

## 植物の免疫電子顕微鏡法

## Immunogold Labeling for Plant Tissues and Cells

佐藤 繭子, 後藤 友美, 豊岡 公徳

Mayuko Sato, Yumi Goto and Kiminori Toyooka

国立研究開発法人理化学研究所 環境資源科学研究センター

技術基盤部門 質量分析・顕微鏡解析ユニット

**要旨** 植物は、厚い細胞壁や大きな液胞、硬いデンプン顆粒など植物特有の細胞内小器官・細胞構造をもつことから、電子顕微鏡（電顕）観察にあたって、試料調製時に様々な工夫が必要である。本稿では、植物の器官・組織・培養細胞を対象として、免疫電顕観察を行うための固定法から樹脂包埋、超薄切片作製に至るまでの工夫について紹介する。また免疫金染色法に関して、実例を用いて解説する。

**キーワード**：植物、高圧（加圧）凍結/凍結置換法、免疫電子顕微鏡法、イムノゴールドラベリング

## 1. はじめに

免疫電子顕微鏡（免疫電顕）法は、抗原抗体反応を利用して目的とする抗原の局在を、電子顕微鏡（電顕）下で識別可能な標識でラベルした抗体を用いて検出する方法である。蛍光イメージング技術が発展し、蛍光タンパク質で容易に目的とする分子を可視化できるようになった現在においても、組織や細胞内の分子の局在を証明する強力な技術である。植物は厚い細胞壁や大きな液胞、硬いデンプン顆粒など植物特有の細胞内小器官・細胞構造をもつ。そのため、植物試料は、一般的な動物試料より固定・樹脂包埋が難しく、電顕で観察するだけでも様々な工夫が必要である。さらに、植物は大きな液胞を持つことから凍結切削は難しく、厚い細胞壁により抗体の浸透が悪いことから包埋前染色法には不向きである。また、植物細胞の内容物は、動物細胞に比べ何倍も速い原形質流動で動いている<sup>1)</sup>。輸送小胞や液胞など単膜系オルガネラをより正確に捉えるには、瞬時に凍結し動きを止める凍結固定法を取り入れる必要がある。

動物試料を用いた免疫電顕に関する書籍<sup>2)</sup>や総説<sup>3)</sup>など多数あるが、植物試料に関してまとめたものは少ない。本稿では、植物器官・組織、培養細胞を、包埋後染色（post-embedding）法により免疫電顕観察を行うための、化学固定法と高圧凍結/凍結置換法による試料調製、免疫金染色を詳細に解説する。

## 2. 化学固定による植物試料調製

## 2.1 細切・固定

免疫電顕で重要なことは、生きた状態に近い構造を保つことだけでなく、アーティファクトが少なく、使用する抗体が認識するだけの抗原性を保った状態で固定を行うことである。そのため、できる限り低温（4°C など）で固定・脱水し、可能であれば低温包埋する。構造観察とは異なり、四酸化オスミウム（OsO<sub>4</sub>）を用いて固定すると抗原性が失われてしまうことが多いため、免疫電顕はアルデヒドのみで固定する。筆者らは、固定は4%ホルムアルデヒド/2%グルタルアルデヒド（GA）/0.05 M リン酸緩衝液（pH 7.4）で行っている。GAは濃度が高いほど形態保持に優れるが、その一方で抗原性を下げる可能性があるため、試料によっては0.1～1%程度に濃度を抑える。どの濃度が良いかは、それぞれの抗原・抗体にもよるため、可能なら濃度を振って条件検討する。ホルムアルデヒド水溶液は古くなると固定力が低下することがあるので、パラホルムアルデヒド粉末を溶解して、用時調製している。GAも古くなると固定力が下がるので、アンブルに入ったものが良い。

シロイヌナズナ、イネなどの器官・組織を固定する場合は、植物個体を乾燥させないように採取し、プラスチックフィルムなどの上で固定液に浸けながら、カミソリで1～3 mm角に細切する（図 1a）。試料が沈むよう、デシケーターで-0.08 MPaまで脱気した後、大気圧に戻すことを5～6回繰り返す。脱気しても浮いている試料は取り除くと良い（図 1b）。筆者らは沈みにくいものは、ユニカセット（サクラファイナテックジャパン社）で固定液に沈めた上で脱気している（図 1c, d）。脱気後、4°Cで2時間固定し、0.05 M リン酸緩衝液で洗う。

