急速凍結固定法による細菌微細構造の研究

天 児 和 暢

九州大学 医学部 細菌学教室
福岡市東区馬出3丁目1-1 〒812
〔受付: 7月22日, 1994年〕

1. まえがき
2. 凍結固定法の開発
3. 凍結法での新発見
4. あとがき

1. ま え が き

電子顕微鏡が作られて60年以上がたった。その間、生物観察への応用技術も様々なものが開発されてきた。生物学関連の論文でどのような技術がもっとも広く利用されているかを、雑誌から拾いあげてみると、もっともよく利用されているのは超薄切片法であり、この方法が生物学の研究では、たいへん利用価値の高いことを示している。その理由として、この方法が細菌の内部の構造を観察する最も有力な方法であることがあげられる。

超薄切片法は、電顕技術のなかでも複雑な操作を必要とする技術で、そのため、試料作成の途中で様々な人工産物を生みだす可能性があり、試料作成には細心の注意が必要である。この方法が開発されて以来これまでに、多くの改良工夫がなされてきた。その改良のなかで特筆されるものとしては、固定にグルタルアルデヒドが利用されたこと、包埋剤にエポキシ樹脂が利用されたこと、薄切用のナイフにガラスに代ってダイヤモンドが使用されたことなどで、いずれも像質の向上に大きく貢献している。

2. 凍結固定法の開発

細菌は、細胞全体が細胞壁と呼ばれる堅い殻で覆われているので、普通の細胞の固定と同じ方法では、なかなかうまく固定できない。細菌の固定には細菌独特の固定法が考案されている。そして、これらの固定、包埋の方法によって、数多くの研究報告がなされ、細菌の微細構造はほとんど調べ尽くされたの感があった。しかし、構造と機能を関連付けて議論すると、得られた構造の所見では機能の説明が不十分であることが経験されたり、これまでの固定法では形態を保持出来ない構造物があったりして、未だ試料処理の技術の不完全さが経験されていた。方法上では、固定が一番問題で、化学薬品による固定では像の変形は避けられないと考えられていた。理想的な方法は、凍結であることはすでに知られていたが、その応用方法が容易ではなく、うまく超薄切片法に利用できるような技術がまだ確立されていなかった。その理由は、水がきわめて結晶しやすい性質をもっているためである。普通の凍結では、大きな氷の結晶ができ、これによる機械的なダメージで構造が著しく変化してしまう。凍結による固定法を成功させるには、水が結晶化しないように極低温での急

激な冷却が必要である。

冷却剤は、近ごろでは液体窒素が容易に手に入るの
で、これで充分な低温を得ることができる。場合によつては、液体ヘリウムも使えるのでより低い温度も利用できる。このような冷却剤の低温をどのようにして試料に伝え、結晶の無い良い凍結（ガラス状の凍結）をうるかが、解決すべき問題点である。冷却剤はいずれも熱容量の小さい物質であるので直接冷却剤に試料を入れると突沸し多数の気泡が生じ、これが熱の伝導効率を下げ、よい凍結が得られなくなる。冷却剤の低温を間接的に試料に伝える方法が必要である（表1）。

1975年にニュージーランドのDempsyとBulivantは、研磨した金属の表面に試料を圧着して凍結させる方法での、動物の組織の凍結固定を報告している¹⁾。われわれは、この方法を参考にして、図1の略図に示すような装置を手製で作成し、細菌の

図1. 急速凍結装置の略図。
液体チッソで冷却して銅ブロックに試料を圧着して凍結する。圧着面より数マイクロメートルの領域が水の結晶の無いガラス状の水になる。

表1. 冷 却 剤

冷却剤	融 点	沸 点	温度差
液体チッソ	-209	-195	14
液体ヘリウム	-272	-268	4
水	0	100	100

図2. 大腸菌の凍結固定による切片像。非常によく構造が保存されている。外膜は、波状にはならず、平坦。核の領域は、不明瞭などこれまでの固定法での像とはかなり異なっている。スケールマークは、特に記載がない限り100nmを示す。

図3. 凍結の良, 不良による構造の変化。
大腸菌B株を凍結固定したもの。Aは, 接触面よりはなれた部分で, 凍結が悪く, 氷の結晶で菌が破壊されている。Bは, 冷却した金属表面に直接接触して凍結した部分構造はよく保存されている。

凍結固定を試みてみた^{2,3)}。その結果の一部を図2に示してある。これは大腸菌B株であるが, これまでの菌の構造とは全く異なった印象をあたえる。また圧着面の近くでは, 細菌の形はよく保存されているが, 数ミクロン離れると氷の結晶の影響で形が崩れていることもわかる (図3)。形態観察に耐え得るよい凍結は, 金属面に圧着させた所からせいぜい数ミクロンの範囲内に留まるので, 電顕で観察するのはこの範囲に限られる。この手製の簡易型では, しかしながら, 常に良好な凍結が得られなかった。その理由は, マイナス190度に冷却された金属の表面がすぐに霜が付着するため

