コイとウナギの肝臓から分離したミトコンドリア画分、粗面小胞体画分
および滑面小胞体画分の形態学的純度検定*1

山 根 伸 一・境 正

(1983 年 5 月 31 日受理)

Electron microscopical assays on the mitochondrial, rough microsomal and
smooth microsomal fractions isolated from the livers of carp and eel

Shin-ichi YAMANE*2 and Tadashi SAKAI*2

The mitochondrial (MT), rough microsomal (RER) and smooth microsomal (SER) fractions isolated from the livers of carp *Cyprinus carpio* and eel *Anguilla japonica* by centrifugation were observed with electron microscope. For each fraction, many sections from five different parts of the central region of the sediment were observed. The MT fractions of both species consisted almost of mitochondria but contained lysosome- and peroxisome-like bodies in all the sections of all the parts treated. In the sections of the carp's MT fraction fixed by glutaraldehyde 8 hr after centrifugation, many mitochondria were ruptured and cristae were broken down. A few mitochondria with condensed matrix were seen. However, the greater part of mitochondria of the eel's MT fraction fixed immediately after centrifugation were in good condition. The RER fraction of both species consisted mostly of rough endoplasmic reticula but contained a few mitochondria at some places. The carp's RER fraction was contaminated by long membranous structures at one place of the sediment. In a lower part dense crowding of free ribosomes was seen. Those membranous structures and free ribosomes may be derived from rough endoplasmic reticula of the pancreatic acinar cells. The SER fractions of both species consisted almost of smooth endoplasmic reticula but were contaminated by rough endoplasmic reticula or free ribosomes at some places, probably bottom part of the sediment.

細胞分画によって得られた画分の形態学的純度検定は、細胞内小器官の機能を明らかにする生化学的あるいは生理学的研究過程の一環として重要であり、哺乳類に関してはかなり行われている。¹⁻⁵⁾ 魚類に関しては、REDDI ら⁶⁾や MAKINODAN ら⁷⁾の筋組織のリソゾーム画分についての報告があるものの、肝細胞分画の画分については著者らの知る限りでは報告されていない。

本研究ではコイ *Cyprinus carpio* とウナギ *Anguilla japonica* の肝細胞成分を分画し、そのミトコンドリア (MT) 画分、粗面小胞体 (RER) 画分および滑面小胞体 ((SER) 画分について、電子顕微鏡による形態学的純度検定を試みたので、結果を報告する。

材料および方法

養殖業者から購入した健康とおもわれるコイ 3 尾 (平均体重 350 g) とウナギ 3 尾 (平均体重 190 g) を屠殺し、肝臓を採り出し、それぞれ秤量後細切

した。それらに 0.25 M ショ糖を含む 0.05 M Tris-HC 緩衝液 (pH 7.4, 4°C に冷却) をそれぞれ 9 倍量加え、テフロンホモジナイザーでホモジナイズした。以下の分画操作は Fig. 1 に示したが、ミクロゾーム画分までの分画は常法に従い、ミクロゾーム画分は佐藤⁸⁾の方法に従って RER 画分と SER 画分に分けた。操作中、試料温度は常に 4°C 前後に保った。

遠心分離終了後、コイの MT 画分以外の沈澱は直ちに上清を捨て、4°C の冷 2.5% グルタルアルデヒド 0.1 M カコジル酸塩緩衝液 (pH 7.4) を注入して沈澱表面と沈澱管内を静かにゆすいだ後、新たに同液を注入して沈澱を固定した。コイの MT 画分の沈澱については上清を捨て後冷 0.25 M ショ糖液を加え、約 8 時間冷蔵庫に保存した後、他の画分の沈澱と同様に固定した。固定は 60 分間行ったが、20 分経過時点で、固まった沈澱をくずさないようにして沈澱管底から剝離し、固定を続けた。固定終了後 0.25 M ショ糖 0.1 M カコジル酸塩緩衝液で

*1 本研究は昭和 57 年度日本水産学会秋季大会で口頭発表した。

*2 宮崎大学農学部水産増殖学科 (Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Miyazaki, 880 Japan).

Fig. 1. The flow chart of cell fractionation of the livers of carp and eel.