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

TEL: 045-503-9116; FAX: 045-503-9580

E-mail: toyooka@riken.jp

2017年5月8日受付、2017年6月14日受理

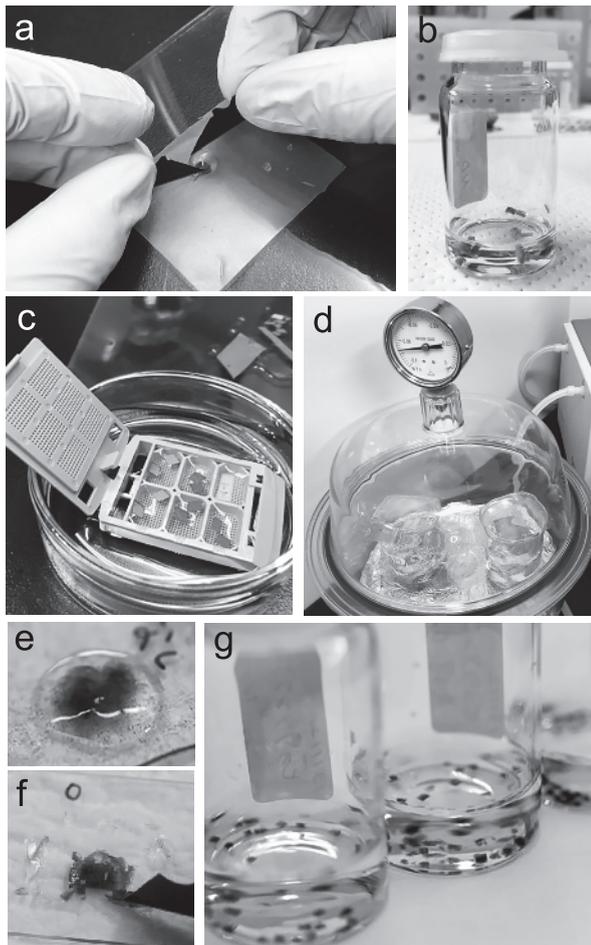


図1 細切と固定 (a) タバコの葉の細切. (b) 固定液に移した茎の細切片. (c) ユニカセットに入れたタバコ葉の細切片. (d) 固定液に沈め脱気中のユニカセット. (e) アガロースに埋めたコケの原糸体. (f) 細切中のアガロース. (g) 固定液に移した細切後のアガロース.

タバコ培養細胞・コケ原糸体などの浮遊細胞は、寒天包埋またはペレットにしてから固定するとよい(図1e)。寒天包埋の場合は、チューブに遠心して集めたペレットに2~3%低融点アガロースを等量加え、固まる前によく混ぜ、低速で遠心する。氷上などで軽く冷やしてゲルが固まり次第、カミソリで1mm角の立方体に細切する。コケの原糸体などピンセットでつまめるものは、遠心せずにアガロースに埋めてもよい(図1f, g)。

## 2.2 脱水・樹脂置換・包埋

一般的に脱水にはエタノールが用いられる。100%アルコール(モレキュラーシーブスで脱水したもの)は3回以上、液交換を行う。デンプン顆粒やタンパク質貯蔵液胞などを含む種子など、脱水されにくい試料では、エタノールより分子量が小さく脱水効果の高いメタノールを用いる、もしくはアルコールの後に100%アセトンによる脱水を2, 3回行うと、良い効果が得られる場合がある。メタノールは脱水が速く、組織の収縮や変形が起こりやすいので、用いる際はエタノー

ルより低濃度から始める(例えば、12.5%や25%)。各ステップの濃度差を小さくするなど、注意が必要である。

免疫電顕では、エポキシ系樹脂ではなく、LR White や Lowicryl HM20 などのアクリル系樹脂に包埋する。100%アルコール:アクリル樹脂=3:1, 1:1, 1:3を各1時間以上~半日、4°Cで置換し、100%アクリル樹脂で2回以上交換した後、4°Cで一晩置換する。アクリル樹脂は使用前に脱気しておく。熱重合の場合、ゼラチンカプセルであれば50~55°Cで24~48時間、プラスチックカプセルを用いる場合は温度60°C以上で加熱しないとブロック表面が重合不良になりやすい。カプセルの変形を防ぐため、5時間くらいかけてゆっくり温度を上げるとよい。紫外線重合の場合、紫外線重合装置(堂阪イーエム社製TUV-200など)を用いて、-20°C以下の低温で72時間重合させる。

## 3. 高圧凍結/凍結置換法による植物試料調製

前述のような化学固定によるゆっくりとした細胞固定過程では様々なアーティファクトが加わり、電顕における観察像は生体の真の姿を正確に反映しているとはいえない。そこで生体に限りなく近い状態で観察することを目的に、凍結技法が開発されてきた。細胞はその60%以上を水分で占められていることから、常圧では0°C以下に冷却されると氷の結晶(氷晶)が急速に形成され、細胞は著しく損傷し、観察不適になる。高圧凍結技法(High pressure freezing; HPF)は、高圧下では水の融点が低下し、氷晶形成が常圧より起こりにくいことに基づき開発され、氷晶を形成させずに凍結可能な試料範囲を、大幅に広げた(数百 $\mu\text{m}$ )。しかしながら、実施するのに高価な高圧凍結装置が必要であること、高圧による試料変形の可能性があることは、難点としてあげられる。高圧凍結装置として、Leica社のHPM100やEM-PACTなどがあり、近年では、Leica社よりEM ICEが発売されている。

