電顕(HFS-2ST, 日立)で観察した。この方法によって得られたSEM画像ではミトコンドリア、ゴルジ装置、rERおよびsERなどの細胞小器官の同定は容易である。これらの構造が読者に簡単に識別できるように、SEMの白黒画像を人工的に着色した。

10. おわりに

ミトコンドリアネットワークは、形態の複雑さ、微細さ、また動的であるがゆえに、形態と機能がまだ十分に解明されていない。今後は、特に生体内の細胞において、ミトコンドリアネットワークの研究が進み、その役割が明らかになって行くことを期待しながら稿を終える。

謝辞

掲載写真の著作権はオリジナル論文⁶⁾の出版社であるCambridge University Pressに帰属する。ここにCambridge University Pressの許可を得て転載したことを記載するとともに感謝いたします。

文献

- Hoffmann, H.P. and Avers, C.J.: *Science*, **181**, 749–751 (1973)
- Bereiter-Hahn, J.: *Int. Rev. Cytol.*, **122**, 1–63 (1990)
- Bereiter-Hahn, J. and Vöth, M.: *Microsc. Res. Tech.*, **27**, 198–219 (1994)
- Dlasková, A., Spacek, T., Santorová, J., et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1797**, 1327–1341 (2010)
- Bereiter-Hahn, J. and Jendrach, M.: *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, **284**, 1–65 (2010)
- Naguro, T., Nakane, H. and Inaga, S.: in Schatten, H. (Ed.), *Scanning Electron Microscopy for the Life Sciences*, Cambridge University Press, New York, 50–70 (2013)
- Tanaka, K.: in Bourne G.H. (Ed.), *Cytology and Cell Physiology*, Academic Press, New York, 89–120 (1987)
- Naguro, T. and Iwashita, K.: *Microscopy Research and Technique*, **23**, 62–75 (1992)
- Koga, D. and Ushiki, T.: *Arch. Histol. Cytol.*, **69**, 357–374 (2006)
- Kawano, S., Takano, H. and Kuroiwa, T.: *Int. Rev. Cytol.*, **161**, 49–110 (1995)
- Westermann, B.: *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**(12), 872–884 (2010)
- Tates, A.D.: *Cytodifferentiation during spermatogenesis in Drosophila melanogaster: An electron microscopes study*. PhD Thesis, Leiden University, The Netherlands (1971)
- Otani, H., Tanaka, O., Kasai, K., et al.: *Anat. Rec.*, **222**, 26–33 (1988)
- Ho, H.C. and Wey, S.: *Microsc. Res. Tech.*, **70**, 719–723 (2007)
- Brandt, J.T., Martin, A.P., Lucas, F.V., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 1097–1102 (1974)
- Kayar, S.R., Hoppeler, H., Mermod, L., et al.: *Anat. Rec.*, **222**, 333–339 (1988)
- Kirkwood, S.P., Packer, L. and Brooks, G.A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **255**, 80–88 (1987)
- Ogata, T. and Yamasaki, Y.: *Cell Tissue Res.*, **242**, 461–467 (1985)
- Collins, T.J., Berridge, M.J., Lipp, P., et al.: *EMBO J.*, **21**, 1616–1627 (2002)
- Plečičá-Hlavatá, L., Lessard, M., Santorová, J., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 834–846 (2008)
- Stolz, B. and Bereiter-Hahn, J.: *Cell Calcium*, **8**, 103–121 (1987)
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., et al.: *Dev. Cell*, **1**, 515–525 (2001)
- Skulachev, V.P., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., et al.: *Mol. Cell. Biochem.*, **256**, 341–358 (2004)
- Sheridan, C. and Martin, S.J.: *Mitochondrion*, **10**(6), 640–648 (2010)
- Scorrano, L.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**, 1875–1883 (2009)
- Altman, J.: *J. Comp. Neurol.*, **137**, 433–458 (1969)
- Fiske, B.K. and Brunjes, P.C.: *J. Comp. Neurol.*, **431**, 311–319 (2001)
- Martinou, I., Desagher, S., Eskes, R., et al.: *J. Cell Biol.*, **144**, 883–889 (1999)
- Skulachev, V.P.: *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 23–29 (2001)
- Pathak, D., Sepp, K.J. and Hollenbeck, P.J.: *J. Neurosci.*, **30**, 8984–8992 (2010)
- Hollenbeck, P.J. and Saxton, W.M.: *Journal of Cell Science*, **118**, 5411–5419 (2005)
- Wang, X. and Schwarz, T.L.: *Meth. Enzymol.*, **457**, 319–333 (2009)
- Popov, V., Medvedev, N.I., Davies, H.A., et al.: *J. Comp. Neurol.*, **492**, 50–65 (2005)
- Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., et al.: *EMBO J.*, **28**, 1589–1600 (2009)
- Mai, S., Klinkenberg, M., Auburger, G., et al.: *J. Cell Sci.*, **123**, 917–926 (2010)
- Tanaka K. and Naguro T.: *Biomed. Res.*, **2** (Suppl), 63–70 (1981)
- Tanaka, K. and Mitsushima A.: *J. Microsc.*, **133**, 213–222 (1984)
- Perkins, G.A., Sun, M.G. and Frey, T.G.: *Meth. Enzymol.*, **456**, 29–52 (2009)