である。霜の付着をできるだけ押さえるような処置として, 圧着直前まで外気と接触を避ける工夫を装置に施すことにより, 安定に良い結果が得られるようになる。同様の方法は, その後, 1984年にHobotらにより⁴⁾, 1990年にはGrahamとBeveridgeにより⁵⁾応用されてその優秀性が確認され, 今や最高の固定技術として確定している。なお, 凍結法の実際については, 文献^{3,6)}を参照されたい。

3. 凍結法での新知見

凍結法が従来の化学固定法とはどの点で異なっているのか, どのような点が優れているのか, 以下, 幾つかの例を挙げて説明する。

1) 細菌の核の構造

図4は, 新旧の2つの方法で作製した, 枯草菌の超薄切片像である。一見して明らかなように幾つかの違いが見られる。最も著明なのは, 核と細胞壁の構造である。

細菌は原核細胞であるので核膜はなく, 染色体はそのまま細胞質に存在している。従来の方法ではこの染色体DNAが繊維状の塊りとなって細胞の中央に見られていた。このため細菌の核はDNAの繊維が集まった形であるとされてきた。しかしながら, 凍結固定法で見た細菌には, このような繊維の集合体は見られず, 細胞質はほぼ一様な構造で, 核の所在ははっきりしない^{7,8)}。細胞質には多数のリボソーム顆粒がみられるがその分布は一様ではなく, 一部にリボソームのほとんど無い領域がある。これは, リボソームを墨でマークしてみるとより明かか, おそらく, このあたりがDNAが集中していると考えられる (図5)。化学固定法で見られる核構造は, 固定による人工的産物だと思われるが, これと同じような構造物が, 凍結固定でも見られることがある⁸⁾。それは, 抗生物質で処理した菌, 低温にさらした菌など代謝を止めたり低下させた状態の菌で, 核は, 細胞質の中心に集まり, 繊維状の構造が明瞭になる (図6)。核が細胞質に広く拡散していくには, 細菌の活発な代謝が必要なのかもしれない。

2) グラム陽性菌細胞壁

グラム陽性菌細胞壁は, 従来の化学固定法では一層の電子密度の高い厚い層として観察され, 細

図4. 枯草菌の凍結固定による切片像と化学固定による切片像の比較。

A: 化学固定。B: 凍結固定。

核の存在の違い、細胞壁の違いが明瞭。

胞壁には特別の内部構造は観察されていなかった。しかしながら、凍結固定法で見た細胞壁は、明らかな内外の二層構造よりなりこの種の細胞壁も単一単純な構造ではない事を示している^{7,9,10)}。内層は電子密度の高い層で、陽性菌細胞壁の主要部分を占め、外層は、細繊維状の構造が密に並んでおり、明らかに内層とは異なる(図4, 図7)。このように構造が異なる事はこの二層での構成成分の違いを示している。陽性菌の主要な構成成分は、ペプチドグリカンとタイコ酸であり、これに多量のタンパクが結合している。我々は、ペプチドグリカンとタイコ酸に対する抗体を作り、免疫電子顕微鏡法を凍結固定に応用して、この二構造の抗原性の同定をおこなった¹¹⁾。表層の繊維状構造には主にタイコ酸の抗体が、内部の厚い層にはペプチドグリカンに対する抗体が反応した。陽性菌の

種類により外層の繊維の配列の規則性が違う、枯草菌は、ほぼ同じ長さの繊維が極めて規則的に並んでいるが、ブドウ球菌ではその配列は不規則である。同じグラム陽性を示す細胞壁でも、コリネバクテリア、抗酸菌では、また異なった構造があり、陽性菌の細胞壁は、陰性菌のように同一ではなく、菌により様々な構造を持ち、またこのことは構成成分の違いとその細胞壁での分布の違いをも示していると思われる。

3) 外膜の構造

① Bayer junction と外膜の波状構造

外膜はグラム陰性菌に存在する膜で、様々な生物活性を有している。従来電子顕微鏡での観察では、この膜は、波状にうねった形をしており、何カ所かで細胞膜と結合しているとの報告がある¹²⁾。これは報告者の名にちなんで Bayer junction