凍結固定した試料を樹脂包埋する場合、一般的に試料凍結後に、凍結置換法を適用する。アセトンなどの有機溶媒に固定剤を溶かした固定液を、氷晶の再形成が起こらない-80°C以下の低温で試料内に置換した後、徐々に温度上昇させる。

高圧凍結/凍結置換法は形態保持だけでなく、通常の浸漬固定法より細胞内のタンパク質等の分子が保持されると言われており、化学固定では検出できなかった分子の細胞内局在を明らかにできる可能性を秘めている。凍結固定法は、抗原性の保存に優れるという利点から、免疫電顕での活用も期待できる。様々な抗原・抗体に対応できるよう、試料の数や量に余裕があれば、数種類の固定液で凍結置換を条件検討している。

### 3.1 高圧凍結固定

細胞内の氷の結晶の成長速度を遅らせるために高圧凍結の際、凍結保護剤としてショ糖(sucrose)が効果的である。植物試料をsucrose濃度が高いプレートに移すことで良好な凍結結果をえる方法がある<sup>4,5)</sup>。植物を生育または培養する際、プレートや液体培地にsucroseなどの糖が含まれており、

例えばタバコ培養細胞 BY-2 株では、3% (0.087 M) の sucrose が含まれている。そのため、培養細胞を凍結する際は、分裂期・増殖期の細胞は、培養した培地をそのまま凍結保護剤として利用する。定常期の培養細胞を試料として用いる場合、培地中の sucrose が消費され濃度が低くなっていると考えられ、そのまま固定すると凍結不良になることが多かった。そこで高圧凍結装置に仕掛ける前に、新しい培地に定常期の培養細胞を攪拌してから用いると、氷晶ができにくくなるなど改善が見られた<sup>5)</sup>。我々が用いている高圧凍結装置 Leica EM PACT (図 2a) で凍結する場合、実体顕微鏡で確認しながら、EM PACT 用の Flat specimen carrier に試料を傷つけないように載せる。タバコ培養細胞 BY-2 株のような培養細胞は、液体培養の細胞懸濁液をそのまま用いると、細胞密度が低過ぎるため、懸濁液をスポイトで一旦キムワイプ等に乗せ、濾してからピンセットの先端に載せるようにすると扱いやすい。植物体の場合、例えばシロイヌナズナの根端であれば、実体顕微鏡で確認しながら、植物体が乾燥しないように蒸留水 (DW) や液体培地中でカミソリを用いて細切する (図 2b)。Flat specimen carrier に試料を傷つけないようにセットし、0.1 M sucrose 入り液体培地やアガロース等で、残りのスペースを埋める (図 2c, d)。試料の装填する部位に空気が残ると HPF がうまく行かないので、ピンセットの先端などで丹念に気泡をのぞく。holder-pod に carrier を装填し、高圧凍結装置にかける。試料の carrier への充填から凍結までの操作は、なるべく手早く行う。

### 3.2 凍結置換・樹脂包埋

凍結置換の際には、可能であれば数種類の凍結置換固定液を試すことにしている。以下にその例を示す。

A. グルタルアルデヒド (GA) のみ (0.1 ~ 1% GA アセトン溶液)。GA は 70% 水溶液を脱水アセトンで希釈する。10% GA アセトン溶液も販売されているので、それを利用してよい。例えば図 3a は、1% GA アセトン溶液を用いて固

定し、葉緑体に含まれ炭素固定反応に関与する酵素リブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼのラージサブユニット (RubisCO-LSU) を抗 RubisCO-LSU 抗体で免疫電顕した結果である。

B. グルタルアルデヒド + 酢酸ウラニル (UA) (0.25% GA + 0.2% UA アセトンなど)。UA によるブロック染色も兼ねるので、コントラストの上昇が期待される。

C. 低濃度オスミウム単独固定 (0.01 ~ 1% OsO<sub>4</sub> アセトン溶液)。一般的に免疫電顕用の試料調製では、OsO<sub>4</sub> 固定は避けられる。しかし、抗原、抗体の種類によっては、OsO<sub>4</sub> 固定によっても抗原性が維持され、抗体反応が可能なこともある (詳しくは 5.4 参照)。OsO<sub>4</sub> 結晶 (日新 EM 社製 オスミウム酸結晶 0.1 g など) をアセトンで溶かして用いる。OsO<sub>4</sub> 結晶はアセトンに容易に溶解するが、室温では黒化が早いので、アセトンは冷やしたものを使用し、溶液作製後すぐに -80°C 以下で冷やしておく。

