

酵母サッカロミセスのストラクトーム解析 Structome Analysis of *Saccharomyces cerevisiae*

山口 正 視
Masahi Yamaguchi

千葉大学・真菌医学研究センター

要 旨 1932年に電子顕微鏡が発明されて以来、半世紀以上にわたって、細胞構造は、定性的、二次元的にのみ観察されており、定量的、三次元的解析はほとんどなされてこなかった。ストラクトームは、「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」と定義され、ゲノム、プロテオームと並ぶ、重要な概念である。本稿では、酵母サッカロミセス・セレビシエを急速凍結・凍結置換法および連続超薄切片法を用いて、初めて、ストラクトーム解析を行った結果を解説し、その特徴を明らかにする。また、ストラクトーム解析を応用したことによって未知の微生物の発見に至った経緯を紹介する。さらに、近年盛んに行われている連続スライス SEM 法との違いについて考察する。

キーワード：細胞構造、凍結置換法、連続超薄切片法、定量的、三次元再構築

1. はじめに

ヒトの体を構成する細胞の数は約 60 兆個、ヒトの脳は約 150 億個の細胞から構成されてい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あるのか、小胞体はどのくらいの体積を占めているのかはわかっていないし、また、各オルガネラは細胞内に立体的にどのように局在しているのかなどもわかっているとは言いがたい。「ストラクトーム」とは、私が structure と -ome を組み合わせて作った造語であり、「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」と定義される^{1,2)}。

1932年に電子顕微鏡が発明されてからこれまで、半世紀以上にわたって、細胞構造の研究は、ほとんど定性的、二次元的解析によってなされてきた。これまでの解析によっても、光学顕微鏡では得られない新しい情報が得られ、数多くの発見がなされたが、細胞を定量的、三次元的に解析すれば、定性的、二次元的解析では得られない新しい情報が得られることが期待される。

サッカロミセスは、真核生物の中で最初にゲノム解析がなされた種で、世界中で細胞の研究材料として最も盛んに研究されているものの一つである。本稿では、ゲノム解析に用いられた S288c 株を用いて、サッカロミセスのストラクトーム解析を行ったので報告する²⁾。

2. サッカロミセス・セレビシエのストラクトーム解析

解析には、YPD 液体培地（1%酵母エキス、2%ポリペプトン、2%グルコース）で培養した指数増殖期（OD₆₆₀が1.0くらい）の細胞を用いた。細胞を遠心で集め、サンドイッチ法により液体プロパンで急速凍結した後、2%四酸化オスミウム・アセトン液で-80°Cで凍結置換固定を行った。エポキシ樹脂に包埋し、トリミングして、連続超薄切片を作製した。切片は、スリットグリッドに拾い、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色した後、日本電子 JEM-1400 電子顕微鏡で撮影した³⁾。

今回の実験では、全部で 32 個の細胞の連続超薄切片を撮影したが、このうち、出芽していない単個菌（G1 期）を 3 個、細胞分裂は終了したが母細胞からまだ分離していない娘細胞（G1 初期）を 3 個選んで解析した。

図 1 は、さまざまな細胞成分の拡大像を示す。原形質膜、液胞膜などの生体膜は典型的な三層構造を呈し（図 1a, b, c, d, e, f, g, l, m, o）、また、核の断面はほぼ円形であるので（図 1i）、今回の試料は、自然なままの構造が、高解像度で得られていることが確認された。表 1 と表 2 は、オルガネラ、細胞成分の数と体積を解析したものである。表 3 は、細胞と細胞成分の直径（短径）と長径を、表 4 は、オルガネラの膜の厚さを計測したものである。図 2 に、細胞 1 から 6 の三次元再構築像を示す。図 3 に、6 個の細胞のそれぞれのサイトゾル、細胞壁、核、ミトコンドリア、液胞、その他の成分の割合を示す。図 4 に、6 個すべての細胞の平均の細胞成分の割合を示す。以下に、細胞、オルガネラ、細胞成分ごとに、定量的、三次元的に解析（ストラクトーム解析）した結果を述べる。

〒 206-8673 千葉市中央区亥鼻 1-8-1
TEL: 043-222-7171; FAX: 043-226-2486
E-mail: yama@faculty.chiba-u.jp
2015 年 3 月 16 日受付

