

資 料

教育研究施設の概要と活動報告

電子顕微鏡施設

運営委員長 物質生物科学科 大隅 正子

電子顕微鏡施設は、電子顕微鏡や試料作製に関わる装置など種々の大型機器（文部省科学研究費より購入、あるいは、寄贈機器を含む）を管理・運営しており、本施設で電子顕微鏡試料の作製から観察、写真の焼き付けまで一連の操作を行うことができる。

1. 施設の概要

- 1) 透過電子顕微鏡 日立 H-800 (1983年購入)
- 2) 透過電子顕微鏡 日本電子 JEM-1200EXS (1988年購入)
- 3) 走査電子顕微鏡 日立 S-430 (1981年寄贈)
- 4) 高分解能走査電子顕微鏡 日立 S-800 (1985年購入)
イメージプロセッサ 日立 FD1050S 装填
- 5) 超高分解能走査電子顕微鏡 日立 S-900LV (1989年購入)
イメージプロセッサ 日立 FD1050S 装填
- 6) 超高分解能走査電子顕微鏡 日立 S-900 (1989年寄贈)
- 7) 急速凍結試料作製システム
 - ①超ミクロトーム Reichert-Nissei ULTRACUT S
 - ②クライオセクションシステム
Reichert-Nissei FCS
 - ③急速凍結固定装置 Reichert KF-80
 - ④急速凍結置換装置 Reichert CS auto
 - ⑤凍結試料作製装置 エイコー FD-5A
 - ⑥クライオトランスファーホルダー
Gatan Model 656
- 8) フリーズエッチング装置
Balzers BAF-500K (1985年購入), BAF-301
- 9) 加圧凍結装置 BAL-TEC HPM-010 (1997年購入)
- 10) 超顕微鏡 明石 LEM-2000 (教育装置)
その他、超ミクロトーム (LKB 8800, ポーター MT I, MT IIB), ガラスナイフメーカー (Reichert KNIFE-MAKER, LKB7800 KNIFEMAKER), クリーニング装置 (AIRBRASIVE6500 システム), 臨界点乾燥装置 (日立 HCP-1, HCP-2), 凍結乾燥装置 (日立 ES-2020), イオンスプッター装置 (日立 E-102, E-1030), 真空蒸着装置 (日本電子 JEE-4B, 日立 HUS-5GB), 写真引伸機 (アサ

ヒダースト L138S, L1200, 日本電子画像プリンター EM-55), スライド作成装置 (IMI LFR-Mark II), 走査電子顕微鏡用画像取り込み装置 (DKL EMpire 2000), 親水化処理装置 (日本電子 HDT-400) などを整備している。

上記の装置は、80年館A棟地下1階、泉山館4階、泉山館地下1階 (7号館取り壊しのため約2年間の移転) の電子顕微鏡施設に設置されている。

2. 教育活動

物質生物科学科では、本施設を細胞生物学実験、超微構造学実験に利用しており、数物科学科の光学、総合科目 (数理, 自然), 家政学部通信教育スクーリングの生物学の授業にも使用している。本施設はまた、理学部の卒業研究、理学研究科大学院博士課程前期・後期の特別研究にも頻繁に利用されている。さらに、家政学部や理学部の学生および大学院生の要望に応じて本施設は、透過電子顕微鏡および走査電子顕微鏡の試料作製法や観察法の特別講習を行っている。また、超顕微鏡 LEM-2000 は、平成9年度に設置された生体ミクロ機構総合システムとラインで接続したので、共焦点レーザー走査顕微鏡とともに、授業において学生全員が生体の構造を多角の視点から観察することができるようになっている。

3. 研究活動

本施設は、本年度、理学部および家政学部の教員 (今市涼子, 大隅正子, 川澄俊之, 中村輝子, 増子富美, 松影昭夫, 松梨久仁子, 敬称略) の以下の研究に用いられている。

- 1) イワタバコ科の異形子葉性の起源と進化
- 2) 溪流沿い植物の適応形態の進化
- 3) ナギイカダの葉状茎の進化形態学
- 4) 木本植物の季節形態学的研究
- 5) 酵母細胞壁形成の分子機構
- 6) 酵母ペルオキシソームの起源と形態形成に関する超微構造学
- 7) 分裂酵母のアクチン細胞骨格の挙動解析
- 8) 高圧ストレスに対する酵母細胞骨格の挙動
- 9) 分裂酵母の形態形成に関わる蛋白の分子解剖学
- 10) 酵母における加圧凍結固定法の確立
- 11) 皮膚糸状菌と抗真菌剤の開発
- 12) 塩ストレスによる酵母の細胞内微細構造の変化
- 13) 樹木の重力センサーについて

