

走査型電子顕微鏡によるゴルジ装置の形態解析

The Morphological Analysis of the Golgi Apparatus by Scanning Electron Microscopy

甲賀大輔, 牛木辰男

Daisuke Koga and Tatsuo Ushiki

^a新潟大学大学院医歯学総合研究科顕微解剖学分野

要旨 精巣上体管主細胞, 性腺刺激ホルモン産生細胞, 脊髄神経節細胞のゴルジ装置の三次元立体微細構造を, オスミウム浸軟した組織を用いて走査型電子顕微鏡で観察した. 精巣上体管細胞のゴルジ装置は, 扁平なゴルジ層板がシス側を外側にして重なり, 全体で火焰状もしくは, コップ状をしていた. 一方, 性腺刺激ホルモン産生細胞では, ゴルジ層板が同心円状に積み重なり, 全体でシス側を外側にした球状のゴルジ装置を形成していた. また, 脊髄神経節細胞では, 小さいゴルジ層板の重なりが細胞質内に多数分散していた. いずれの細胞のゴルジ装置も, シス最表槽は扁平な板状の槽からなり, その表面には多数の小さな孔があいていたが, トランス最表槽の構造は細胞の種類によって様々で, 管状と板状の槽の多様な組み合わせでできていた. なお, トランス最表槽は, しばしば粗面小胞体と接していたが, 両者間に直接的なつながりはみられなかった.

キーワード: 走査型電子顕微鏡, ゴルジ装置, 立体微細構造, シス最表槽, トランス最表槽

1. はじめに

ゴルジ装置は, 1898年にイタリアの病理学者 Camillo Golgi によって, 鍍銀染色を行ったフクロウの小脳プルキンエ細胞の中からはじめて見いだされた. その後, その構造について光学顕微鏡(光顕)や電子顕微鏡により, 多数の研究がおこなわれてきた. 今では, 透過型電子顕微鏡(透過電顕)で観察したゴルジ装置が, 扁平な槽(cistern)の積み重なりによってできており, 基本的にはシス最表槽, 中間槽, トランス最表槽の三つの要素からなることが知られている.

ところで, 光顕のオスミウム染色や鍍銀染色によって調べられてきたゴルジ装置の全体像はなかなか複雑で, 単純な模式図ではあらわせない多様な形状をしている¹²⁾. しかし, 透過電顕による超薄切片の観察では, この複雑で立体的なゴルジ装置の形状を理解することはかなり難しい. そこで, オスミウム染色や組織化学染色などを施した厚切り切片の高圧電顕観察がゴルジ装置の立体微細構造の研究に試みられてきた^{3~8)}. また近年では, 電顕トモグラフィーによるゴルジ装置の立体再構築も行われている^{9~13)}. 一方で, 走査型電子顕微鏡(走査電顕)によるゴルジ装置の研究は, これまでそれほど多くない^{14~16)}. しかし, 走査電顕が透過電顕に比べ焦点深度が深く, 試料を立体的に観察できることを思えば, ゴルジ装置の複雑な構造を解明するのに有効な顕微鏡であることが容易に想像される.

そこで私たちはこれまで, 高分解能走査電顕を用いてゴルジ装置の微細構造の解明を試みてきた. 本稿では, ゴルジ装置が良く発達した3種の細胞, すなわち, 精巣上体管の主細胞, 下垂体の性腺刺激ホルモン産生細胞, 脊髄神経節細胞を走査電顕で観察した結果について, 特に1) ゴルジ装置の全体形状, 2) ゴルジ層板, 3) シス最表槽の微細構造, 4) トランス最表槽の微細構造, に注目して述べる.

2. 走査電顕によるゴルジ装置の観察法

走査電顕で, ゴルジ装置やミトコンドリア, 小胞体などの膜性細胞小器官を観察するには, 田中ら^{17,18)}が開発したオスミウム浸軟法が有用である. そこで私たちはこの方法を用い, ラットの種々の細胞のゴルジ装置の観察を行っている. まず, 麻酔した実験動物を0.5%のグルタルアルデヒドと0.5%のパラホルムアルデヒドの混合液で灌流固定を行い, さらに1%の四酸化オスミウム水溶液で1時間固定をする. 次にこの試料を, 50%のジメチルスルホキシドに浸漬した状態で凍結割断を行い, その後, 0.1%四酸化オスミウム水溶液に, 70時間ほど浸漬することで浸軟処理を行う. 浸軟処理を終えた試料は, タンニン酸と四酸化オスミウムによる導電染色, エタノール上昇系列による脱水, 臨界点乾燥を行い, 金属コーティングを施した後に, 走査電顕で観察する. この方法により細胞内の可溶性成分と細胞骨格は溶け去り, 膜成分とリボソーム, クロマチンのみが残される. またゴルジ装置の観察には, 数万倍という高分解能が必要とされるので, 私たちは通常, 電界放出型走査電顕(S-5000, Hitachi)を用いている.