D. グルタルアルデヒド・オスミウム混合固定 (0.1 ~ 1% GA + 0.01 ~ 1% OsO<sub>4</sub> アセトン溶液)。C の OsO<sub>4</sub> 単独固定

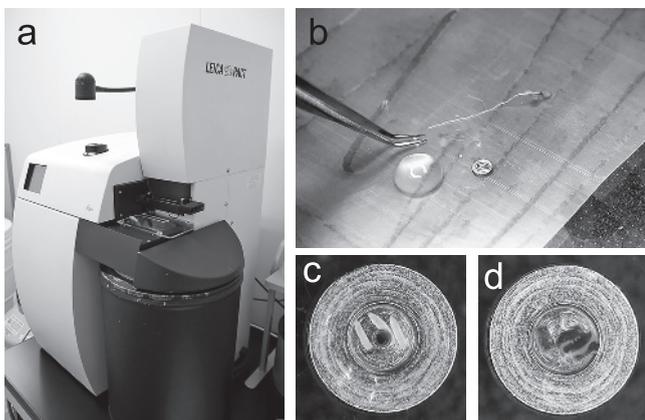


図 2 高圧凍結 (a) 高圧凍結装置. (b) パラフィルム上の液体培地中でシロイヌナズナ芽生えを細切. (c) Flat specimen carrier に詰めたシロイヌナズナ根端, (d) Carrier に載せたシロイヌナズナ葉の細切片.

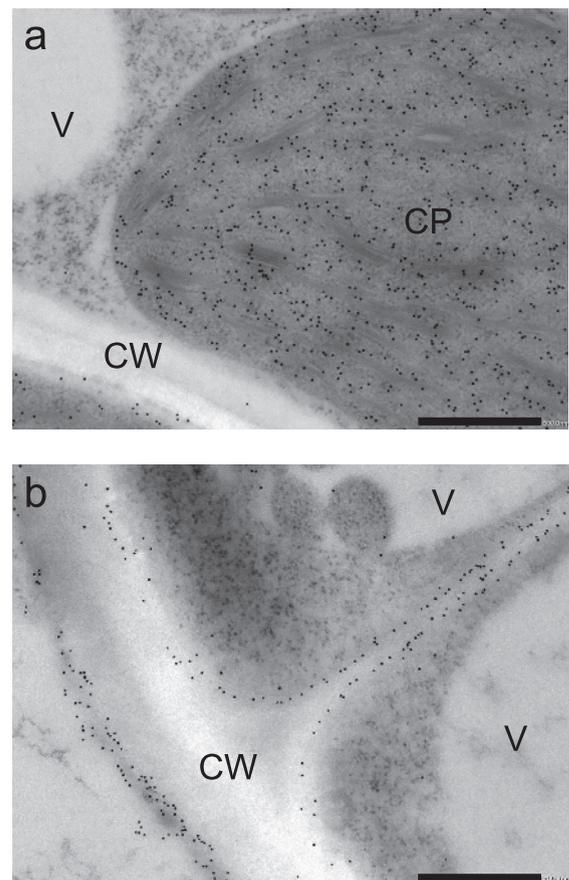


図 3 免疫電顕の例 (a) シロイヌナズナ葉を高圧凍結後、1% GA アセトン溶液で凍結置換。抗 RuBisCO-LSU 抗体で免疫染色。葉肉細胞の葉緑体の拡大部。 (b) シロイヌナズナ葉を高圧凍結後、1% GA アセトン溶液を用いて固定。CCRC-M7 抗体 (細胞壁成分に反応) で免疫染色。孔辺細胞の細胞壁を拡大。CP : 葉緑体, CW : 細胞壁, V : 液胞, スケールバー : 500 nm

に加え、GAでタンパク質も固定する。それぞれ終濃度の2倍の濃度で溶液を作製しておき、凍結試料を入れる直前に、GAとOsO<sub>4</sub>を混合して用いる。