14) 増殖関連遺伝子の転写制御および染色体分離に関する研究

15) SEM による難燃処理繊維の表面観察

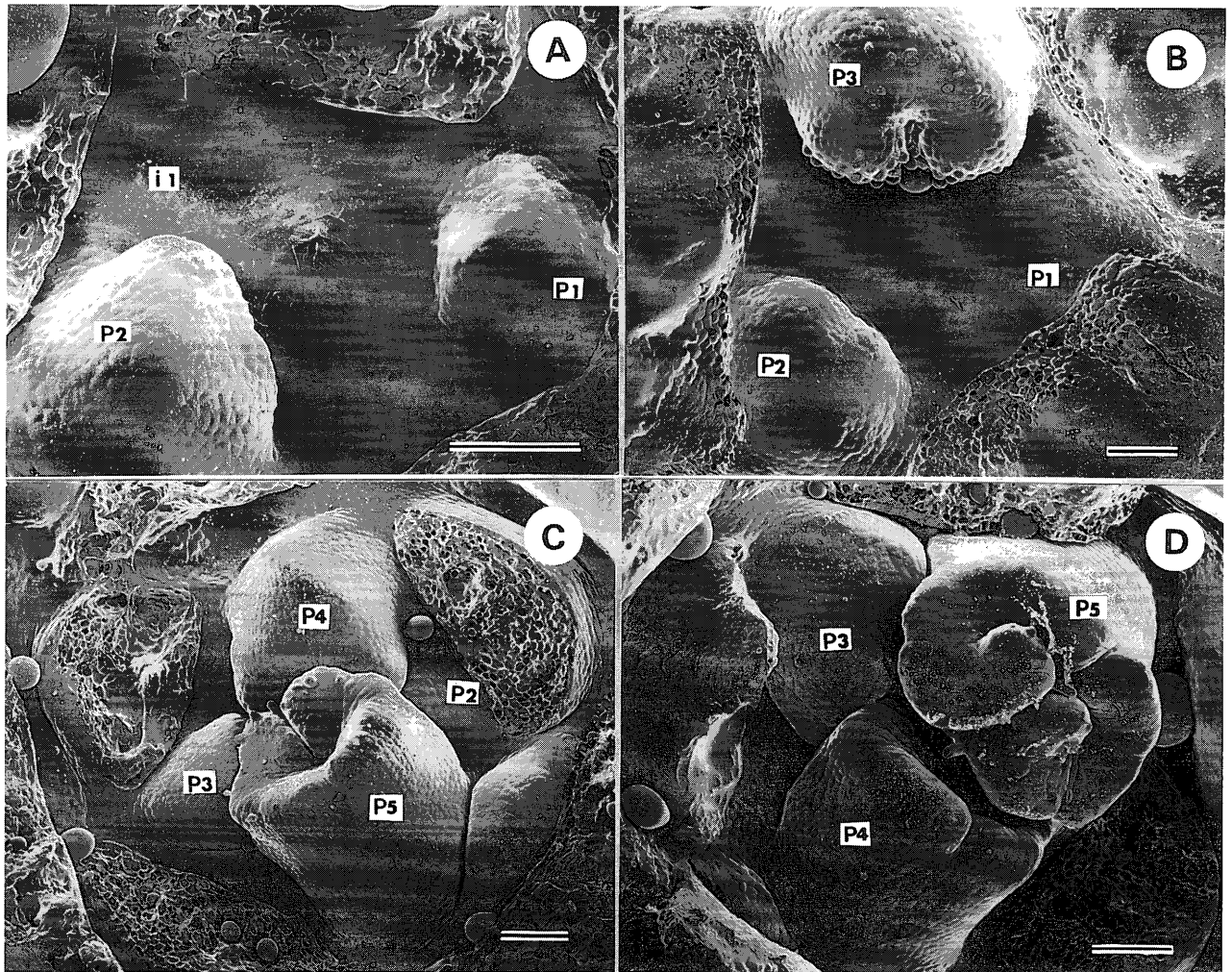
16) 編物（ニット）の組織について

また、東京大学工学部化学生命工学科長棟輝行教授の依頼による、同大学大学院修士課程、武田修治氏との『*Bacillus thuringiensis* 由来の結晶性タンパク質の改変体の物性解析』に関する共同研究や、東京大学大学院農学生命科学研究科飯塚堯介教授の依頼により、同大学大学院修士課程、佐々木智一氏に『微細セルロース繊維の顕微鏡観察用試料の作製と観察』に関する技術指導を行っている。