^a 〒951-8510 新潟市中央区旭町通り1番町757番地
TEL: 025-227-2062
E-mail: dk1224@med.niigata-u.ac.jp
2008年8月26日受付

3. 走査電顕でみたゴルジ装置の立体構造

3.1 ゴルジ装置の形状について

オスミウム浸軟法を用いた走査電顕による立体観察では、ゴルジ装置の立体微細構築だけでなく、その全体像を把握することが可能となる。このようにして走査電顕でみたゴルジ装置の形状は、細胞の種類によって大きく異なっている¹⁹⁾。例えば、精巣上体管の主細胞のゴルジ装置(図1a)は、透過電顕所見からも想像されるように、火焰状もしくは、コップ状をしているが、性腺刺激ホルモン産生細胞のゴルジ装置(図1b)は球状をしているのが特徴である。この球状のゴルジ装置については、すでに田中ら^{14,15)}が、走査電顕により、気管上皮細胞と下垂体前葉細胞(細胞種については不明)において報告している。しかし、層板の極性を含めその詳しい解析は、これまで行われていなかった。そこで、性腺刺激ホルモン産生細胞の球体のゴルジ装置を詳しく観察したところ、シス面が球体の外側、トランス面が内側に位置することが明らかになった。このことから、性腺刺激ホルモン産生細胞では、球体のゴルジ装置の内側(トランス側)で分泌果粒が産生され、何らかのメカニズムによって、球体の内側から外側に向かって輸送されると考えられる。

一方、脊髄神経節細胞のゴルジ装置(図1c)は、小さいゴルジ装置(ゴルジ層板のかたまり)が細胞質全体に多数散在しているのが特徴である。Rambourgら³⁾は、オスミウム染色した脊髄神経節細胞のゴルジ装置の厚切り切片を高圧透過電顕により観察し、これらのゴルジ装置が互いに連絡し、核周囲に連続した網(ネットワーク)を形成していると主張しているが、この点については現在、検討中である。

3.2 ゴルジ層板の基本構造

ゴルジ装置を構成するゴルジ層板は、1層のシス最表槽、数層の中間槽、1層のトランス最表槽からなる。このうち、シス最表槽とトランス最表槽は中間槽と比べ、複雑な形態を示すことが知られている。また、中間槽の層板の数は、細胞の種類によって異なっている。これらの基本構造は走査電顕で明瞭に観察できる(図2)。ところで田中ら¹⁵⁾は、涙腺細胞のゴルジ装置の走査電顕による観察から、1枚のゴルジ槽が、らせん状につながることで数層のゴルジ層板を形成しているという報告をしている。しかし、私たちが観察した細胞のゴルジ装置においては、このようなゴルジ槽の連続性は認められてない。一方、Marshら¹¹⁾は、電顕トモグラフィーの研究で、グルコースにより刺激したマウスのβ細胞のゴルジ装置に、ゴルジ槽間をつなぐ連結構造が観察されることを報告している。これは、細胞の機能が亢進することによりゴルジ装置の形態が変化することを示すもので、今後の詳しい解析が期待される点である。

3.3 シス最表槽の微細構造

これまでの超薄切片や厚切り切片の透過電顕による研究では、シス最表槽は、吻合した管の集まりであると考えられおり、シス管状網(cis tubular network)として紹介されてい