E. アセトンのみ。構造の保存性、像のコントラストは、固定剤が入っているもの比べ劣るが、GAやOsO<sub>4</sub>によって抗原が変性する恐れがある場合、試すことがある。

-80°C以下での置換は、一般的に最低48時間であるが、12時間で問題ないこともあった。植物試料の場合、5日以上置くとサンプルと固定液が馴染んでよいとする場合もあり、筆者らは日程的に可能であればそのようにしている。-80°C以下で凍結置換した後、徐々に温度を上げる。温度上昇は-80°C、-20°C等の冷凍庫間を移動させることで可能であるが、プログラム機能付きの凍結置換装置EM AFS (Leica社製) や、クライオポーターCS-80CP (サイニクス社製) などがあると、自動で温度を上げられるので便利である。クライオポーターは装置自体が比較的安価で、液体窒素を使わないため簡便である。温度の上げ方は、それぞれの研究者、試料によって、様々なバリエーションが報告されている。筆者らが植物組織で用いているスケジュールの一例は下記の通りである。-80°Cで48時間以上、+3°C/hrで、20時間かけて-20°Cまで上げる。そして、+1°C/hrで、24時間かけて+4°Cまで上げる(途中、-20°C前後で、固定液を攪拌しておく、固定ムラが少なくなる。)その後、4°Cに冷やした100%アセトンで3回以上洗浄する。洗浄中から洗浄後にかけて、carrierから試料を取り出す。ピンセットと柄付き針にて試料を傷つけないように注意して行い、試料は固定瓶に移す。続いて樹脂置換であるが、LR White樹脂の場合はアセトンとの相性が悪いので、メタノールに置換しておく(100%アセトン:100%メタノール=1:1を30分、メタノールのみ30分~1時間を2回、いずれも4°C)。4°CでLR White樹脂等の樹脂置換し、前述2.2と同様に、包埋、重合を行う。OsO<sub>4</sub>入りなど黒い試料の場合、UV重合は出来ない、熱重合させる。

凍結置換後の温度上昇を-40~-20°Cの低温で止め、低温下で試料の洗浄~樹脂置換~重合まで完了させる方法もある。抗原の維持、微細構造の保存性は、こちらの方が上であるので、設備があれば試してみるとよい。

凍結固定試料では、化学固定に比べ構造保存性がよく、樹脂が浸透しにくい傾向がある。浸透しづらい試料の場合、樹脂置換を低濃度から始め、各ステップにかける時間を長くすることで改善することがある。

#### 4. 超薄切

60~80 nm厚(色調はシルバーからシルバーゴールド)の超薄切片を作製し、ニッケルグリッドに載せる。植物試料では、切片の細胞壁と樹脂の境界面で、樹脂剥離が起こりやすい。またデンプン顆粒、液胞中の二次代謝物など樹脂のなじみが悪い構造体も多く、支持膜なしでは、電顕観察の電子線照射時に切片が破れることが多い。特に凍結試料では顕著である。対策として、支持膜を張ったグリッド(200~400

mesh/inch)に切片を載せる。抗原が少ない場合や抗原抗体反応が弱い場合には、600 mesh/inch以上のグリッドに支持膜なしで切片を載せ、両面から抗体染色してもよい。

#### 5. 免疫金染色および電子染色

免疫金染色は、抗原抗体反応を応用して、ウエスタンブロットニングや蛍光抗体染色法と同じように、切片中の抗原を金粒子でラベルした抗体を用いて検出する方法である。具体的には、超薄切片の抗原を認識する1次抗体を反応させ、さらにその抗体のH鎖やL鎖、Fc領域など認識する金コロイド標識した二次抗体を反応させることで、抗原の位置する場所に金粒子の影を作る。さらに他の抗原も検出したい場合は、異なる動物種の抗体と大きさの異なる金粒子を結合した2次抗体を用いて検出する。

我々が行ってきた免疫電顕で解析例をあげると、化学固定では、アズキ発芽子葉におけるプロテアーゼやアミラーゼの細胞内局在解析<sup>6)</sup>、ミラクルフルーツの味覚修飾物質ミラクリンの組織・細胞内局在解析<sup>7)</sup>などがある。高圧凍結法を取り入れた免疫電顕例として、シロイヌナズナ葉におけるペルオキシソーム選択的オートファジー分解に関わるATG8分子の検出がある<sup>8)</sup>。図3bは、シロイヌナズナ葉を高圧凍結後、1% GAアセトン溶液を用いて固定し、抗CCRC-M7抗体および12 nm金粒子結合2次抗体で免疫染色した細胞壁成分の局在を示す免疫電顕結果である。孔辺細胞の細胞壁と細胞膜の間に薄いペクチン層の存在がわかった。この方法は、固定・包埋法の選択、抗体の良し悪し、染色条件が結果に大きく影響する。抗体の入手法及び作製法について述べた後に、免疫金染色法について述べる。

##### 5.1 抗体の入手・作製・精製

抗体は、自作、企業への外部委託で作製する他、購入、譲渡などにより入手する。マウスやヒトなど動物では、大抵のタンパク質に対する抗体は既製品が豊富であるが、植物の抗体は市販されていないことも多いため、自ら作製する必要も出てくる。自作の場合、抗原は、試料から精製するか、大腸菌で合成、ペプチド合成、in vitroタンパク質合成系などを用いて用意する。抗体作製するためには、免疫誘導するのに十分な抗原量が必要である。試料からタンパク質を精製できれば良いが、難しい場合は大腸菌等で合成する。

購入する場合、既に論文等の免疫電顕で実績のある抗体や免疫組織染色で使える抗体があれば、利用する。

そして、できる限り精製度が高い抗体を使うと良い。精製度の高い順に並べると、モノクローナル抗体>Affinity精製>IgG精製>硫酸分画>抗血清 となる。また、ペプチド抗体やモノクローナル抗体より、抗体価の高いポリクローナル抗体の方が良いことが多い。

