

## 分析電子顕微鏡による銅耐性酵母菌の銅分布の解析

### Distribution of Copper in a Highly Copper-tolerant Yeast Observed Using Analytical Electron Microscopy

植松 勝之<sup>a</sup>, 井上 明<sup>b</sup>, 阿部 文快,  
三浦 健, 堀越 弘毅<sup>c</sup>

Katsuyuki Uematsu<sup>a</sup>, Akira Inoue<sup>b</sup>, Fumiyoshi Abe,  
Takeshi Miura and Koki Horikoshi<sup>c</sup>

<sup>a</sup>株式会社マリン・ワーク・ジャパン

<sup>b</sup>東洋大学

<sup>c</sup>独立行政法人 海洋研究開発機構

**要 旨** 高い銅耐性機構を有する酵母菌 (N6 株) の耐性機構を解明するために, 微細形態解析および分析電子顕微鏡法 (EDS 法および ESI 法) により菌体内の銅の検出を試みた. 銅は菌体内に分布し, 菌体内に侵入した銅イオンは, 矮小な液胞よりもむしろ細胞質で捕捉され, その際, 銅のキレーターとして細胞質性の SOD や重金属に親和性の高いタンパク質が耐性に重要な役割を果たしている可能性が示唆された.

**キーワード:** 銅耐性酵母菌, EDS 法, 電子分光結像 (ESI) 法, 元素マッピング

#### 1. はじめに

生物に対する重金属の影響は, 公害として人体への深刻な影響の結果として知られるが, 細胞レベルでの生物に与える影響は不明な点が多い. 遷移元素である銅は微生物の成長に不可欠であるものの, 要求量は微量であり, 1 mM 以上の硫酸銅の存在下から毒性を示す. 我々は, 日本海溝の堆積物中から単離した酵母菌 *Cryptococcus liquefaciens* N6 株が, 同属の標準菌株 (IFO 0378, JCM 2334T, JCM 8253T) に比べ著しい銅耐性を有することを明らかにした. さらに N6 株では順化培養によって, 非常に高い銅イオン耐性 (50 mM 硫酸銅の存在下で増殖可能) を示すこと報告した<sup>1)</sup>. 本菌株の銅耐

性機構として, 銅イオン存在下で生じるヒドロキシラジカル (OH・) をスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) が除去し, またその副産物として発生する過酸化水素をカタラーゼが除去するというメカニズムを提唱している<sup>1)</sup>. しかしこれは, 銅イオンそのものを除去する反応ではなく, 記録的に高い銅耐性を示す N6 株の防御機構を説明するには不十分である. そこで, 図 1 に示すような防御機構の存在が想定される. ①. 細胞壁または細胞膜による菌体内への銅イオンの流入抑制機能. ②. 細胞質に存在する SOD や蛋白質による銅イオンの捕捉. ③. 液胞内に大量に存在するポリリン酸による銅イオンの捕捉. しかしながら, これまでの生化学的解析でこれらを実証するデータは得られていない. 本稿では, SOD およびカタラーゼによる防御機構以外の上記の機構の存在を検証するため, これまで実施した電子顕微鏡による解析結果を紹介する.

#### 2. N6 株の微細構造と銅イオンの影響

N6 株を銅添加, または無添加培地 (コントロール) にて培養したときの微細構造の変化について TEM 観察を行った. なお, 比較対象として酵母菌の標準株として知られ, 微細形態解析の進んでいる清酒酵母の *Saccharomyces cerevisiae* IFO2347 株を用いた.

##### 2.1 試料処理方法

試料を 10 mM 硫酸銅添加, または無添加培地にて 8 時間培養後, グルタルアルデヒドおよび過マンガン酸カリウムによる 2 重固定を実施した. アセトンによる脱水後, 以下常法に基づいて処理後, 透過型電子顕微鏡 (JEOL 社: JEM-1210) にて観察した.