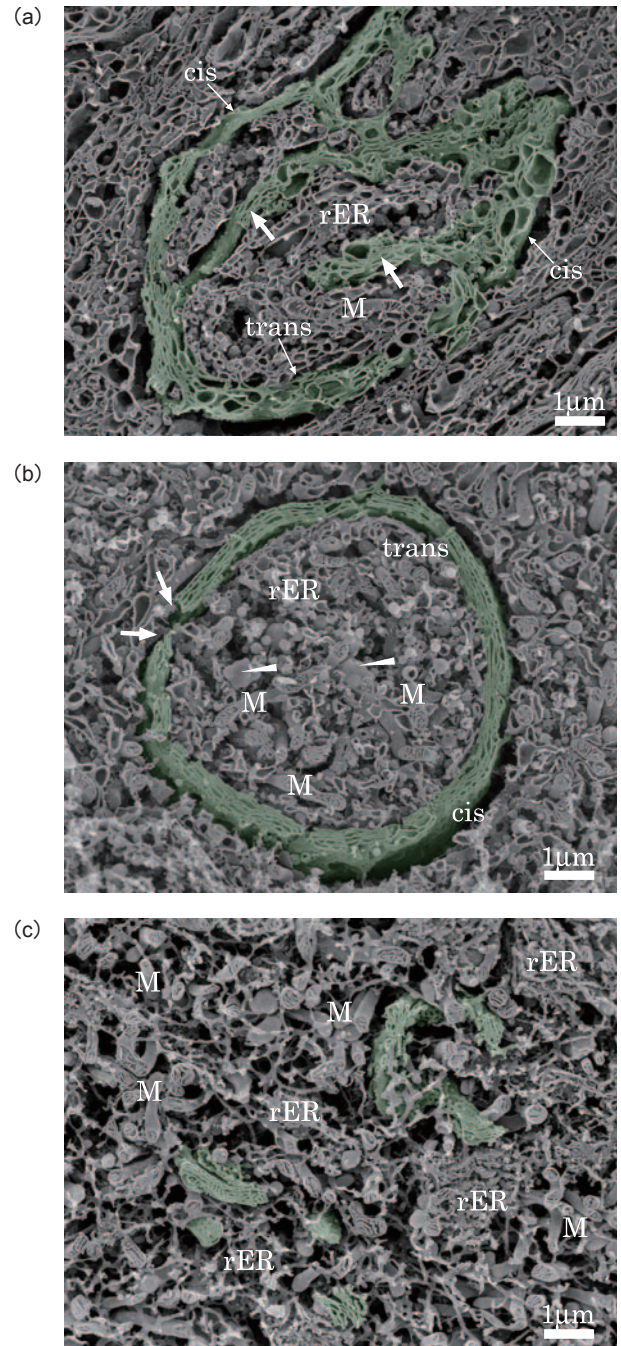


図1 ゴルジ装置の形状

(a) 精巣上体管の主細胞. この細胞のゴルジ装置(緑)は、火焰状もしくは、コップ状である。ゴルジ装置は、数層に積み重なった槽から構成されている。ゴルジ装置の内部にもゴルジ層板が入り込んでいる(矢印)。粗面小胞体(rER)やミトコンドリア(M)、分泌果粒もゴルジ装置の内部にみられる。

(b) 性腺刺激ホルモン産生細胞. この細胞の球状のゴルジ装置(緑)は、同心円状に積み重なった槽から構成されている。分泌果粒(矢じり)や粗面小胞体(rER)、ミトコンドリア(M)が球体のゴルジ装置内にみられる。球体の内側と外側を交通する窓の存在に注意(矢印)。シス(cis)とトランス側(trans)にも注意。

(c) 脊髄神経節細胞. この細胞では、小さなゴルジ装置(緑)が、細胞質内全体に多数分散している。ゴルジ槽は、数層積み重なったことでゴルジ層板を形成している。rER:粗面小胞体 M:ミトコンドリア

ることが多い^{4,6,7)}。しかし走査電顕で見たシス最表槽は、網というよりは扁平な板に直径約 30 nm の小さな孔があいた構造である。さらに、シス最表槽にはこの小さな孔とは別に、大きな窓もあいている (図 3)。もっともこの窓の部分では、その下の中間槽にも同様な窓が存在し、全体でゴルジ装置のシス側とトランス側をつなぐトンネルを形成しているのが特徴である。またこの窓に小胞体やミトコンドリア、分泌果粒などの細胞小器官が通り抜ける様子もみられることから、この窓がシス側とトランス側をつなぐ通路として使われていることが想像される。