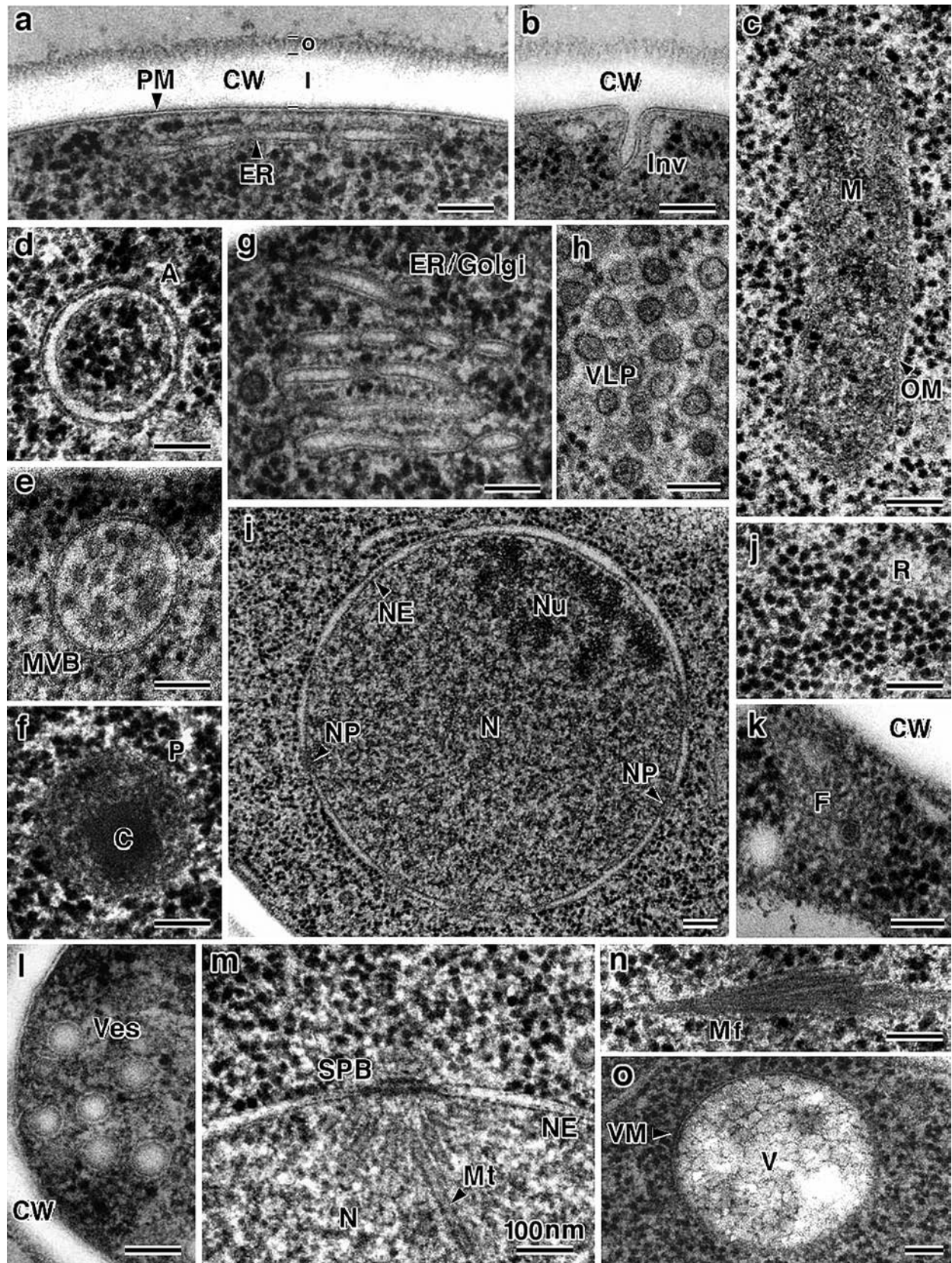


図1 サッカロミセスのオルガネラ, 細胞成分の拡大像. (a) 細胞壁(CW)と原形質膜(PM). o:外層. i:内層. ER:小胞体. (b) 陥入(Inv). (c) ミトコンドリア(M). OM:外膜. (d) オートファゴソーム(A). (e) 多胞体(MVB). (f) ペルオキシソーム(P). C:結晶. (g) 小胞体/ゴルジ体(ER/Golgi). (h) ウイルス様粒子(VLP). (i) 核(N). NE:核膜. NP:核孔. Nu:核小体. (j) リボソーム(R). (k) フィラソーム(F). (l) 小胞(Ves). (m) 紡錘極体(SPB). Mt:微小管. (n) 微小線維(Mf). (o) 液胞(V). VM:液胞膜. (i) と (o) 以外はすべて同一倍率, スケールは100 nm. (文献2) より

表1 オルガネラ, 細胞成分の細胞あたりの数

オルガネラ/細胞成分	G1 期 (3 細胞の平均±標準偏差)	G1 初期 (3 細胞の平均±標準偏差)	合計 (6 細胞の平均±標準偏差)
核	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
核小体	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
紡錘極体	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
ミトコンドリア	2.3 ± 1.2	2.3 ± 1.5	2.3 ± 1.2
小胞体/ゴルジ体	21.7 ± 7.8	18.0 ± 5.3	19.8 ± 6.3
液胞	2.0 ± 1.7	1.7 ± 0.6	1.8 ± 1.7
オートファゴソーム	0.3 ± 0.6	1.7 ± 0.6	1.0 ± 0.9
多胞体	1.7 ± 2.9	0.0 ± 0.0	0.8 ± 2.0
リボソーム数	217000 ± 48000	175000 ± 62000	195000 ± 55000
リボソーム密度 (μm ³)	19600 ± 600	19400 ± 1500	19500 ± 1000
小胞	9.7 ± 6.4	5.3 ± 4.9	7.5 ± 5.6
フィラソーム	29.3 ± 9.5	20.7 ± 2.3	25.0 ± 7.8
ウイルス様粒子	82.7 ± 38.1	58.0 ± 15.1	70.3 ± 29.2
ペルオキシソーム	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
陥入	31.7 ± 12.6	22.7 ± 15.6	27.2 ± 13.6

表2 細胞, オルガネラの体積 (単位は μm³, 括弧内は細胞に対する割合)