##### 2.2 TEM 観察結果

いずれの試料においても, リボソームが破壊され, 膜系が良く保存される過マンガン酸カリウム固定の典型的な像を示していた (図 2a ~ d). 銅無添加培地において, IFO2347 と比較し, N6 株では細胞壁が薄く, ミトコンドリアの発達が

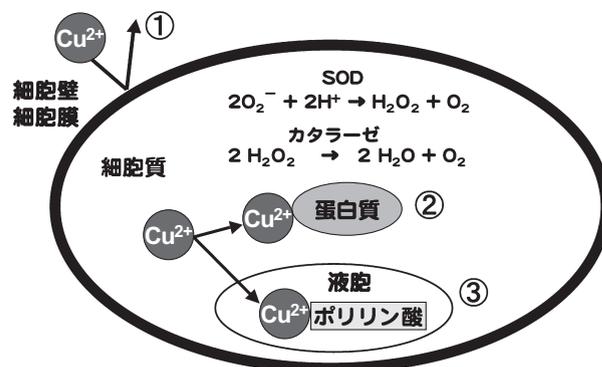


図 1 想定される銅耐性酵母菌 (N6 株) の耐性機構の模式図. SOD およびカタラーゼによる防御機構に加え, 次のような防御機構が想定される. ①菌体内への  $\text{Cu}^{2+}$  の流入防止, ②メタロチオネインなどの蛋白質による  $\text{Cu}^{2+}$  の補足, ③液胞ポリリン酸による  $\text{Cu}^{2+}$  の補足.