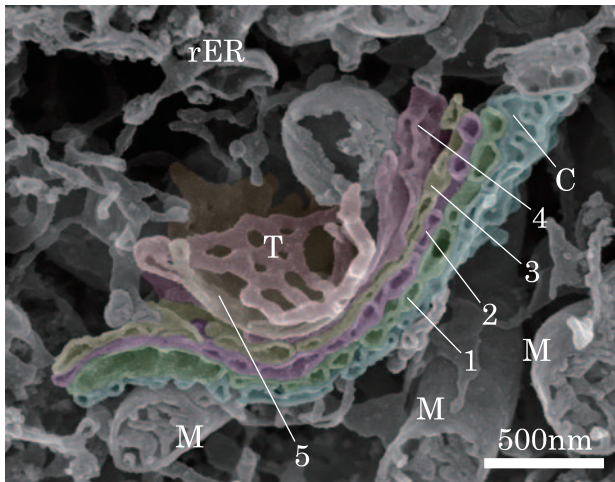


図 2 ゴルジ層板 (脊髄神経節細胞)
脊髄神経節細胞では、ゴルジ層板は中間槽 (1, 2, 3, 4, 5) とシス最表槽 (C)、トランス最表槽からなる (T)。rER: 粗面小胞体。M: ミトコンドリア

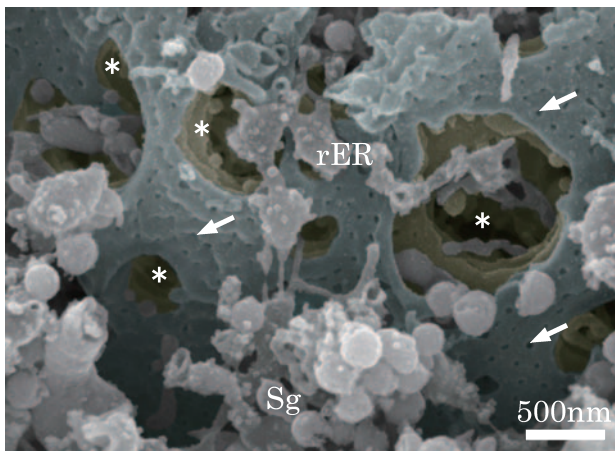


図 3 シス最表槽の微細構造 (性腺刺激ホルモン産生細胞)
シス最表槽 (青緑) は扁平な板状構造で、その表面には、たくさんの小さな孔があいている (矢印)。さらに、シス最表槽には大きな窓 (*) もあいており、その下にある中間槽にも同様な窓が同じ位置にあいている。この窓は、ゴルジ装置の外側と内側を連絡する通路と考えられる。rER: 粗面小胞体 Sg: 分泌果粒

3.4 トランス最表槽の微細構造

トランス最表槽の形状は、細胞の種類により様々であるが、基本的には、管状もしくは板状の槽から構成されている。例えば、精巢上体管主細胞のトランス最表槽は、管状の槽が互いに連結することで二次元的に広がっている (図 4a)。また、この管状の槽のところどころに、透過電顕でみられるような²⁰⁾、分泌果粒の形成を思わせる球状の膨らみも観察される。一方、性腺刺激ホルモン産生細胞のトランス最表槽は、扁平で板状の槽と吻合した管状の槽が互いにつながった構造をしている (図 4b)。また脊髄神経節細胞のトランス最表槽は、管状の槽が吻合することで、あたかもレース細工のような形状を呈する (図 4c)。これらの所見は、Clermont ら²¹⁾ の透過電顕観察ともよく一致している。なお、彼らの報告によれば、トランスゴルジ網 (いわゆるトランス最表槽) が存在しない細胞も存在し、その形状も細胞種により様々で、細胞の機能との関係も深いという。

3.5 粗面小胞体とゴルジ層板の連結について

Novikoff ら²²⁾ は、脊髄神経節細胞のゴルジ装置を透過電顕により観察し、シス最表槽と小胞体の両者間の連続性について報告している。彼らは、このゴルジ装置 (G) に連続した小胞体 (ER) がライソゾーム (L) を産生することから、この構造を GERL 複合体 (Golgi-ER-Lysosome complex) と呼んだ。しかし、後の透過電顕による研究では、トランス最表槽と小胞体との間に連続性はみられないという報告もなされている^{7,20,23,24)}。私たちがこれまで走査電顕で観察した細胞においては、トランス最表槽と小胞体との間に連続性はみられなかったが、両者が近接しているか、接触している様子は比較的多く観察された。今後、この問題を解決するために、細胞種を考慮して、小胞体とトランス最表槽の関係に注目する必要があると考えている。