細胞/オルガネラ	G1 期 (3 細胞の平均±標準偏差)		G1 初期 (3 細胞の平均±標準偏差)		合計 (6 細胞の平均±標準偏差)	
細胞	17.1 ± 3.1	(100 ± 0%)	13.3 ± 4.3	(100 ± 0%)	15.2 ± 4.0	(100 ± 0%)
細胞壁	2.9 ± 0.6	(17 ± 2%)	2.4 ± 0.6	(18 ± 3%)	2.6 ± 0.6	(18 ± 3%)
核	1.8 ± 0.4	(10.5 ± 1.0%)	1.3 ± 0.4	(9.7 ± 0.3%)	1.5 ± 0.4	(10.1 ± 0.8%)
核小体	0.40 ± 0.10	[22.1 ± 1.5%]*	0.22 ± 0.19	[15.7 ± 10.1%]*	0.31 ± 0.17	[18.9 ± 7.4%]*
ミトコンドリア	0.28 ± 0.03	(1.7 ± 0.4%)	0.17 ± 0.04	(1.4 ± 0.6%)	0.23 ± 0.07	(1.6 ± 0.5%)
小胞体/ゴルジ体	0.12 ± 0.04	(0.7 ± 0.3%)	0.06 ± 0.02	(0.5 ± 0.1%)	0.09 ± 0.05	(0.6 ± 0.3%)
液胞	0.99 ± 0.28	(5.8 ± 1.0%)	0.36 ± 0.45	(2.2 ± 2.4%)	0.68 ± 0.49	(4.0 ± 2.5%)
オートファゴソーム	0.004 ± 0.007	(0.03 ± 0.05%)	0.006 ± 0.008	(0.04 ± 0.04%)	0.006 ± 0.008	(0.03 ± 0.04%)
多胞体	0.008 ± 0.014	(0.04 ± 0.06%)	0 ± 0	(0 ± 0%)	0.003 ± 0.008	(0.02 ± 0.04%)
サイトゾル	11.0 ± 2.2	(64.3 ± 0.6%)	9.0 ± 3.0	(68.0 ± 3.6%)	10.0 ± 2.6	(66.2 ± 3.1%)

*は核に対する割合

2.1 細胞

G1 期の細胞は, 球に近い楕円体で, 短径は $3.24 \pm 0.42 \mu\text{m}$, 長径は $3.85 \pm 0.48 \mu\text{m}$ であった (表3). 体積は $15.2 \pm 4.0 \mu\text{m}^3$ であった (表2).

2.2 細胞壁

細胞壁は, $120 \pm 14 \text{ nm}$ の厚さで, 2つの層から成る (図1a). 外層は, 厚さが $34 \pm 3 \text{ nm}$ で, 線維状の構造から成り (図1a), マンナンタンパクで構成されている. 内層は, 厚さが $86 \pm 14 \text{ nm}$ で, 電子密度が低く (図1a), β グルカンとキチンで構成されている.

2.3 核, 核膜, 核孔, および核小体

核は, 二重の核膜で包まれている (図1i). G1 期の核は球形で (図1i), $1.63 \pm 0.20 \mu\text{m}$ の直径をもち (表3), $1.5 \pm 0.4 \mu\text{m}^3$ の体積を示し, 細胞の体積の $10.1 \pm 0.8\%$ を占める (表2, 図4). 核膜は, 外膜と内膜とからなり, それぞれ $12.6 \pm 1.5 \text{ nm}$, $13.3 \pm 1.6 \text{ nm}$ の厚さを持っている (表4). 核孔の直径は, $93.7 \pm 11.8 \text{ nm}$ で (表3), 核内と細胞質間の物質輸送に

関与している⁴⁾. 核には, 1個の核小体があり (表1), 粒子状の電子密度の高い物質から構成されている (図1i). 核小体は, $0.31 \pm 0.17 \mu\text{m}^3$ の体積を持ち, 核の体積の $18.9 \pm 7.4\%$ を占める (表2).

2.4 ミトコンドリア

ミトコンドリアは, 切片上では, 卵形や細長い形態を示すが (図1c), 三次元再構築像では, ひも状でしばしば枝分かれがみられる (図2). ミトコンドリアは, 直径が $232.9 \pm 34.0 \text{ nm}$ で (表3), 長さは, 長いものでは $6.2 \mu\text{m}$ に達する (図2c). ミトコンドリアの体積は, $0.23 \pm 0.07 \mu\text{m}^3$ で, 細胞の体積の $1.6 \pm 0.5\%$ を占める (表2, 図4). 細胞に 2.3 ± 1.2 個のミトコンドリアが存在し (表1), それぞれの細胞には, 1個の巨大なミトコンドリアが存在する傾向がある (図2). 今回の培養条件では, ミトコンドリアの外膜は, 明瞭に観察されたが, クリステは観察されにくかった. 外膜の厚さは, $14.1 \pm 2.0 \text{ nm}$ であった (表4).