初めて免疫電顕する時は、論文など参考に必ず染まる試料と抗体をポジティブコントロールとして一緒に試すことを推奨する。抗体はロットが変わると染まらないことがあるので注意する。入手後、失活およびコンタミネーションを避ける

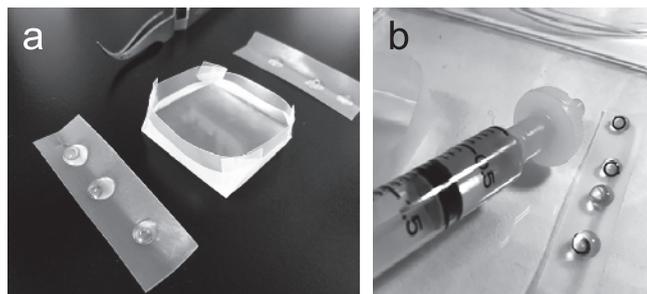


図4 免疫染色と電子染色 (a) パラフィルム上の水滴中で免疫染色中のグリッドと、洗浄用のパラフィルム製ポート、(b) 酢酸ウラニル水溶液の水滴中で電子染色中のグリッド

ために、分注して保存する。

## 5.2 免疫金染色

抗体染色処理は、水滴状の抗体溶液にグリッドを浮かべる、もしくは沈めて行う (図 4a)。支持膜を張ったグリッドは浮かべて染色する。LR White 樹脂に包埋した植物試料の切片は、電子線照射により破れやすい。支持膜があると破れることなく観察できるメリットがあるが、抗体反応が片面のみとなるため、抗原が少ない場合や抗体価の弱い場合は不利である。一方、支持膜のないグリッドに切片を載せた場合は、抗体溶液にグリッドを沈めて切片の両面から抗体反応させる。処理は、ブロッキング、洗い、一次抗体反応、洗い、二次抗体反応、洗い、DW で洗い、乾かすという流れになる。

始めに、ニッケルグリッドに載せた切片を 10% ウシ血清アルブミン (BSA) 溶液でブロッキングし、トリス緩衝生理食塩水 (TBS) で洗浄したのちに、抗体希釈液で 1 時間以上、室温で反応させる。その際の一次抗体の濃度は、ウエスタンブロットの 5~10 倍濃度、蛍光抗体染色法の 2~5 倍濃度から試すことを推奨する。ネガティブコントロールとして、免疫前血清、付くはずのない抗体、二次抗体のみの条件などでも処理しておく。

洗浄は、パラフィルムで作ったポート等に TBS を入れ、ピンセットでグリッドを移動し、数分間洗浄する。ピンセットの先に一次抗体溶液が残りやすい場合があるので、濾紙で吸う、2~3 回 TBS で洗浄するなど工夫し、未反応の抗体を完全に除去することが重要である。TEM 観察した際、非特異的な金粒子が多い場合は、0.01~0.1% Triton X-100 など界面活性剤を加えて洗う。

二次抗体は、Jackson ImmunoResearch 社の 6 nm, 12 nm, 18 nm gold 結合 Anti-Rabbit IgG(H + L) antibody や、British-Biocells International 社の 5 nm, 10 nm, 15 nm gold 結合の二次抗体などお勧めする。5 nm, 6 nm の金粒子は TEM 観察時に見えづらく、またサイズが大きくなるほど落ちやすいので、初めて単染色で免疫染色する場合は 10 nm または 12 nm を推奨する。二次抗体は、我々は 20 倍希釈程度で用いており、室温 30 分で問題なく反応する。