なお、シス最表槽と粗面小胞体との連続性を示す報告^{14,15)} もあるが、これについても、これまでの私たちの走査電顕観察では、確認できていない。

4. まとめ

本稿では、オスミウム浸軟法により、ラットの各種細胞のゴルジ装置を走査電顕で観察し、その三次元立体微細構造について解説すると共に、いくつかの点に絞って過去の報告との比較検討をおこなった。一般にゴルジ装置の構造は、単純な層板構造として描かれることが多いが、実際のゴルジ装置の形状は極めて多様で、細胞の種類によって大きく異なっていることがわかっていただけたのではないだろうか。また、トランス最表槽、中間槽、シス最表槽のうち中間槽の数は、細胞の種類によって様々であること、シス最表槽とトランス最表槽は複雑な形状をとることも示した。シス最表槽の形態は、いずれの細胞においてもよく似ており、表面に直径約 30 nm の小さな孔が存在するが、トランス最表槽の構造は、細胞の種類によって多様であることを示した。

今後、オスミウム染色や組織学的手法を走査電顕に適用し、

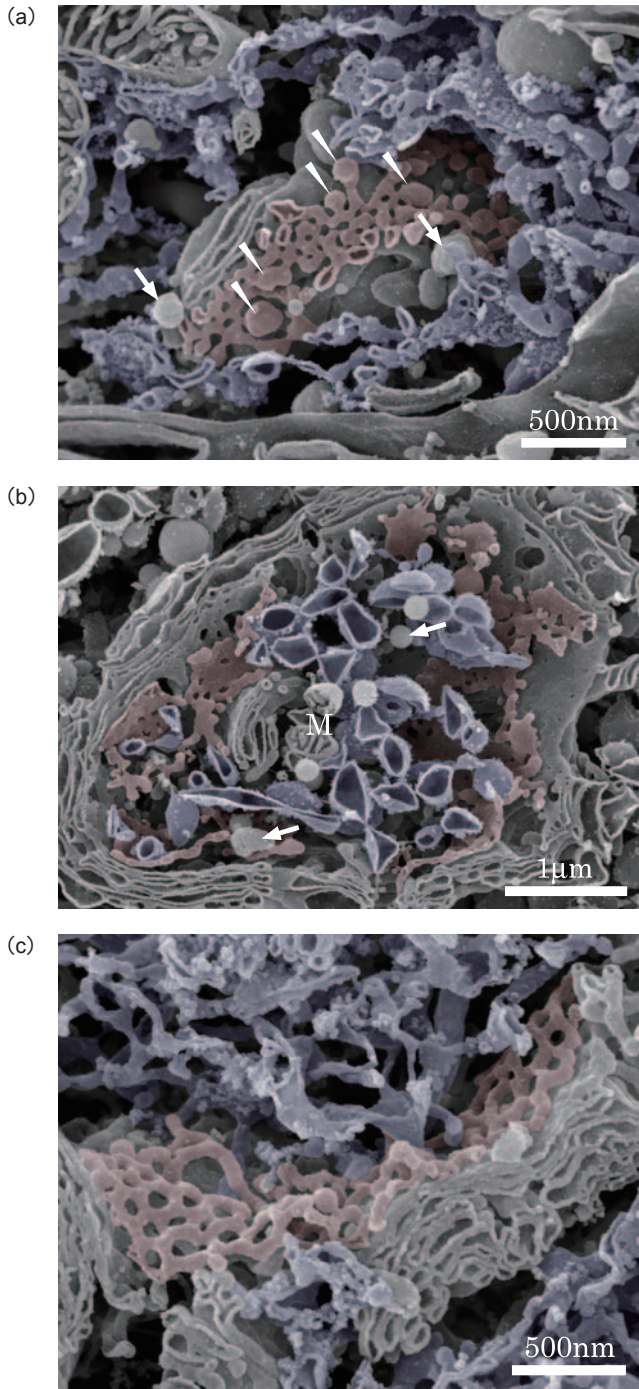


図4 トランス最表槽の微細構造

(a) 精巣上体管の主細胞. この細胞のトランス最表槽(赤)は、吻合した管状構造から構成されている。これらの管状の槽では、ところどころで結節状の膨らみ(矢じり)を観察できる。粗面小胞体(青)はトランス最表槽と近接しているが、両者間に連続性はみられない。矢印: 分泌果粒