表3 細胞, オルガネラ, 細胞成分の直径 (短径) と長径 (平均 ± 標準偏差) (文献2) より)

細胞/オルガネラ/ 細胞成分	直径 (短径)	長径	測定数
細胞	3.24 ± 0.42 μm	3.85 ± 0.48 μm	36
核	1.63 ± 0.20 μm		36
液胞	0.87 ± 0.46 μm	0.93 ± 0.49 μm	47
核孔	93.7 ± 11.8 nm		20
紡錘極体	117.2 ± 18.8 nm		8
ミトコンドリア	232.9 ± 34.0 nm		20
オートファゴソーム	263.0 ± 67.4 nm	316.0 ± 76.7 nm	25
多胞体	185.9 ± 38.9 nm	206.3 ± 43.3 nm	16
多胞体中の微小胞	39.3 ± 4.5 nm		14
リボソーム	20.2 ± 1.2 nm		50
小胞	70.2 ± 6.3 nm		20
フィラソーム	175.2 ± 33.2 nm		33
ウイルス様粒子	51.7 ± 6.2 nm		100
微小管	25.1 ± 0.5 nm		24
微小線維	7.3 ± 0.8 nm		7

2.5 小胞体とゴルジ体

サッカロミセス・セレビシエでは, ゴルジ体は, 典型的な層状構造を示すことはほとんどなく, 個々の薄い袋として存在している⁵⁾ (図1a, 1g 参照). したがって, 我々は, 小胞体とゴルジ体を一つのオルガネラとして解析した. 小胞体/ゴルジ体は, 19.8 ± 6.3 個存在し (表1), 0.09 ± 0.05 μm³ の体積を持ち, 細胞の体積の 0.6 ± 0.3% を占める (表2). その膜は, 約 14.2 ± 1.8 nm の厚さを示す (表4). 動物細胞の小胞体は, しばしば細胞全体にネットワークを形成するが, サッカロミセスでは, 小胞体/ゴルジ体は島状に散らばっていて, 体積は1%に満たない.

2.6 液胞, オートファゴソーム, および多胞体

細胞には 1.8 ± 1.7 個の液胞が存在する (表1). 形態はほぼ球形で (図1o), (0.87 ± 0.46) μm × (0.93 ± 0.49) μm の大きさをもつ (表3). 液胞の体積は, 0.68 ± 0.49 μm³ で, 細胞の体積の 4.0 ± 2.5% を占める (表2, 図4). 液胞の膜は, 三層構造を示し, 19.4 ± 2.7 nm の厚さをもつ (表4).

オートファゴソーム (図1d) は, 膜に包まれた構造体で, (263.0 ± 67.4) nm × (316.0 ± 76.7) nm の大きさの楕円体を呈し (表3), 細胞に 1.0 ± 0.9 個存在する (表1). しばしば, 消化の途中と思われるリボソーム粒子を含む (図1d). 膜は, 三層構造を示し, 厚さは, 16.8 ± 2.3 nm (表4) である. オートファゴソームは, 自食体の前駆体である⁶⁾.

多胞体は, 微小胞 (microvesicles) を含む球形の膜で包まれたオルガネラである⁷⁾ (図1e). 多胞体は, 細胞に 0.8 ± 2.0 個存在し (表1), 大きさは (185.9 ± 38.9) nm × (206.3 ± 43.3) nm である (表3). 多胞体の膜は, 16.9 ± 2.6 nm の厚さで, 三層構造を示す (図1e). 多胞体は, 酸性フォスファターゼを含んでおり, ライソソームの一部であると考えられる.

表4 オルガネラの膜の厚さ (平均 ± 標準偏差) (文献2) より)

オルガネラ	厚さ (nm)	測定数
原形質膜	15.6 ± 2.1	20
外葉	4.6 ± 1.0	20
中葉	3.8 ± 0.6	20
内葉	7.3 ± 1.9	20
液胞	19.4 ± 2.7	20
外葉	7.8 ± 2.2	20
中葉	4.1 ± 0.8	20
内葉	7.6 ± 1.7	20
オートファゴソーム	16.8 ± 2.3	11
多胞体	16.9 ± 2.6	8
核膜外膜	12.6 ± 1.5	20
核膜内膜	13.3 ± 1.6	20
小胞体/ゴルジ体	14.2 ± 1.8	20
ミトコンドリア外膜	14.1 ± 2.0	20

2.7 リボソームとサイトゾル

リボソームは, 直径 20.2 ± 1.2 nm の電子密度の高い粒子である (図1j, 表3). リボソームは, 細胞質にランダムに存在しているが, しばしば, 小胞体と核膜に付着しているのが見られる. リボソームは細胞あたり, 195,000 ± 55,000 個存在し, 1 μm³ あたりの密度は, 19,500 ± 1,000 個であった (表1).

サイトゾルの体積は, 細胞の体積からすべてのオルガネラと細胞成分の体積を差し引いた値であり (即ち, 表2の核小胞を除いた細胞壁から多胞体まで), 細胞あたり 10.0 ± 2.6 μm³ の体積をもち, 66.2 ± 3.1% を占める (表2, 図4).

2.8 小胞とフィラソーム

小胞は, 直径が 70.2 ± 6.3 nm で辺縁が明瞭な球形を呈し, しばしば細胞壁の近くに観察される (図1i, 表3). 細胞あたり, 7.5 ± 5.6 個存在し (表1), グルカナーゼ活性を持っている.

フィラソームは, 直径が, 175.2 ± 33.2 nm の球状で, 中心の小胞とこれを包む細いフィラメントからなっている (図1k, 表3)⁸⁾. 細胞に 25.0 ± 7.8 個のフィラソームが存在するが (表1), しばしば細胞壁の近くに観察される.

2.9 紡錘極体, 微小管, および微小線維

図1m に G1 期の紡錘極体を示す. 紡錘極体は, 核膜内に局在し, 細胞質および核微小管を付着させた円盤型構造から成る⁹⁾. 円盤型構造の直径は, 117.2 ± 18.8 nm であった (表3).

微小管 (図1m) は, 直径が 25.1 ± 0.5 nm である (表3). ほとんどの微小管は, 紡錘極体に付着しており, 紡錘極体から離れて存在する微小管は, ほとんどない. 微小線維の直径は, 7.3 ± 0.8 nm であった (表3).

