

シアノバクテリア細胞内構造の三次元構築と可視化

金子 康子^{1,2}、関 由起子²

¹埼玉大学教育学部生物学研究室、²埼玉大学大学院理工学研究科生命科学部門

目的： シアノバクテリアは植物細胞の葉緑体の起源と考えられている、原核の光合成細菌である。細胞内には光合成に利用する集光色素や光化学系のあるチラコイド膜、二酸化炭素を固定する酵素の集積体であるカルボキシソーム、球状のポリリン酸体などいくつかの構造を持つ。近年開発された位相差電子顕微鏡により、桿状のシアノバクテリア細胞の微細構造を急速凍結した状態で丸ごと観察することが可能となった[1]。この方法では、従来の透過電子顕微鏡観察法（化学固定→樹脂包埋→超薄切片→電子染色）に比べて人工像のない、生きている状態に近い細胞内微細構造を高いコントラストで観察することができる[1, 2]。このシアノバクテリア細胞内 DNA の構造を位相差電子顕微鏡観察することを試みた。まず、DNA に BrdU を取り込ませて多細胞を位相差電子顕微鏡観察すると、細胞内には電子密度が高い部位が出現し、その部位に 10 nm 程度の太さのひも様の構造が確認できた（図 5）[3]。位相差電子顕微鏡による観察像は従来の電子顕微鏡により得られる像とは全く異なるため、従来法の結果と詳細に比較していくことが重要とある。しかし、比較の対象となりうる細胞内 DNA 構造のモデルは存在しない。そこで本研究では、化学固定・樹脂包埋したシアノバクテリア細胞の連続超薄切片像をもとに、立体構築することにより特に細胞内 DNA の高次構造モデルを提示する可能性を探った。

方法： BG-11 寒天培地上で培養した *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を 2% グルタルアルデヒド (0.05M カリウム・リン酸バッファー、pH 7.0) により室温で 2 時間静置後、4℃ で一晩固定した。バッファーで洗浄後 2% オスミウム酸 (0.05M カリウム・リン酸バッファー、pH 7.0) により室温で 1 時間後固定した後、アセトン・シリーズで脱水し、スパー樹脂に包埋した。厚さ 100 nm 程度の連続超薄切片を作製し、ウラニル酢酸、鉛染色液により電子染色後、Hitachi H-7500 透過電子顕微鏡により、加速電圧 100 kV で写真撮影した。印画紙に焼き付けた画像の DNA に色付けし、スキャナーで取り込んだ 5 枚の画像をもとに、AVS/Express Developer による三次元立体構築を試みた。この作業は KGT 技術の方にお世話になった。

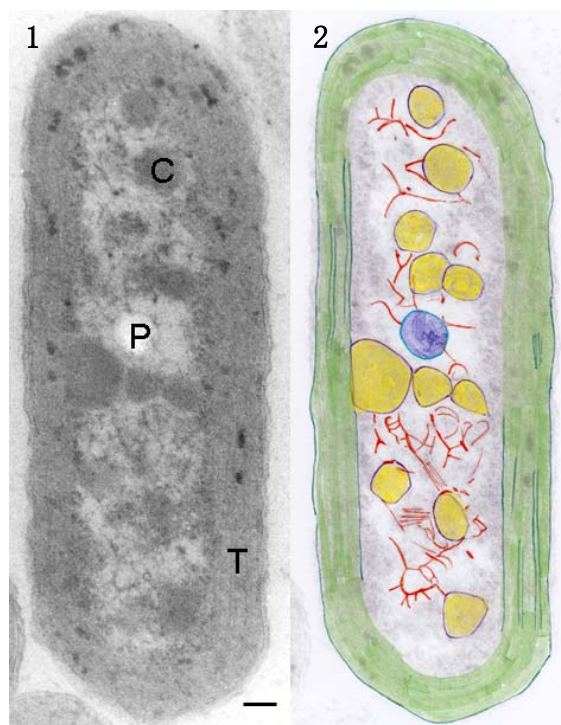


図 1. 化学固定・樹脂包埋したシアノバクテリアの超薄切片 TEM 像。C: カルボキシソーム、P: ポリリン酸体、T: チラコイド膜。Bar=100 nm。
図 2. 1 の画像に色付けしたもの。赤: DNA、黄: カルボキシソーム、青: ポリリン酸体。