さらに、「オープン・リサーチ・センター」としての活動の一環として、シンポジウムやワークショップを開催した。マレーシア Forest Research Center の Stephan P

Teo 氏への植物系統分類学の技術指導の中で、レプリカ SEM 法の技術を、また、米国の Jennifer Morrell 助教授に微生物の電子顕微鏡法の技術指導を行った。さらに、本学附属豊明幼稚園の園児と父母および本学附属豊明小学校の 5 年生を対象として「公開科学教室」を開催し、理科教育の啓蒙を行う機会を設けた。

なお、本施設の装置を用いて行われた研究の成果の一部について、本年度は理学部物質生物科学科の今市教授、松影教授、家政学部食物学科の川澄教授、家政学部被服学科の松梨久仁子助手および大隅の研究をここに紹介する。



イチョウの茎頂と葉原基の発生を示すレプリカ SEM 像

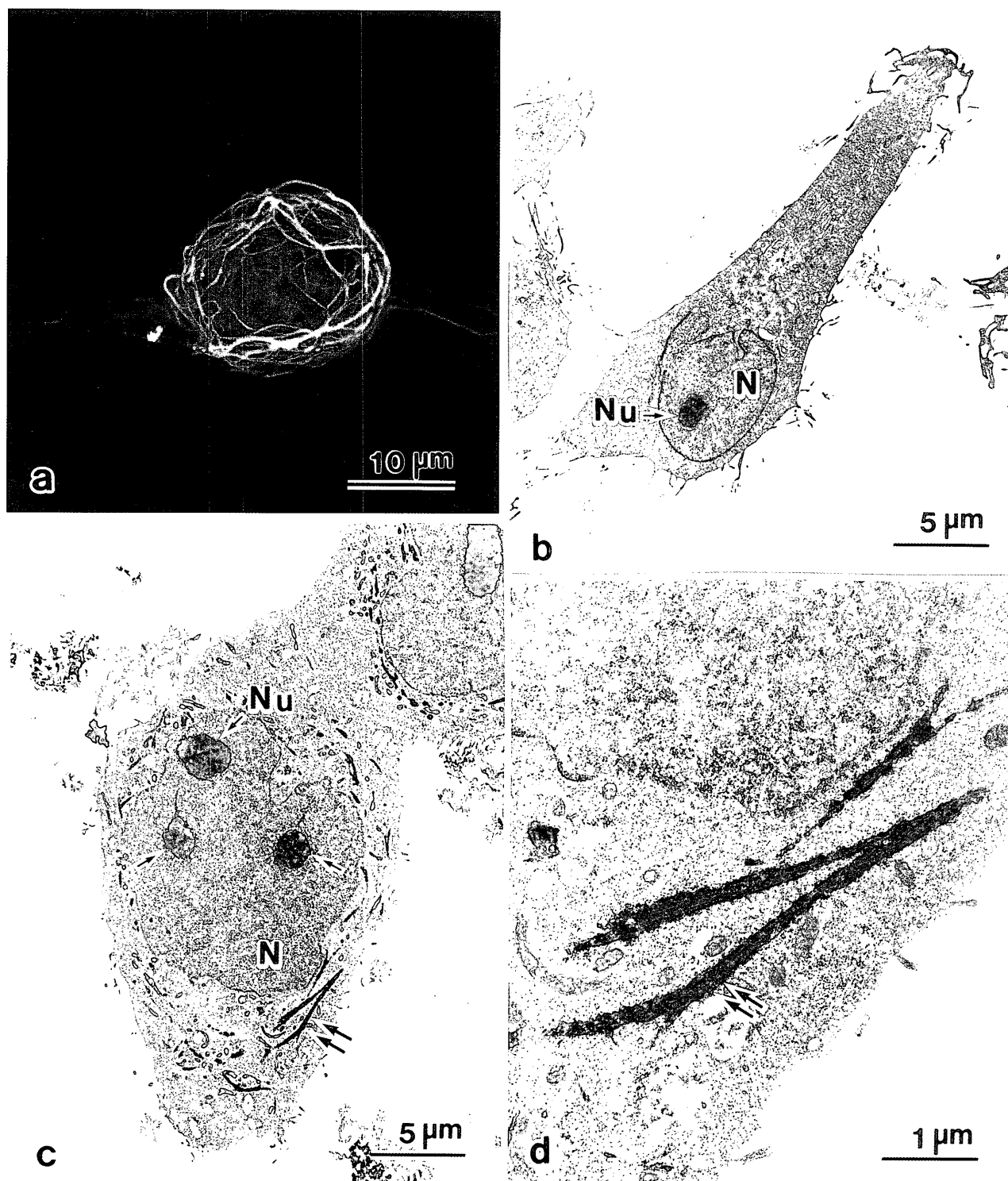
A. 最も若い葉原基 (P1) と次に若い葉原基 (P2) をもつ茎頂。次の葉原基発生位置 (i1) が成長を開始している。