<sup>a</sup> 〒 236-0042 神奈川県横浜市金沢区釜利谷東 2-16-32 トライアンジュ文庫 5F

TEL: 045-783-0041; FAX: 045-787-0043

E-mail: uematsuk@jamstec.co.jp

<sup>b</sup> 〒 374-0193 群馬県邑楽郡板倉町泉野 1-1-1

<sup>c</sup> 〒 237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2-15

2008 年 5 月 15 日受付

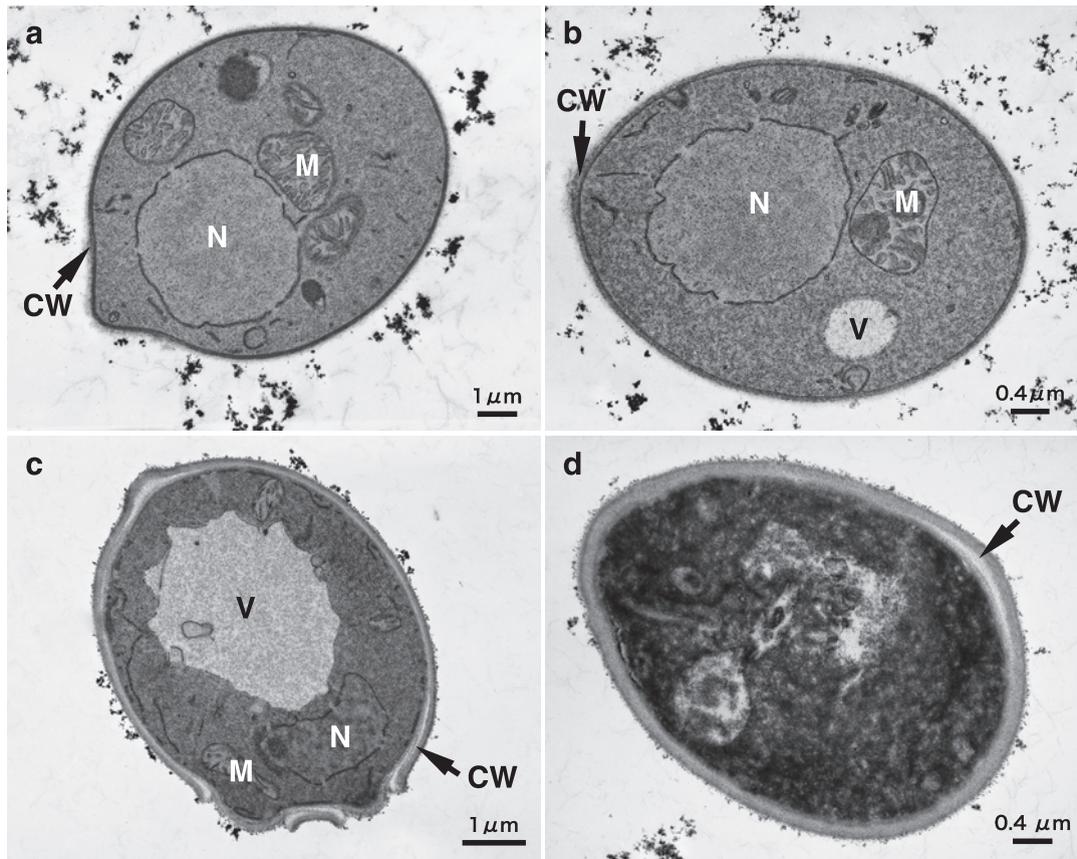


図2 銅耐性酵母菌 N6 株および清酒酵母菌 IFO2347 株の微細構造に及ぼす CuSO<sub>4</sub> の影響 (TEM 観察結果). 銅耐性酵母菌 N6 株 a, b, 清酒酵母菌 IFO2347 株 c, d, 銅無添加培地にて培養した菌株 a, c, 銅添加培地にて培養した菌株 b, d を示す. 清酒酵母菌 IFO2347 株では, 銅添加によりオルガネラが破壊されているが, 銅耐性酵母菌 N6 株では, 銅を添加しても微細構造に変化は見られない. CW: 細胞壁, N: 核, M: ミトコンドリア, V: 液胞

見られた (図 2a). さらに液胞は, 切片上では見られないこともあり, 非常に小さく菌体内に占める液胞の体積は低いことが推定された (図 2a). 銅添加培地において, N6 株では

殆ど変化が見られなかったのに対し (図 2b), IFO2347 株では, 核やミトコンドリアなどの殆どのオルガネラが破壊されていた (図 2d). またいずれの菌株においても細胞の萎縮が

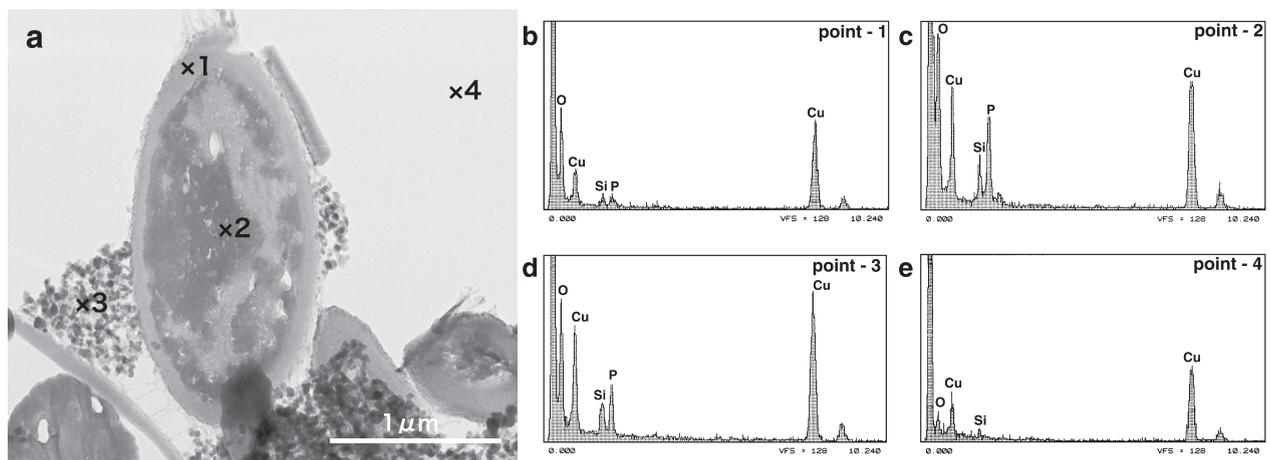


図3 銅耐性酵母菌 N6 株の TEM 像および EDS 法による銅の分析結果. 元素分析用に標的要素の損失・移動を最も抑えられる急速凍結固定法と凍結超薄切片法を組み合わせ, さらに装置内で乾燥させた銅耐性酵母菌 N6 株の TEM 像 a, b, c, d はそれぞれ N6 株 (図 3a) 中の点 1: 細胞壁, 2: 細胞質, 3: 細胞外の粒状構造, 4: バックグラウンドの点分析結果を示す.

見られた (図 2b, d).

以上より標準株 IF02347 では銅イオンが菌体内に流入して、オルガネラの破壊を引き起こしている可能性が示唆された。一方、薄い細胞壁を有する N6 株では、細胞の大きさが小さくなっただけで、微細構造の変化は見られなかったことから、銅イオンが菌体内に流入しないような機構が備わっている可能性が考えられた。

### 3. 分析電子顕微鏡法による N6 株の細胞内の銅イオンの検出

次に銅イオンが菌体内に流入するか否かを解析するために、微細構造を観察しながら元素分析を行うことのできる分析電子顕微鏡法 (EDS 法および電子分光結像法<sup>2,3)</sup> (以下 ESI 法と記す) による N6 株の細胞内の銅イオンの検出を試みた。