2.10 ペルオキシソームとウイルス様粒子

ペルオキシソームは, 膜に包まれた, 電子密度の高い球形のオルガネラである¹⁰⁾ (図1f). ペルオキシソームは, より電子密度の高い結晶構造を, 内部にもつことがある (図1f).

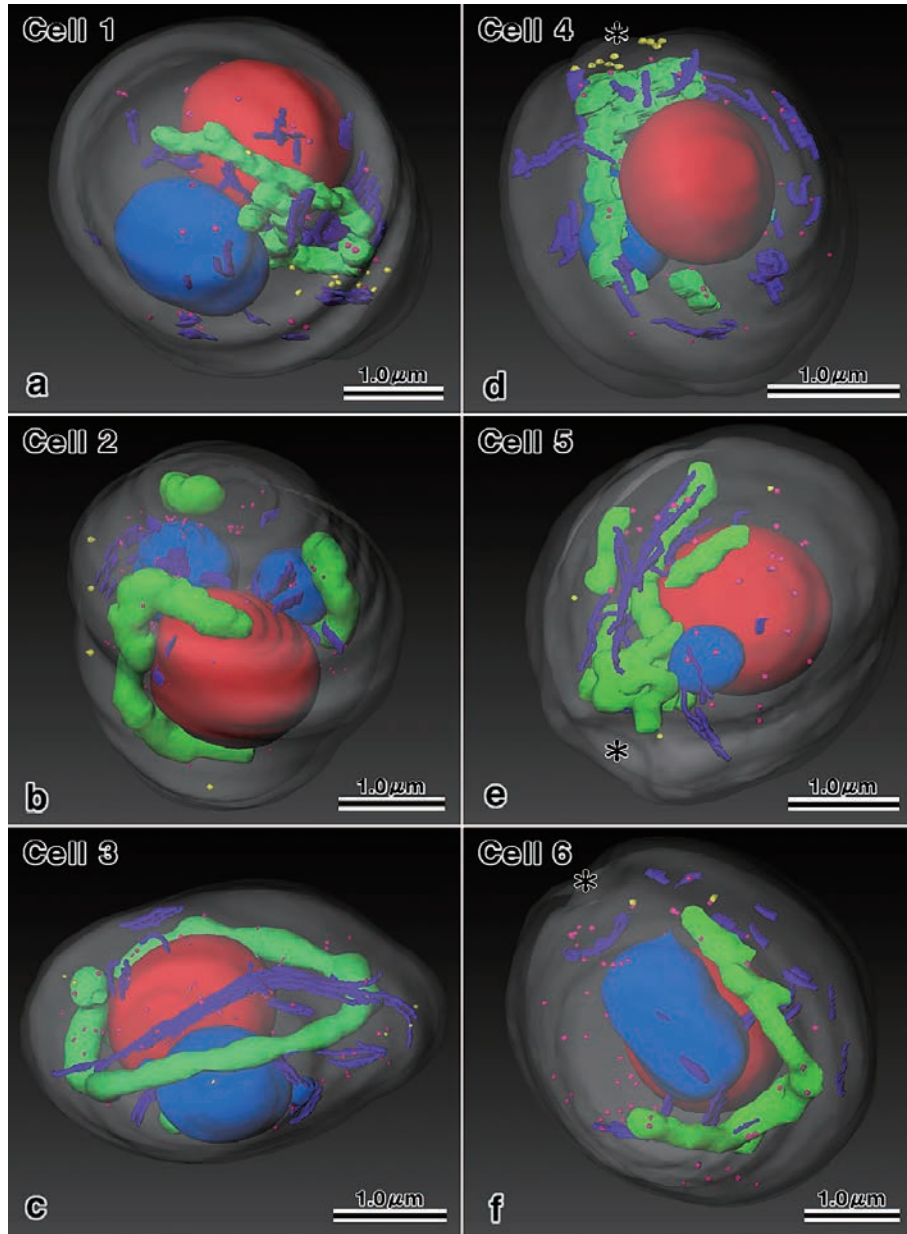


図2 サッカロミセスの細胞1から6の三次元再構築像。赤:核。緑:ミトコンドリア。青:液胞。紫:小胞体/ゴルジ体。黄色い点:小胞。赤い点:ウイルス様粒子。細胞4から6の*は、母細胞のついている位置を示す。(文献2)より)

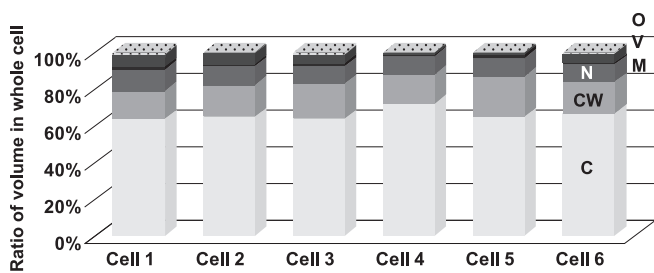


図3 細胞1から6のサイトゾル (C), 細胞壁 (CW), 核 (N), ミトコンドリア (M), 液胞 (V), およびその他 (O) の体積の割合。その他は、小胞体/ゴルジ体, オートファゴソーム, および多胞体を含む。サイトゾルは、リボソーム粒子, 小胞, フィラソームおよびウイルス様粒子を含む。個体間の変異は小さいことに注意。(文献2)より改変)