B. 3つの葉原基をもつ茎頂。3番目に若い葉原基 (P3) はすでに葉身の分化を始めている。

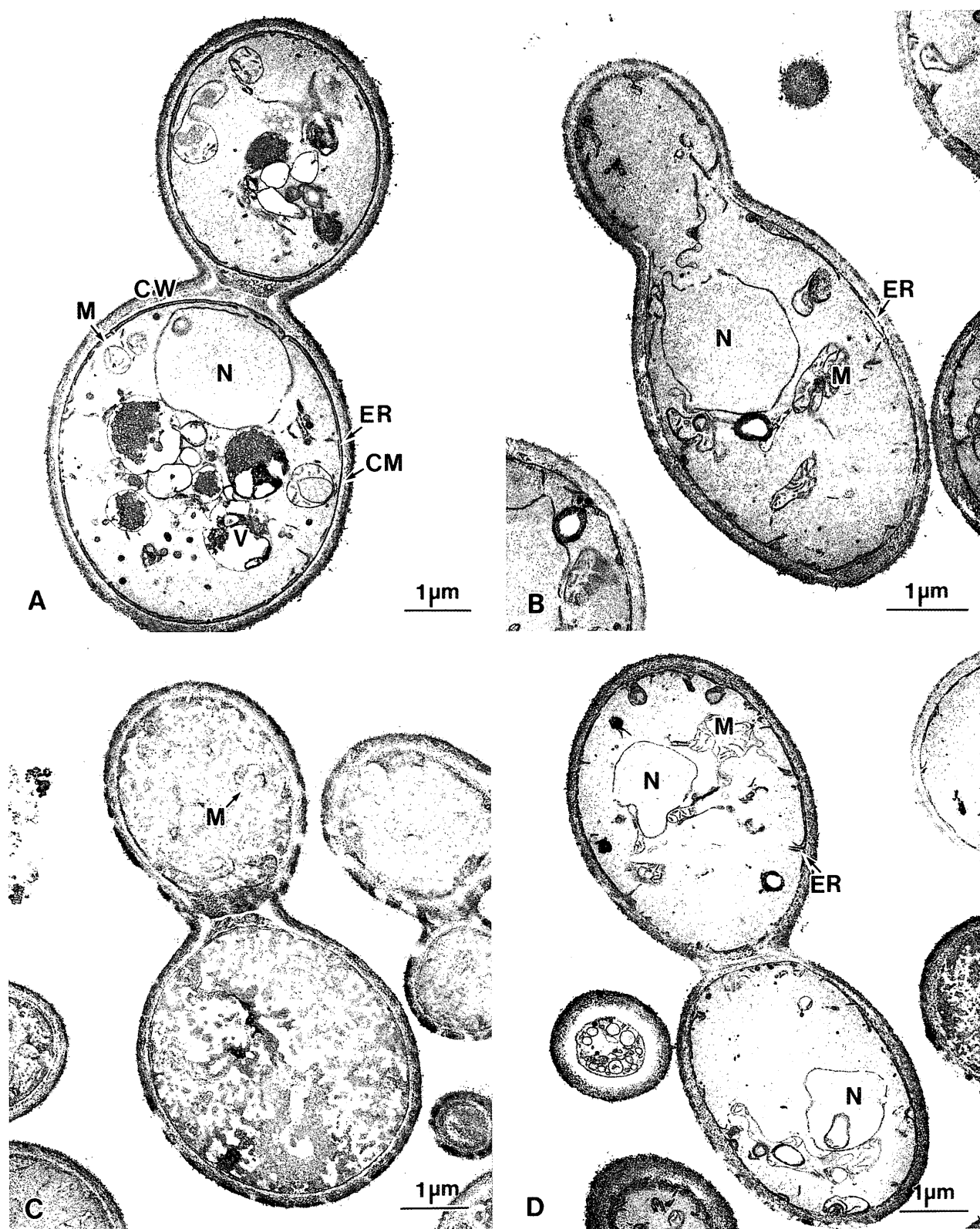
C. 発達の進んだ葉原基をもつ茎頂。P5 では上部の葉身部分が2つの裂片にわかれている。