#### 3.1 試料処理方法

常法の固定剤を使った浸漬固定法では、標的元素の移動や流出が occur やすいため、標的元素の損失・移動を最も抑え

る手法とされる急速凍結固定法と凍結超薄切片法を組み合わせる処理を実施した。10 mM 硫酸銅添加培地にて一晚培養後、試料を洗浄して、液化プロパンに浸漬して急速凍結固定した。凍結超薄切片を作成後、TEM 内の高真空中で切片を乾燥した<sup>4,5)</sup>。

#### 3.2 EDS 法による N6 株の細胞内の銅イオンの検出結果

物質の損失・移動を抑える処理を行ったため、常法の処理法と比べ、オルガネラの構造ははっきりしないが、酵母菌細胞を識別可能な試料が得られたため、この試料を分析に供した (図 3a)。透過型電子顕微鏡 (JEOL 社: JEM-2010) にて、細胞壁 (図 3b)、細胞質 (図 3c)、細胞外の粒状構造 (図 3d) およびバックグラウンド (図 3e) の 4 点の点分析を行った (図 3b ~ e)。これらのいずれの点においても、Cu のピークを検出したが、これは試料との相互作用により発生した反射電子が、切片を保持する銅メッシュを励起した結果、発生する銅メッシュ由来のピークと考えられる。しかしながらバックグラウンド (図 3e) と細胞質