二次抗体反応後の洗浄は、二次抗体自体による非特異的な反応がない限り TBS に界面活性剤を加える必要はない。TBS

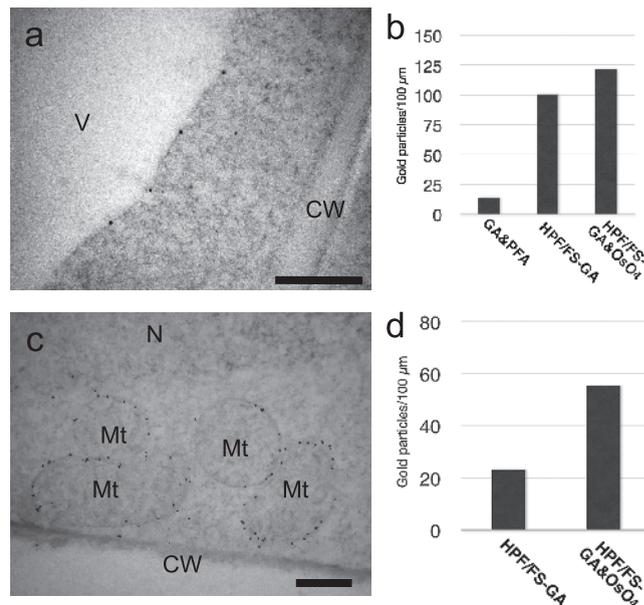


図5 異なった凍結固定液による金粒子シグナルの違い (a) タバコ培養細胞 BY-2 株を高圧凍結後、1% GA&1% OsO<sub>4</sub>/アセトン溶液により凍結置換。LR White 樹脂切片を抗 Vacuolar-H<sup>+</sup>-PPase 抗体で免疫金染色。(b) 免疫金染色における液胞膜 100 μm 当たりの金粒子数。化学固定法 (2% GA&4% PFA)、高圧凍結/凍結置換法 2 種類 (凍結置換液 1% GA/アセトン (HPF/FS-GA)、もしくは 1% GA&1% OsO<sub>4</sub>/アセトン (HPF/FS-GA&OsO<sub>4</sub>)) で比較。(c) a と同じ方法を用い、抗 Porin 抗体で免疫金染色。(d) ミトコンドリア膜 100 μm 当たりの金粒子数。HPF/FS-GA、HPF/FS-GA&OsO<sub>4</sub> で比較。Mt: ミトコンドリア、CW: 細胞壁、V: 液胞、N: 核、スケールバー: 400 nm

洗浄の後、TBS と酢酸ウラニルは混ざると沈殿を生じ、汚れの原因となるため、DW で洗う。その後、よく乾燥させる。

## 5.3 電子染色

酢酸ウラニルを用いて電子染色を行う。鉛染色は行わないことが多い。パラフィルム上に 2% 酢酸ウラニル水溶液の水滴 (20~30 μl) を置き、グリッドを浮かせる (片面抗体染色の場合)、または沈めて 10~12 分間電子染色する (図 4b)。その後 DW で洗い、グリッドを乾燥させる。

## 5.4 オスミウム固定試料の免疫電顕法

基本的に OsO<sub>4</sub> 固定を避ける免疫電顕法では、脂質が固定されず、膜構造が明瞭に観察されないことが多い。検出したい抗原が膜タンパク質の場合、あえて OsO<sub>4</sub> を用いて膜構造を保持した状態で固定すると、膜タンパク質が残り、免疫電顕が成功することがある (図 5a, c)。オスミウム固定すると抗原性が無くなることも多いが、抗体染色前にエッチング処理により化学結合を切断し、抗原基を出すと反応することがある<sup>9)</sup>。具体的には、切片が載ったグリッドを 0.5 M NaIO<sub>4</sub> 水溶液で 30 分間処理し、余剰な固定剤を除去する。DW で洗浄後、0.1 N 塩酸溶液で 10 分間処理し OsO<sub>4</sub> を還元する。0.1% (v/v) TritonX-100 が入った 0.1 M グリシン-リン酸緩衝液で 15 分間処理し、残ったアルデヒド系を不活化する。その後、10% BSA でブロッキングをして、5-2 同様に免疫電顕を行う。

筆者らはこの方法により、細胞壁成分などの分泌に関与する小胞クラスターの存在を明らかにすることができた<sup>9)</sup>。

エッチング処理を支持膜なしグリッドで行う場合、600 mesh/inch 以上のグリッドを用いると良い。400 mesh/inch 以下だと、操作中に切片がはがれることがあった。支持膜を張ったグリッドなら、200 mesh/inch などでも可能である。

## 6. 結果の解釈

TEM 観察の際、金粒子がほとんど見られない場合は、抗原抗体反応の条件が悪いことが考えられる。次の免疫染色では、抗体の濃度を上げる、染色時間を長くするなど染色条件を変える。それでも染まらない場合は、試料調製法から見直し、固定液や凍結置換液の組成を検討する。タンパク質が発現していないことも考えられるため、他の部位を観察する、または生育環境を変えてみる。それでも染まらない場合は、試料を変えるか、抗体を作り直すことも必要である。筆者らは、もし目的のタンパク質が自作抗体で染まらない場合は、抗原から調製し直し、ウサギだけでなくマウスやラットでも抗体を作製することにしている。例えば、植物の分泌に関与する SCAMP2 という 4 回膜貫通タンパク質の免疫電顕の際は、ウェスタンブロット解析で検出できたペプチド抗体が免疫電顕では検出できなかったため、抗原から調製しウサギ及びラットで抗体を作製し直すことで、免疫電顕検出が可能となった<sup>10)</sup>。

金粒子が全体に満遍なくついている場合は、非特異的な結合が原因か、様々な抗原に多くの抗体が反応していると考えられる。抗体の濃度を下げるか、界面活性剤で洗浄する、もしくは染色時間を短くする。それでも改善されない場合は、抗体を精製する。それでも変わらなければ、抗体を変えるか試料か樹脂を変える。期待される局在と異なる場合も、同様に染色条件を変えてみる。植物成分はウサギやマウスの餌に含まれているため、細胞壁や葉緑体、液胞内のタンパク質に対する抗体を免疫動物が産生している場合がある。それらのオルガネラに反応することがあるので、注意が必要である。IgG 精製した免疫前血清でも染まる場合は、目的の抗原を結合させたカラムでアフィニティー精製した抗体を用いて染める。