D. さらに発達の進んだ葉原基をもつ茎頂。P5 の葉身の2裂片は向軸側へ巻き込んでいる。写真中のスケールは 100 μm。

(今市涼子研究室)

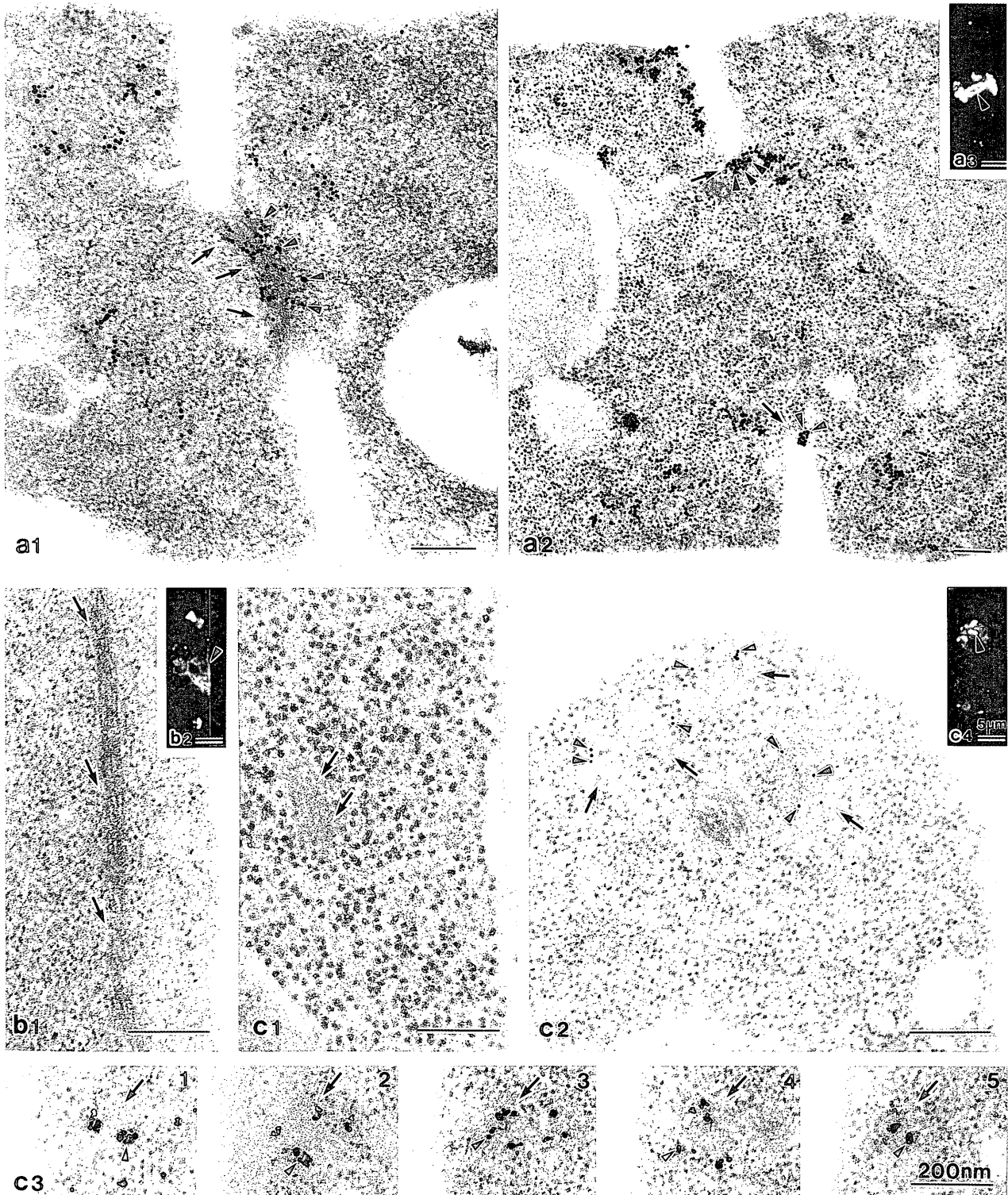


ショウジョウバエにおいて、染色体分配異常を示す変異の原因遺伝子の一つである *orbit* が見出され、この遺伝子は新規の微小管結合タンパク質をコードしている。ヒトでは2種類の相同アミノ酸配列を示すゲノム断片である KIAA0622 と KIAA0627 断片が見出されており、我々はそれぞれを hOrbit1 及び hOrbit2 と名づけて研究を進めている。図 a は GFP と hOrbit1 断片 (1-664aa) の融合タンパク質を発現するプラスミドを HeLa (tet-off) 細胞に導入し発現させ、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した像である。緑は GFP-hOrbit1、青は DAPI 染色した DNA を示している。GFP-hOrbit1 は核の周囲に繊維状に分布していた。透過電子顕微鏡観察により遺伝子導入していない細胞 (b) と、GFP-hOrbit1 を導入し16時間発現させた HeLa (tet-off) 細胞 (c) を比較した。導入した細胞の核の周囲には通常の細胞には見られない電子密度の高い束状の繊維が多数存在した (二)。図 d は図 c の繊維構造の拡大図である。この束状の繊維は微細な繊維が十数本集合して構成され、免疫電顕の結果から、この束状構造に GFP-hOrbit1 と微小管が共局在していることが明らかになった。このことから GFP-hOrbit1 断片の発現により微小管の束化がおこることが承知された。(N, 核; Nu, 核小体) (松影昭夫研究室)