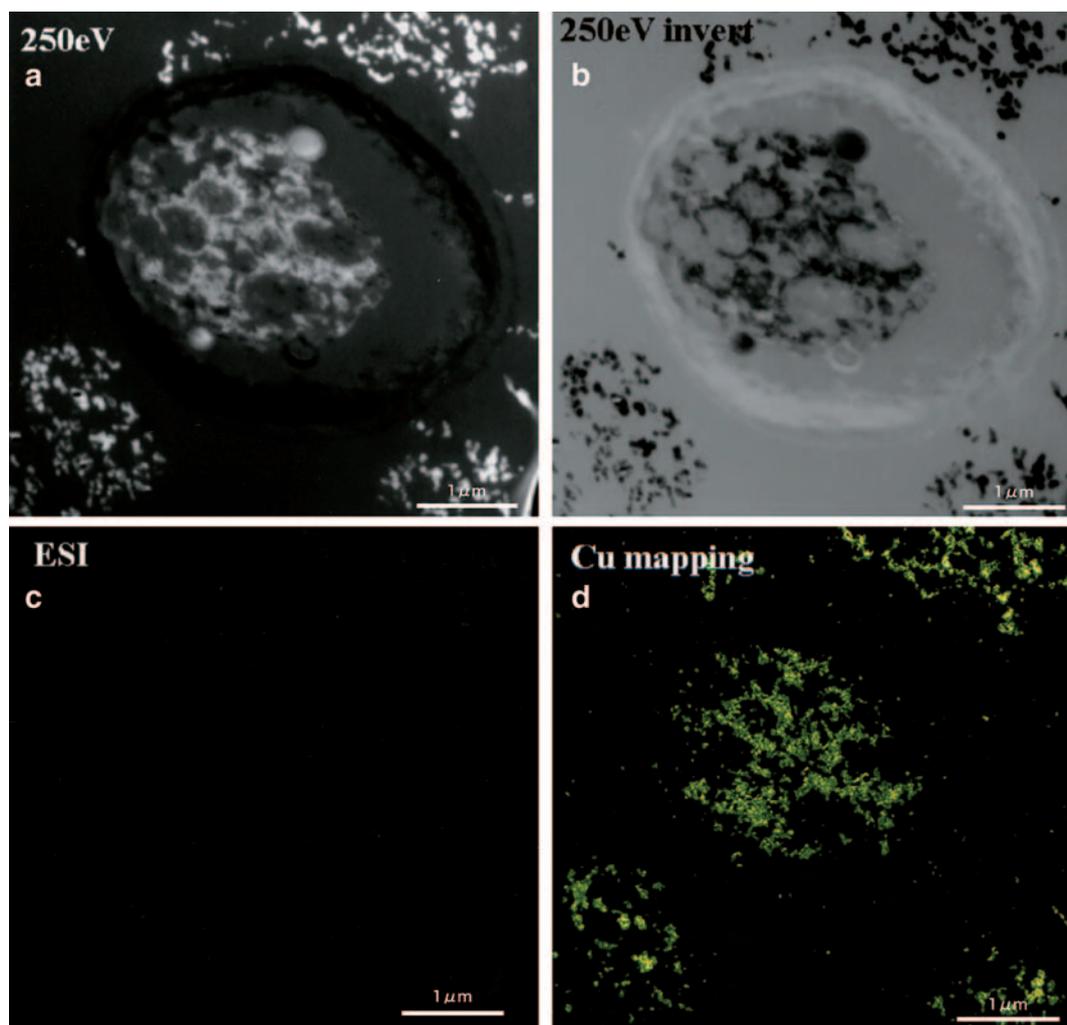


図 4 ESI 法による銅耐性酵母菌 N6 株の菌体内の銅の分布像。プレカーボン像 (250 eV ロスイメージ) a, プレカーボン像 (a) の階調反転像) b, 同一視野を 3window 法により BG を除去後、銅の吸収端 930 eV にて結像させた銅の分布像 c, 図 4c では S/N が低いため、図 4c のコントラストを強調した銅の分布像 d. 銅は細胞内に広範囲に分布することが分かる。

内のCuのピーク強度(図3c)を比較すると、明らかに細胞質内の方が高いことから、銅イオンが菌体内に蓄積していることは明白である。

### 3.3 ESI法によるN6株の細胞内の銅イオンの検出結果

EDS法の分析結果では、N6株の菌体内に銅が存在することが明らかとなったが、すべての分析点において銅が検出された。そこで銅ピークの発生原因である反射電子の影響を受けず、かつ高い空間分解能を有するESI法によるN6株の菌体内の銅のマッピングを行った。なおESI法では、透過型電子顕微鏡(ZEISS社:LEO912)にて銅のマッピング像を取得した。高コントラスト像を示すプレカーボン像(250 eV)からは、単一の菌細胞の断面像であることが確認できる(図4a, b)。銅マッピング像では、EDS法の結果と一致して、ESI法からも菌体内から銅を検出した(図4c, d)。さらに銅は細胞内に広範囲に分布することが判明した(図4c, d)。しかしながらオルガネラとの相関は構造が不明確だったため断定できなかった。

### 3.4 N6株の銅耐性機構

微細形態観察結果から、銅耐性酵母菌N6株では、銅イオンが菌体内に流入しないような機構が備わっている可能性が考えられた。しかしながら、分析電子顕微鏡法の解析結果から、N6株の菌体内の銅イオンは、細胞内に広範囲に分布していたこと、またN6株の液胞は、発達していなかった結果を考え合わせると、銅耐性酵母菌N6株では、菌体内に侵入した銅イオンは、矮小な液胞よりも細胞質で捕捉され、その際、銅のキレーターとして細胞質性のSODや重金属に親和性の高いタンパク質が耐性に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また生化学的解析から、銅耐性酵母菌N6株の菌体内の銅イオンは、ATPaseにより菌体外に排出されている可能性が示唆されており、銅耐性酵母菌N6株の発達

したミトコンドリアの存在は、積極的に銅イオンを菌体外に排出していることを裏付けている可能性がある。

## 4. おわりに

以上のように細胞内の微細構造と対応させながら元素分布情報を得る手法は、生化学的手法による細胞内局在の特定が困難な対象においては、分析顕微鏡による解析が極めて有効であることを裏付けるものである。しかし試料作製過程においてドライな状態で作成しなければならない等、ルーティンで実施できるレベルには至っていない。またこのように調製した試料の微細形態の保存は、充分とは言えず、今後、益々の改良が求められる。

## 5. 謝辞

分析電子顕微鏡法(EDS法およびESI法)によるN6株の細胞内の銅イオンの検出に関する試料調製およびデータ取得については、佐藤泰彦氏(株)日本電子にご協力頂きました。ここに記して御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Abe, F, Miura, T, Nagahama, T, Inoue, A., Usami, R. and Horikoshi, K: *Biotechnol. Lett.*, **23**, 2027-2034 (2001)
- 2) 二重作豊, 赤木 功, 長岡紀幸, 永井教之: 電子顕微鏡, **37**, 22-27 (2002)
- 3) 進藤大介, 及川哲夫: 材料評価のための分析電子顕微鏡法, 共立出版, 52-99 (1999)
- 4) 平野 寛, 宮澤七郎: よく分かる電子顕微鏡技術, 朝倉書店, 137-148 (1992)
- 5) 第6回電顕サマースクール実行委員, 電子顕微鏡, 基礎技術と応用 1995 ~ 試料作製の先端技術~, 学際企画, 91-94 (1995)