図5. 枯草菌の核の位置。
左右2枚同じ写真。右の写真は、リボソームの位置を黒く塗ってある。
菌の中央部のリボソームの少ない部分が核領域。

図6. 低温に暴露した枯草菌の核の構造。
枯草菌を4Cで30分放置後、固定観察。
核は、中央に集まり、繊維状の構造が明瞭になる。

と呼ばれていて、外界と細胞の内部とを繋ぐ役割があると想定されていた。しかしながら、凍結法で観察した外膜は、多くの陰性菌で平坦で、波状

構造は見られなかった^{2,4)}。外膜、ペプチドグリカン層、細胞膜は、それぞれきれいに平行に走り、この3層が一体になっていわゆるエンベロープを作っているかに見える(図2, 図8)。当然 Bayer junction の様な結合は見えない。Kellenberger は、同様な見地から、Bayer junction の存在に疑問を投げ掛けている¹³⁾。Bayer junction の存在は外膜の物質通過の説明には都合が良いモデルであったが、この存在が否定的となったいま、外膜の物質通過に関しては、形態学的にサポートする有力な所見は今の所準備されていない。ただ一つ暗示的な所見としては、幾つかの陰性菌で、多量の外膜小胞の形成が確認されていることで¹⁴⁾、大腸菌では、腸管毒の放出とこの小胞の形成が関連している事が知られている¹⁵⁾。小胞の存在は凍結法できわめて明瞭に確認できている(図9)。

図7. ブドウ球菌の凍結固定像。

枯草菌のように細胞壁の表面に細繊維状構造の配列が見られる。枯草菌ほど規則的ではない。免疫電子顕微鏡法で、この繊維がタイコ酸よりなることが証明されている。

② リポ多糖糖鎖の観察

凍結法の保存性の良さは外膜の詳細な観察で更に発揮される。外膜の最外層は、リポ多糖の糖鎖がでているが、糖鎖の長さは菌により異なり、糖鎖の長いほうが血清抵抗性があり、病原性と関連が深い構造である¹⁶⁾。事実緑膿菌の血液分離株ではいずれも糖鎖が長いことが確認されている（図8）。このような微妙な構造が見えるようになると、細菌の表層の重要な構造物である莢膜との区別が問題となる。

4) 莢膜の構造

莢膜は一部の菌をのぞき多糖で構成されているため、前節の外膜リポ多糖の糖鎖の観察が電顕では困難であったと同様に莢膜の構造を観察するのも難しかった。これまでの方法では、構造を安定化させるために莢膜に対する抗体で処理して観察されていたが、本来の微細構造を観察することは出来なかった。凍結法は、その優れた固定能力により、莢膜の微細な構造を十分に保存しうるものである^{17,18)}。図8, 10に示したのは、2種類の莢膜で、一つは肺炎桿菌の大きな莢膜で、他は、大腸菌のK1莢膜である。その大きさにかかわらず

図8. グラム陰性菌エンベロップ。

A: 大腸菌B株。B: 緑膿菌。C: 大腸菌K1株
いずれの写真にも外膜、ペプチドグリカン層、細胞膜の構造がよく観察される。

緑膿菌には、外膜の外に繊維状の構造が見えるが、これはLPSの糖鎖である。大腸菌K1にもさらに大きな同様な層が見える、これはK1莢膜層である。

構造はよく保存されており、いずれも、細い繊維状の多糖が集積した構造を持っている。多糖繊維は、表面に対して直角に走り、内部と表面に近い部分では走行に多少の違いがみられる。

莢膜の性質として知られているものに、抗体による莢膜の膨化であるが、莢膜特異抗体で処理すると、約3倍ほどに莢膜の厚さが膨化する。膨化に伴う構造の変化としては、全体の電子密度が低下している¹³⁾、莢膜繊維の走行が疎に成っている、ことなどで、抗体によりどのような変化が引き起こされたかははっきりしない。

抗体が、莢膜の層を通過しうるか否かについては、生物学的な実験から肺炎桿菌では通過しうるとの考えが提案されたが、我々はこの新しい固定法で、肺炎桿菌、大腸菌では抗体のみならずかなり大きな分子も通過し得る事を明らかにした¹⁸⁾。

図9. 腸炎ビブリオの寒天平板上のコロニーの切片像。
菌の周辺に無数の小胞がみえる。これは外膜から生じたもの。

図10. 肺炎桿菌の莢膜。
図8の大腸菌 K1 莢膜よりはるかに大きな莢膜がよく固定保存されている。莢膜は、多糖の繊維が菌体表面に垂直に並んでいる。表面に近いところでは配列が不規則になる傾向がみられる。

しかし、その後、陽性菌の莢膜の観察に範囲を広げていくにつれ、たとえばブドウ球菌の莢膜はその細胞表面での分布がことなること（図11）、抗体はまったく莢膜層を通過出来ないことなど、陰性菌と同様には考えられない結果を得ている¹⁹⁾。これは莢膜の構成成分である多糖の種類の違いにもよるのであるが、多糖以外にもタンパクの存在の影響も考えられ、莢膜特有のタンパクの存在とその性質が莢膜の性質に大きな影響を与えている