## 7. 定量解析

免疫染色の際にシグナルが多岐にわたる、またはシグナルが少ない場合に定量が必要となる場合がある。また、野生型と変異体など比較解析する場合も定量結果があると信頼性が上がる。オルガネラであれば、オルガネラ単位面積当たりの金粒子数、膜タンパク質であれば膜の長さ当たりの金粒子数を出すことで、定量データが得られる。例えば、筆者らは高圧凍結/凍結置換法の検討の際に、液胞膜上の Vacuolar-H<sup>+</sup>-PPase (図 5a) を指標に定量した結果、化学固定法の免疫電顕に比べ、高圧凍結/凍結置換法の方が約 7~10 倍の数の金粒子が検出された (図 5b)。またミトコンドリア外膜タンパ

ク質の Porin の免疫電顕では (図 5c)、1% GA と 1% OsO<sub>4</sub> 混合の方が、1% GA のみより良い結果が得られた (図 5d)。同様の方法で、タバコのニコチントランスポーターの定量にも成功している<sup>11)</sup>。免疫電顕の定量法に関しては過去の文献を参照されたい<sup>12)</sup>。

## 8. おわりに

組織・細胞における局在の判断は、複数箇所と同様の染まり方をする、他の切片でも同じように染まるのが一つの基準となる。また、他の抗体を用いた免疫電顕解析や蛍光イメージング、生化学的解析など、他の方法でも確認しておくことは重要である。一種類の抗体の免疫電顕の結果だけで分子の局在を判断するのは、避けるべきである。

免疫電顕では OsO<sub>4</sub> を用いた酸化固定が基本的には推奨されないため、像のコントラストが低くなり、細胞内小器官の判別が難しい。免疫電顕を行う前に、免疫電顕を行う箇所の微細構造を把握しておくことが重要である。観察したことがない試料を免疫電顕する場合は、先に構造を観察するか、同時に構造観察用の試料を調製し、観察することを勧める。

## 謝 辞

九州大学の松岡健博士から抗体を分与頂き、理化学研究所の河合たか子氏、若崎眞由美氏に免疫電顕のサポートを頂きました。

## 文 献

- 1) Tominaga, M. and Nakano, A.: *Front. Plant Sci.*, 3, 211 (2012)
- 2) 玉木英明, 総合画像支援: 免疫電顕法の実際 (IIRS 顕微鏡ラボマニュアル 8), 西村書店, 東京 (2013)
- 3) 山下修二: 免疫組織化学を考える: 抗原の不活化・樹脂包埋試料の免疫電顕. 顕微鏡, 49, 124-131 (2014)
- 4) 峰雪芳宜, 唐原一郎, 村田 隆, Otegui, M., Giddings, T.H., Staehelin, L.A.: 植物組織の高圧 (加圧) 凍結. 電子顕微鏡, 36, 105-107 (2001)
- 5) Toyooka, K., Sato, M., Kutsuna, N., Higaki, T., Sawaki, F., Wakazaki, M., Goto, Y., Hasezawa, S., Nagata, N. and Matsuoka, K.: *Plant Cell Physiol.*, 55, 1544-1555 (2014)
- 6) Toyooka, K., Okamoto, T. and Minamikawa, T.: *J. Cell Biol.*, 154, 973-982 (2001)
- 7) Hirai, T., Sato, M., Toyooka, K., Sun, H.J., Yano, M. and Ezura, H.: *J. Plant Physiol.*, 167, 209-215 (2010)
- 8) Yoshimoto, K., Shibata, M., Kondo, M., Oikawa, K., Sato, M., Toyooka, K., Shirasu, K., Nishimura, M. and Ohsumi, Y.: *J. Cell Sci.*, 127, 1161-1168 (2014)
- 9) Follet-Gueye, M., Pagny, S., Faye, L., Gomord, V. and Driouich, A.: *J. Histochem. Cytochem.*, 51, 931-940 (2003)
- 10) Toyooka, K., Goto, Y., Asatsuma, S., Koizumi, M., Mitsui, T. and Matsuoka, K.: *Plant Cell.*, 21, 1212-1229 (2009)
- 11) Shoji, T., Inai, K., Yazaki, Y., Sato, Y., Takase, H., Shitan, N., Yazaki, K., Goto, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K. and Hashimoto, T.: *Plant Physiol.*, 149, 708-718 (2009)
- 12) 田代 裕, 山本章嗣: 定量的免疫電子顕微鏡法序説. 電子顕微鏡, 21, 207-214 (1987)