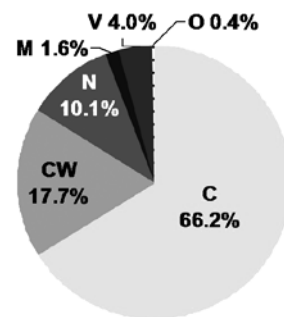


図4 サッカロミセスのサイトゾル (C), 細胞壁 (CW), 核 (N), ミトコンドリア (M), 液胞 (V), およびその他 (O) の体積のG1期の6個の細胞の平均の割合。サイトゾルは66.2%, 細胞壁は17.7%, 核は10.1%, ミトコンドリアは1.6%, 液胞は4.0%を占める(表2参照)。

今回の培養条件では、ペルオキシソームはほとんど存在せず、細胞1から6には観察されなかった(表1)。

ウイルス様粒子は、中空の球形の粒子で(図1h)、51.7 ± 6.2 nmの直径をもっている(表3)。一細胞に70.3 ± 29.2個存在する(表1)。この粒子は、逆転写活性をもつことが知られている。

2.11 原形質膜と膜系

原形質膜は、三層構造を示し、厚さは15.6 ± 2.1 nmで(図1a, 表4)、赤血球の原形質膜よりかなり厚い。外葉と内葉は、電子密度が高く、中葉は、電子密度が低い。外葉、中葉、内葉は、それぞれ約4.6 ± 1.0, 3.8 ± 0.6, 7.3 ± 1.9 nmの厚さを示した(表4)。原形質膜には、しばしば、陥入が見られ(図1b)、細胞あたり27.2 ± 13.6個の陥入が存在した(表1)。

サッカロミセスの膜系は、その厚さから、二つの系に分けることができると思われる。一つは、16–19 nmの膜系で(表4)、原形質膜(図1a)、液胞(図1o)、オートファゴソーム(図1d)、および多胞体の膜(図1e)が含まれる。もう一つは、厚さが、13–14 nmの膜系で(表4)、核膜の外膜と内膜(図1m)、小胞体/ゴルジ体(図1a, 1g)、およびミトコンドリアの外膜が含まれる(図1c)。

2.12 個体間の変異

図3に、サイトゾル、細胞壁、核、ミトコンドリア、および液胞の、個々の細胞における割合を示す。図に見られるように個体間の変異は、以外に小さいことがわかった。

3. G1期とG1初期のストラクチャーの比較

細胞の大きさ、細胞壁、核、核小体、ミトコンドリア、小胞体/ゴルジ体、液胞、およびサイトゾルの体積は、G1初期の方が、G1期と比較して小さい傾向にある(両者の違いは、おそらく計測数が少ないために、本研究では有意ではなかった、表2)。これは、通常、娘細胞は母細胞に比べて小さいため、当然のことであろう。この結果は、細胞周期によってストラクチャーが変化することを示唆しており、今後この方向での研究が待たれる。

4. 小胞体/ゴルジ体とミトコンドリアの距離の計測

細胞構造を三次元再構築したことによって、小胞体/ゴルジ体とミトコンドリアの距離を立体的に計測することが可能になった。両者の距離は、G1期の細胞1では775 ± 634 nmで、G1初期の細胞5では231 ± 253 nmであり、両者の違いは統計的に有意であった(表5)。これは、G1初期の細胞は、より多くのエネルギーを必要とするために、小胞体/ゴルジ体と

表5 細胞1と細胞5における小胞体/ゴルジ体とミトコンドリアとの距離 (平均 ± 標準偏差, 括弧内は測定数)

細胞1 (G1期)	細胞5 (G1初期)	AとBとの差異 (t検定)
775 ± 634 nm ^A (28)	231 ± 253 nm ^B (14)	P < 0.001 (t = 4.35)

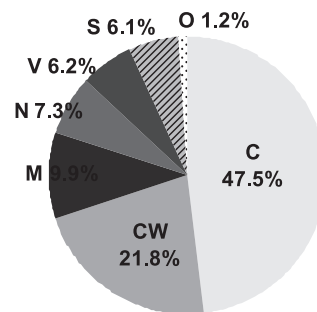


図5 エクソフィアラのサイトゾル(C)、細胞壁(CW)、核(N)、ミトコンドリア(M)、液胞(V)、およびその他(O)の体積の平均の割合。サイトゾルは47.5%、ミトコンドリアは9.9%を占める(文献12)より改変)。

ミトコンドリアの距離が近いのではないかと解釈される。同様な解析結果は、マウスの系でも報告されていて興味深い¹¹⁾。

5. オートファゴソーム、多胞体、およびペルオキシソームの形成

解析した6個の細胞のうち、オートファゴソームは、2つの細胞で、多胞体は5つの細胞で、ペルオキシソームは、どの細胞でも観察されなかった(表1)。これらのオルガネラを欠く細胞が存在するという事は、これらのオルガネラは細胞の生存に必須なものではなく、必要な時に、新たに形成されることを示唆している。