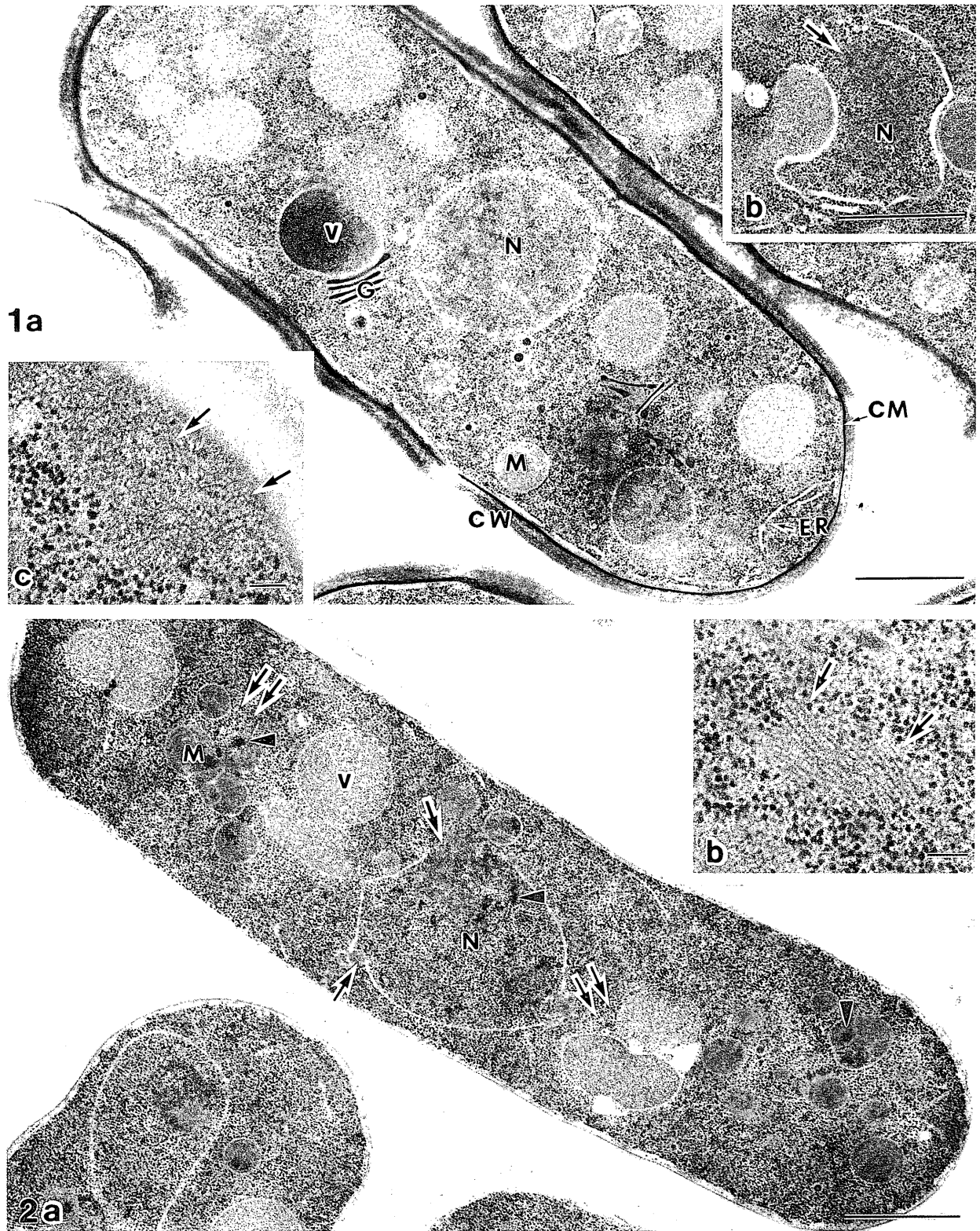
耐塩性酵母 (*Zygocaccharomyces rouxii*) における耐塩性機構の解明を目指し、塩ストレスに対する微細構造の変化を検討した。増殖ならび微細構造に関しては NaCl 濃度 0 % および 20 % において顕著な差異は見られなかった (図 A, B)。一方、0 % から 20 % への塩ストレスにより、細胞内のオルガネラが識別できず、細胞が大きくダメージを受けたことが観察された (図 C)。この事実は、おそらくその殆どが死滅したものと考えられるが、生残細胞またはダメージを受けない細胞は 20 % NaCl 下で増殖を再開していく (図 D)。この細胞は図 B の 20 % 下で旺盛に増殖している細胞と、微細構造において差は見られなかった。

図 A: 0 % NaCl 下における増殖細胞, 図 B: 20 % NaCl 下における増殖細胞, 図 C: A に塩ストレスを与えた直後の細胞, 図 D: C からさらに培養を続け、20 % NaCl 下で再増殖した細胞 (CM, 細胞膜; CW, 細胞壁; ER, 小胞体; N, 核; V, 液胞) (川澄俊之研究室)