(b) 性腺刺激ホルモン産生細胞. 性腺刺激ホルモン産生細胞では、トランス最表槽(赤)は、板状の槽が吻合した管状の槽により、互いにつながっている。粗面小胞体(青)とトランス最表槽は、互いに複雑に絡まっているが、両者をつなぐ構造は確認できない。矢印: 分泌果粒

(c) 脊髄神経節細胞. この細胞のトランス最表槽(赤)は、吻合した管状槽からなる網のようにみえる。トランス最表槽と粗面小胞体(青)は、互いに複雑に絡み合っているが、両者間をつなぐ構造はみられない。

一方で細胞の機能状態を変化させることで、この複雑なゴルジ装置の形態をさらに詳しく解明し、ゴルジ装置の謎にせまっていきたいと考えている。

文 献

- 1) Wilder, G. and Penfield, M.A.: *Brain.*, 43, 290-305 (1920)
- 2) Beams, H.W. and King, R.L.: *Anat. Rec.*, 59, 363-373 (1934)
- 3) Rambourg, A., Clermont, Y. and Marraud, A.: *Am. J. Anat.*, 140, 27-46 (1974)
- 4) Rambourg, A., Clermont, Y. and Hermo, L.: *Am. J. Anat.*, 154, 455-476 (1979)
- 5) Rambourg, A., Segretain, D. and Clermont, Y.: *Am. J. Anat.*, 170, 163-179 (1984)
- 6) Rambourg, A., Clermont, Y., Hermo, L. and Segretain, D.: *Am. J. Anat.*, 179, 95-107 (1987)
- 7) Rambourg, A., Clermont, Y. and Hermo, L.: *Am. J. Anat.*, 183, 187-199 (1988)
- 8) Rambourg, A., Clermont, Y., Chretien, M. and Olivier, L.: *Anat. Rec.*, 232, 169-179 (1992)
- 9) Ladinsky, M.S., Mastronarde, D.N., McIntosh, J.R., Howell, K.E. and Staehelin, L.A.: *J. Cell Biol.*, 144, 1135-1149 (1999)
- 10) Marsh, B.J., Mastronarde, D.N., Buttle, K.F., Howell, K.E. and McIntosh, J.R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 2399-2406 (2001)
- 11) Marsh, B.J., Volkmann, N., McIntosh, J.R. and Howell, K.E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 5565-5570 (2004)
- 12) Mogelvang, S., Marsh, B.J., Ladinsky, M.S. and Howell, K.E.: *Traf-fic.*, 5, 338-345 (2004)
- 13) Trucco, A., Polishchuk, R.S., Martella, O., Pentima, A.D., Fusella, A., Giandomenico, D.D., Pietro, E.S., Beznoussenko, G.V., Polishchuk, E.V., Baldassarre, M., Buccione, R., Geerts, W.J.C., Koster, A.J., Burger, K.N.J., Mironov, A.A. and Luini, A.: *Nat. Cell Biol.*, 6, 1071-1081 (2004)
- 14) Tanaka, K. and Fukudome, H.: *J. Electr. Microsc. Tech.*, 17, 15-23 (1991)
- 15) Tanaka, K., Mitsushima, A., Fukudome, H. and Kashima, Y.: *J. Sub-microsc. Cytol.*, 18, 1-9 (1986)
- 16) Ho, H.C., Tang, C.-Y. and Suarez, S.S.: *Anat. Rec.*, 256, 189-194 (1999)
- 17) Tanaka, K. and Mitsushima, A.: *J. Microsc.*, 133, 213-222 (1984)
- 18) Tanaka, K. and Naguro, T.: *Biomed. Res.*, 2, Suppl, 63-70 (1981)
- 19) Koga, D. and Ushiki, T.: *Arch. Histol. Cytol.*, 69, 357-374 (2006)
- 20) Hermo, L., Rambourg, A. and Clermont, Y.: *Anat. Rec.*, 229, 159-176 (1991)
- 21) Clermont, Y., Rambourg, A. and Hermo, L.: *Anat. Rec.*, 242, 289-301 (1995)
- 22) Novikoff, P.M., Novikoff, A.B., Quintana, N. and Hauw Jean-Jacques.: *J. Cell Biol.*, 50, 859-886 (1971)
- 23) Inoue, K. and Kurosumi, K.: *Cell Struct. Function*, 2, 171-186 (1977)
- 24) Inoue, K. and Kurosumi, K.: *Anat. Rec.*, 225, 272-278 (1989)