結果と考察： 図1は化学固定後樹脂包埋し田試料から作製した超薄切片を透過電子顕微鏡で観察したシアノバクテリア細胞である。細胞周辺部にはチラコイド膜 (T) に囲まれ、その内側の細胞質部分に多数のカルボキシソーム (C) が点在する。DNA の局在は、DNA 特異的な染色法であるオスミウムアミン法により示すことが可能であり、細胞内の繊維様構造の多くは DNA であることがわかった[3]。DNA とみなされる繊維様構造に色付けした連続切片画像 (図2) を5枚分スキャナーで取り込み作業に用いた。DNA 部位を抽出し立体構築したものを図3に示す。図4は DNA を DAPI で蛍光染色し蛍光顕微鏡で観察した画像で、図5は BrdU をとりこませたのち、位相差電子顕微鏡観察したシアノバクテリア細胞の一部である。

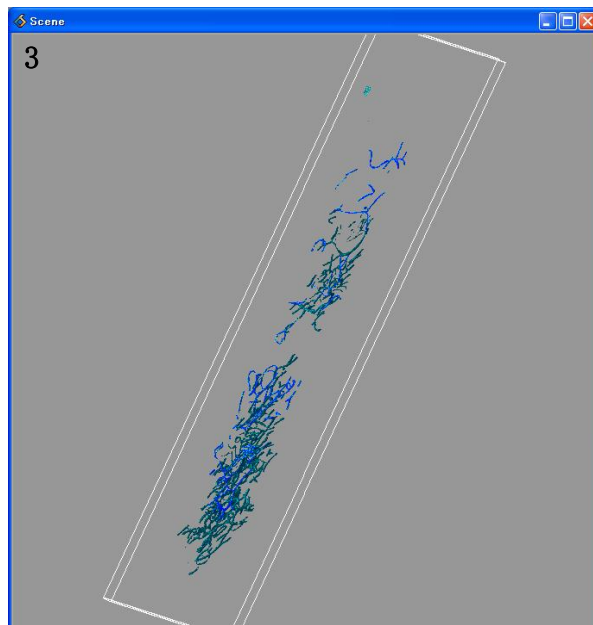


図3. 図2. の DNA 部位 (赤) を抽出し、連続切片5枚分 (細胞全体の約2/3に相当) のデータをもとにした細胞内 DNA の立体モデル。

結論： 立体構築した細胞内 DNA は、太さの異なる繊維様構造で構成され、リング様あるいはループ様の構造をはじめとして、いくつかの特徴的な形状をとることが分かった。今後、光の明暗周期により細胞分裂過程を同調させ、今回用いた手法で細胞内 DNA の立体構築データを積み重ねることにより、DNA 高次構造変化の規則性を見出すことが期待できる。

謝辞： 本研究の一部は、自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンターの永山國昭教授、テラベース株式会社の新田浩二博士との共同研究として行ったものである。

引用文献：

- 1) Kaneko, Y., Danev, R., Nitta, K. and Nagayama, K.: *J. Electron Microsc.*, 54, 79-84 (2005),
- 2) Kaneko, Y., Danev, R., Nagayama, K. and Nakamoto, H.: *J. Bacteriol.*, 188, 805-808 (2006)
- 3) Kaneko, Y., Nitta, K. and Nagayama, K.: *Plasma and Fusion Research*, 2, S1007, 1-4 (2007)



図4. シアノバクテリア細胞内 DNA の蛍光染色像. Bar=1 μm.

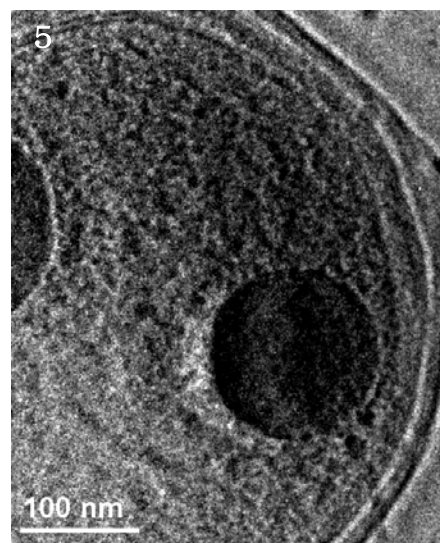


図5. BrdU を取り込ませたシアノバクテリア細胞の位相差電子顕微鏡像。