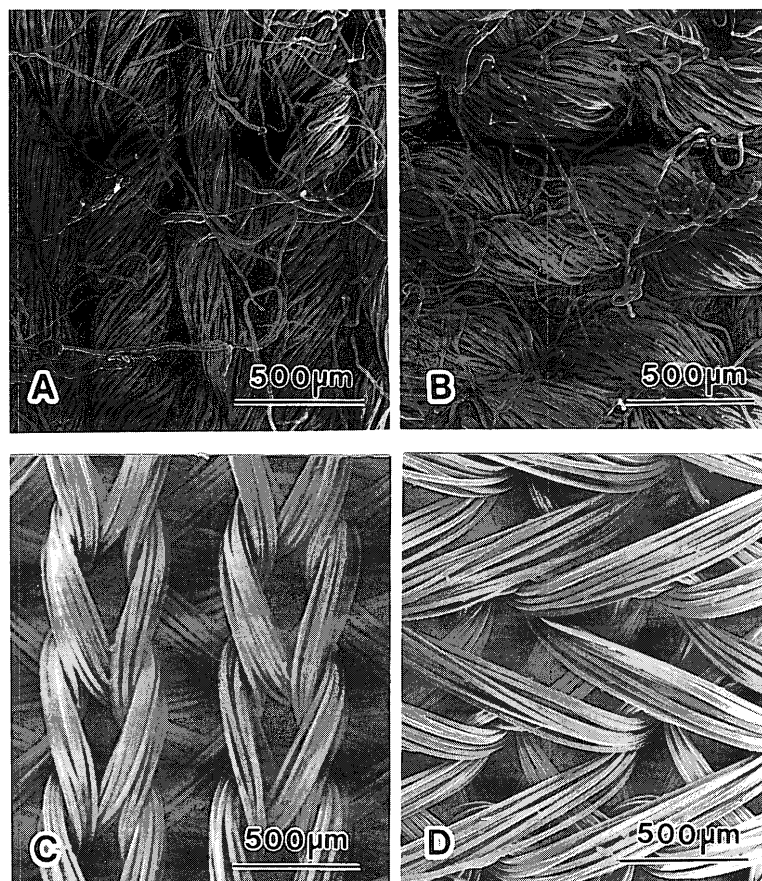


蛍光顕微鏡 (FM) 観察でパッチ、ケーブル、リングの構造を呈する分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* のアクチン細胞骨格について、透過電子顕微鏡観察により、その微細構造が解析された。

細胞質分裂期の細胞の細胞膜が落ち込む（陥入する）隔壁形成の初期には、陥入間に幅 8 ~ 10 nm の微細繊維からなる繊維束 (←) が認められ、その部分にアクチンを示す金粒子 (◀) が局在した (図 a1)。また、細胞を正中線で切ると、細胞膜の陥入先端部位 (←) と基部に金粒子 (◀) が存在した (図 a2)。これらの結果は、この構造が FM 観察で認められる F-アクチンリング (図 a3, ◀) に相当することを示している。一方、細胞内部には、幅約 10 nm の微細繊維からなる長径約 1.2 μ m の繊維束が細胞の長軸に沿って認められ (図 b1, ←), FM 観察における F-アクチンケーブル (図 b2, ◀) であると推察された。さらに、細胞内部には幅約 10 nm の微細繊維から形成された約 200 ~ 300 nm の短い繊維束が認められ (図 c1, ←), 細胞の成長端には、リボソームが排除された約 300 nm Φ の “coreless filamentous structure” (←) が存在し、そこにアクチンを示す金粒子 (◀) が局在した (図 c2)。また、100 ~ 300 nm Φ のフィラソーム (←) の連続切片像では、マイクロベジクルの周囲の繊維状構造に金粒子 (◀) が認められた (図 c3)。これらの三形態は、FM 観察における F-アクチンパッチ (図 c4, ◀) に相当すると推定された。(大隅正子研究室)