6. 他の酵母との比較

我々は、すでに、他の酵母エクソフィアラのストラクチャーを報告しており(図5)^{12–14)}、サッカロミセスとの比較が可能である。サッカロミセスには、油滴、グリコーゲン顆粒、および貯蔵物質が存在しないが、エクソフィアラには存在する。一方、小胞、フィラソーム、ペルオキシソームおよびウイルス様粒子は、サッカロミセスには存在するが、エクソフィアラには存在しない。ミトコンドリアは、サッカロミセスでは少ないが、エクソフィアラには多い(2.3 ± 1.2対25.6 ± 14.8)。ミトコンドリアの体積は、サッカロミセスではエクソフィアラに比べてかなり小さい(1.6 ± 0.5%対9.9 ± 1.7%)。また、サイトゾルの体積は、サッカロミセスの方がエクソフィアラより、大きな割合を占める(66.2 ± 3.1%対47.5 ± 3.5%)。両者のこれらの違いが何を意味するかについて議論するためには、さらに多くの種のストラクチャーの情報を得ることが必要と思われる。

7. ストラクチャー解析の応用

微生物のストラクチャー解析によって、新しい発見がなされた例を、ここに述べる。

2010年に、我々は、八丈島の南100 kmにある明神海丘で、深さ1,200 mの海底から、原核生物と真核生物の中間的な細胞構造をもつ微生物を発見し、「准核生物」と命名した^{15–18)}。

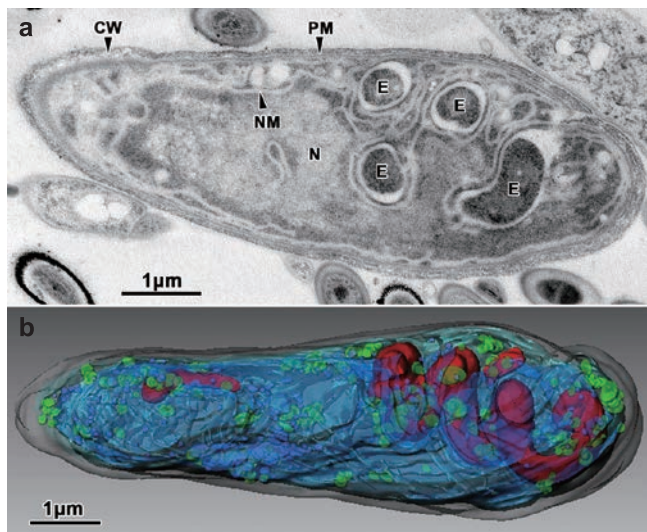


図6 准核生物パラカリオン・ミョウジネンシスの超薄切片像 (a) と三次元再構築像 (b). CW:細胞壁, E:内部共生体 (赤), PM: 原形質膜, N: 核様体 (青), NM: 核様体膜. (文献 15) より改変)

まず、深海から採取した微生物は、通常の化学固定では細胞構造が保持されにくいことがわかり、船上で化学固定した試料を研究室に持ち帰って、サンドイッチ法による急速凍結・凍結置換固定を適用することによって、細胞構造を格段によく保持する方法を開発した¹⁹⁾。この新しい方法（化学固定／凍結置換法と命名する）により作製した試料から、連続超薄切片を作製し、電子顕微鏡で観察したところ、これまで報告がなされていない細胞構造をもつ微生物を発見した（図6）。67枚の完全な連続超薄切片から、コンピュータを用いて三次元再構築をすると、図6bのような細胞構造をもつ微生物であることが明らかになった。この微生物は以下の特徴をもつ。

1) 細胞は、通常の前核生物よりはるかに大きく、体積は大腸菌の100倍、酵母の3倍の大きさをもつ。2) 真核をもたず、かわりに存在する核様体は、大きく不定形で、前核生物型のDNA線維からなり、核小体はない。3) 核様体を包む核様体膜は一重膜からなり、完全には閉じていない。4) 細胞内に共生している内部共生体は、構造が細菌に似ている。細胞壁はない。5) 他のオルガネラとして、ミトコンドリア、葉緑体、ゴルジ体、ペルオキシソーム、中心小体、紡錘極体、微小管はない。

即ち、細胞構造は、前核生物と真核生物との中間的な特徴をもつと言えよう。もし、深海微生物を、これまでのように、定性的、二次元的な観察しか行っていなかったら、おそらく、准核生物は発見されていなかっただろうと思われる。定量的、三次元的解析を行ったからこそ、上記のような特徴を明らかにすることが可能になったと考える。

8. 前核生物のストラクチャー

「准核生物」の論文を執筆する際、大腸菌の体積を計測した

論文を検索した。論文は1編見つかったものの²⁰⁾、その論文には、体積以外の情報はなかった。大腸菌は、前核生物を代表する最も広く研究に使われている材料の一つであり、詳細な構造情報（即ち、ストラクチャー）があれば、必ず将来役に立つと考えた。しかし、急速凍結した試料を連続超薄切片法で解析しているグループは、世界で唯一、我々のグループだけであり、我々が、これをやらなければ、大腸菌のストラクチャー解析は永遠になされない恐れがあった。我々は、そこで、我々自身で大腸菌のストラクチャーを実施する決心をし、現在解析を進めている。さらに、病原性の前核生物である結核菌については、最近ストラクチャー解析を終了し²¹⁾、本特集で山田博之博士が解説している。