図11. ブドウ球菌の莢膜。
黄色ブドウ球菌 Smith diffuse 株の凍結像。莢膜は、細胞全体を覆っていない。一部莢膜がほとんど無いが、極めて薄い部分かである。
この薄い部分は、菌が分裂により新たにできた新しい細胞壁の表面に相当している。莢膜の分布はこの菌の分裂形式と密接に関連している。

ことが予想される。

4. あとがき

生物はその機能を特定の形のもとで発揮する以上、形の正確な把握は生物学の研究には欠かせないものである。微生物の構造は、当然ながら顕微鏡の助けを借りなければならず、その観察方法には自然状態を変化させるような操作が数多く入ってくるのは現在の技術では止むをえないことであろう。形態観察では、この影響をなるべく最小限にとどめ、また、えられた像は、様々な処理の結果である、との認識を常にもち、正確な形態の把握につとめるべきであろう。超薄切片法での凍結固定は、試料作製での自然状態の保持には決定的な効果を発揮し得た方法であり、この方法の利用により、われわれは細菌の構造についてこれまで以上に正確な情報を得ることが可能になった。凍結法は、他の電顕技術でも利用され、ネガティブ染色法に代わるものとして、薄い氷の層に包埋して直接観察する方法が利用されるようになってい

る。これにより、タンパク分子やウイルス粒子の構造も3次元的な構造としてより正確にとらえられている。

超薄切片法の弱点は、平面的な観察になってしまうことである。連続切片と画像処理コンピュータによる構築により立体構造を作ることには可能であるが、絵画的で電顕写真とはかなりかけ離れたものしかえられていない。細菌をそのままに断層撮影をする、臨床で応用されている、CTやNMR像のような全く電子顕微鏡とは異なる理論による画像形成の技術の開発も将来には可能ではないかと思われる。より自然な形を求めてこれからも技術開発が進むことを期待したい。

謝 辞

この研究は、多くのかたがたの協力により達成されたものです。以下その名を掲げその努力に感謝の意を表します。

九州大学医学部細菌学教室

梅田昭子 見明俊治 高出明美 岡田賢司
目野郁子 三角博康 有蘭 剛 植木祐司
横山 哲

福岡大学医学部微生物学教室

村田邦彦

文 献

- 1) Dempsy, G.P. and Bulivant, S. (1976): J. Microscopy **106**, 251-260.
- 2) Amako, K., Murata, K., and Umeda, A. (1983): Microbiol. Immunol. **27**, 95-99.
- 3) 天児和暢, 高出明美, 梅田昭子 (1986): 電子顕微鏡 **21**, 17-22.
- 4) Hobot, J.A., Carlmalin, E., Villiger, W., and Kellenberger, E. (1984): J. Bacteriol. **160**, 143-152.
- 5) Graham, L.L. and Beveridge, T.J. (1990): J. Bacteriol. **172**, 2150-2159.
- 6) 天児和暢 (1990): 細胞 **22**, 275-279.
- 7) Amako, K. and Takade, A. (1985): J. Electron Microscop. **34**, 13-17.
- 8) Amako, K., Takade, A., and Umeda, A. (1986): Microbiol. Immunol. **30**, 855-861.
- 9) Takade, A., Umeda, A., Yokoyama, S., and Amako, K. (1988): J. Elect. Microscopy **37**, 215-217.
- 10) Umeda, A., Ueki, Y., and Amako, K. (1987): J. Bacteriol. **169**, 2482-2487.
- 11) Umeda, A., Yokoyama, S., Arizono, T., and Amako, K. (1992): J. Elect. Microscopy **41**, 46-52.
- 12) Bayer, M.E. (1968): J. Gen. Microbiol. **53**, 395-404.
- 13) Kellenberger, E. (1990): Mol. Microbiol. **4**, 697-705.
- 14) Kondo, K., Takade, A., and Amako, K. (1993): Microbiol. Immunol. **41**, 46-52.
- 15) Wensink, J., Gankena, H., Jansen, W.H., Gainee, P.A.M., and Witholt, B. (1978): Bioph. Bioch. Act. **514**, 128-136.
- 16) Misumi, H., Umeda, A., Eguchi, K., Okada, K., Sawae, Y., Niho, Y., and Amako, K. (1994): J. Med. Microbiol. **40**, 282-287.
- 17) Amako, K., Meno, Y., and Takade, A. (1988): J. Bacteriol. **170**, 4960-4962.
- 18) Meno, Y. and Amako, K. (1990): Infect. Immun. **58**, 1421-1428.
- 19) Arizono, T., Umeda, A., and Amako, K. (1991): J. Bacteriol. **173**, 4333-4340.