高圧ストレスは、熱ストレスと同様に、細胞に対して様々な影響を与える。本研究では、高圧ストレスが分裂酵母 *S. pombe* の細胞骨格および微細構造におよぼす影響を、加圧凍結置換固定法を用いた透過電子顕微鏡観察により明らかにした。100MPa の高圧ストレスは *S. pombe* 細胞の核膜に損傷を与え (1b, ←), アクチン細胞骨格の形態に異常を来す。そして、前研究 (大隅研究室) で報告したアクチンパッチの3種の形態とは異なり、アクチンパッチが崩壊し、凝集したと考えられる細いアクチン繊維を含む部位 (1c, ←) が細胞端に観察された。150MPa では、核膜の損傷がさらに進み (2a, ←), 核質やミトコンドリア基質に高電子密度の部位が出現し (2a, ◄), ミトコンドリアや液胞の凝集が観察された (2a, ⇨)。またアクチン細胞骨格は、多方向に走る短いアクチン繊維の束 (2b, ←) に変化することが見出された。(CM, 細胞膜; CW, 細胞壁; ER, 小胞体; G, ゴルジ体; N, 核; V, 液胞)。Bars, 1 μ m (1a, b, 2a); 100nm (1c, 2b)。(電子顕微鏡施設)



編物の組織について (目白祭における被服学科の展示)

編物は1本または2本以上の糸のループを連結させて形成された布地で、よこ編とたて編に分類される。よこ編みとたて編みのそれぞれの代表的な組織である平編およびハーフトリコット編の表裏の形態について、走査電子顕微鏡を用いて観察した。SEM写真より、ループが連続している様子がわかる。

- A. 平編組織 (よこ編) 表側の外観
- B. 平編組織 (よこ編) 裏側の外観
- C. ハーフトリコット編 (たて編) 表側の外観
- D. ハーフトリコット編 (たて編) 裏側の外観

(被服学科 松梨久仁子)