9. おわりに

近年、連続スライスSEMを用いて、透過電子顕微鏡の連続超薄切片と同じような像を得る手法が開発されている²²⁾。FIB/SEMトモグラフィー法は、SEM連続スライス観察による生体組織の三次元再構築法の一つであり、その特徴は試料切削に束状イオンビーム（FIB）を用いる点にある²³⁾。Serial block-face scanning electron microscopy (SBF-SEM)は、組み込み式マイクロームによる表層切削とSEMによる試料の断面観察とを交互に反復することにより、数百 μm^2 以上におよぶ比較的広範囲の領域から、透過電子顕微鏡による連続超薄切片観察に類似した画像を、迅速に取得する方法である²⁴⁾。連続切片SEM法は、超薄連続切片を硬い基盤に載せ、その切片像を走査電子顕微鏡で取得する技法である²⁵⁾。しかし、いずれの方法でも透過電子顕微鏡と比べて、分解能が低く、微小管や微小線維、リボソームの一つひとつを識別することは、今のところできない。また、試料を削りながら画像を得る手法では、一度撮影した部位を、後に再撮影することは不可能である。

そのため、深海微生物の試料のように、初めは低倍で連続超薄切片を撮影して、どんな微生物が存在するかを確認した後、興味ある微生物について、再度、高倍率で撮影することは不可能である。准核生物の核様体内に太さが、2-3 nmのDNA様線維が、明瞭に観察されているが、このような観察は、この手法ではできないのである。我々が用いている凍結置換／連続超薄切片法は、極めて解像力の高い、微生物のストラクチャー解析に適した方法である。この手法は、決してむずかしい手法ではなく、便利な補助具と²⁶⁾、多少の練習をすれば、誰でもができる方法である（そのための講習会も毎年行っている。詳しくは、日本顕微鏡学会のホームページを参照のこと）。多くの方々が、ストラクチャーに興味をもっていただき、いろいろな種のストラクチャー解析が進むことを願うものである。

文 献

- 1) Yamaguchi, M.: *Curr. Trends Microbiol.*, 2, 1-12 (2006)
- 2) Yamaguchi, M., Namiki, Y., Okada, H., Mori, Y., Furukawa, H.,

- Wang, J., Ohkusu, M. and Kawamoto, S.: *J. Electron Microsc.*, **60**, 321–335 (2011)
- 3) Yamaguchi, M., Okada, H. and Namiki, Y.: *J. Electron Microsc.*, **58**, 261–266 (2009)
 - 4) Yamaguchi, M., Miyatsu, Y., Mizokami, H., Matsuoka, L. and Takeo, K.: *J. Electron Microsc.*, **45**, 321–324 (1996)
 - 5) Rossanese, O.W., Soderholm, J., Bevis, B.J., Sears, I.B., O'Connor, J., Williamson, E.K. and Glick, B.S.: *J. Cell Biol.*, **145**, 69–81 (1999)
 - 6) Baba, M., Takeshige, K., Baba, N. and Ohsumi, Y.: *J. Cell Biol.*, **124**, 903–913 (1994)
 - 7) Baba, M. and Osumi, M.: *J. Electron Microsc. Tech.*, **5**, 249–261 (1987)
 - 8) Takagi, T., Ishijima, S.A., Ochi, H. and Osumi, M.: *J. Electron Microsc.*, **52**, 161–174 (2003)
 - 9) 山口正視 : 日本医真菌学雑誌, **51**, 1–5 (2010)
 - 10) Osumi, M., Miwa, N., Teranishi, Y., Tanaka, A. and Fukui, S.: *Arch. Microbiol.*, **99**, 181–201 (1974)
 - 11) Noske, A.B., Costin, A.J., Morgan, G.P. and Marsh, B.J.: *J. Struct. Biol.*, **161**, 298–313 (2008)
 - 12) Biswas, S.K., Yamaguchi, M., Naoe, N., Takashima, T. and Takeo, K.: *J. Electron Microsc.*, **52**, 133–143 (2003)
 - 13) 山口正視 : Mycotoxins, **60**, 43–51 (2010)
 - 14) 山口正視, 岡田 仁, 並木侑一 : 顕微鏡, **45**, 212–217 (2010)
 - 15) Yamaguchi, M., Mori, Y., Kozuka, Y., Okada, H., Uematsu, K., Tame, A., Furukawa, H., Maruyama, T., Worman, C.O. and Yokoyama, K.: *J. Electron Microsc.*, **61**, 423–431 (2012)
 - 16) 山口正視 : 顕微鏡, **48**, 124–127 (2013)
 - 17) Yamaguchi, M. and Worman, C.O.: *Jpn. J. Protozool.*, **47**, 29–48 (2014)
 - 18) Yamaguchi, M.: JSM Mycotoxins, in press (2015)
 - 19) Yamaguchi, M., Namiki, Y., Okada, H., Uematsu, K., Tame, A., Maruyama, T. and Kozuka, Y.: *J. Electron Microsc.*, **60**, 283–287 (2011)
 - 20) Pilavtepe-Çelik, M., Balaban, M.O. and Yousef, A.E.: *J. Food Sci.*, **73**, M423–M429 (2008)
 - 21) Yamada, H., Yamaguchi, M., Chikamatsu, K., Aono, A. and Mitarai, S.: *PLoS ONE*, **10**(1): e0117109. doi:10.1371/journal.pone.0117109 (2015)
 - 22) 村田和義 : 顕微鏡, **49**, 160 (2014)
 - 23) 太田啓介, 金澤知之進, 中村桂一郎: 顕微鏡, **49**, 161–165 (2014)
 - 24) 大野伸彦, 齊藤 成, 齊藤百合花, 大野伸一 : 顕微鏡, **49**, 166–170 (2014)
 - 25) 甲賀大輔, 久住 聡, 牛木辰男 : 顕微鏡, **49**, 171–175 (2014)
 - 26) 北 重夫 : 顕微鏡, **46**, 253–257 (2011)