3 時間—1 晩洗浄後、沈降の最も厚い中心部を上下方向に柱状に切断し、観察対象とした。コイの MT 画分と RER 画分については、その柱状標本をさらに上部と下部に 2 分した。いずれの沈降片もさらに 0.5 mm 角の小片 5 個に細切し、4°C 冷の 1% オスミウム酸 0.1 M カコシル酸塩緩衝液で 80-90 分間、後固定した。続いてエタノールで脱水し、エポキシ系樹脂の Quetol 812⁹⁾ に包埋したのち、Porter Blum MT-1 ウルトラミクロトームで超薄切片を作製し、ウラニル⁹⁾と鉛¹⁰⁾で 2 重染色して、日立電子顕微鏡 HU-125D-S で鏡検した。

結 果

MT 画分 コイ MT 画分の沈降上部の主体をなす成分はミトコンドリアであったが、他にリソゾーム様あるいはペロキシゾーム様の構造物（指標酵素で確認していないためこのような表現にする）が比較的多く混在した。多くのミトコンドリアは外膜が崩壊しており、2 重膜構造が残っているものでもクリスタが崩壊しているものがあつた。また、濃縮したミトコンドリアも認められた (Fig. 2)。沈降下部もミトコンドリアが主体をなしていたが、リソゾーム様あるいはペロキシゾーム様構造物の混在は沈降上部に比較して少なかった。ミトコンドリアの構造保存状態も沈降上部と同様全般に不良であつ

たが、崩壊過程にあるミトコンドリアはやや少ないと判断された (Figs. 3a, 3b)。

ウナギの MT 画分の沈降もやはりミトコンドリアが主体であったが、リソゾーム様あるいはペロキシゾーム様構造物の混在もコイの場合と同様に観察された (Fig. 4a)。グリゴゲン顆粒と考えられる構造も存在した。ミトコンドリアの構造保存状態は良好であり、極く少数のものにクリスタの崩壊が見られる程度であった (Figs. 4a, 4b)。

RER 画分 コイ RER 画分の沈降上部には粗面小胞体と滑面の膜系構造物がほぼ半量ずつ混在していた (Fig. 5)。後者の膜系構造物の多くは非常に細長い囊胞状で、数個ずつ並行して沈降する場合が多かった (Fig. 6)。同沈降下部では、粗面小胞体が集中的に沈降している部位と (Fig. 7)、遊離したリボゾームが濃密に沈降して膜構造物の全く見られない部位とがあつた (Fig. 8)。また、部位によっては崩壊したミトコンドリアが少数混在した。

ウナギの RER 画分では、一部にコイの場合と同様にミトコンドリアの混在部分が、見られたが (Fig. 10) ほとんどの部位で他成分の混在は非常に少なかった (Fig. 9)。そして、多くの粗面小胞体は円く膨潤しており、膜の一部にリボゾームの付着しないものが存在した (Fig. 9)。

コイ RER 画分の沈澱下部で観察されたような、濃密な遊離リボゾームの集中的沈澱現象は、ウナギの場合には観察されなかった。

SER 画分 コイ、ウナギとも SER 画分の沈澱は小胞体状の膜構造物が主体をなした (Fig. 11a)。これらはほとんどが滑面小胞体であるとおもわれ、それらの間隙には膜の微細破片や中程度の電子密度の無定形物質が混在していた (Fig. 11b)。両魚種において沈澱の一部に粗面小胞体や少数の遊離リボゾームが混在した (Fig. 12)。

考 察

細胞分画で得られた画分の形態学的純度検定の目的は、成分の形態的特徴にもとづいて純度を推定し、かつ得られた成分の本来の特徴的構造をどれだけ保持しているかを知ることにある。⁴⁾ しかし、形態学的方法による純度の定量的表現は必ずしも容易ではないため、今回は各画分の中心部を5ないし10個の小片に分割し、それらすべてから作製した超薄切片の観察結果にもとづいて純度を論じてみたい。

まず MT 画分であるが、コイ・ウナギともミトコンドリアの数量が主体を占めており、純度はかなり高いものと考えられる。混在した他成分は、構造上の特徴から推察してリソゾームやペロキシゾームと考えられる構造物であり、混在割合に沈澱の上下で差違があったとはいえ、全域にわたって散在していたことはそれら混在成分の密度変異幅がミトコンドリアのそれと重なっていることを示している。ミトコンドリアの純度をさらに高めるためには GLAUMANN ら⁸⁾の報告にあるような方法を用いるか、あるいは類似の方法を工夫して、混在成分の密度を変化させることが必要となろう。GLAUMANN らの方法は、ラット肝リソゾームの分離のために、鉄を筋肉注射して肝細胞のフェリチン合成能を高揚させ、リソゾームのフェリチン取込みによる重量増加時期にホモジナイズして遠心分離するものである。

RER 画分と SER 画分については、それぞれ粗面小胞体と滑面小胞体が主体であり、沈澱の部分（おそらく中間層）によっては目的成分がほぼ純粋に集積しているものとみなされる。それゆえ、画分収量の減少を容認することができるならば、洗浄と遠心分離を繰り返すことにより、純度を高めることができよう。

コイ RER 画分の沈澱上部に混在した細長い囊胞状膜構造物と、下部における遊離リボゾームの集中的沈澱現象とはウナギの RER 画分では全く見られなかった。よく知られているように、コイでは肝臓組織中に脾臓組織が樹枝状に侵入している。そして、脾細胞内にはよく発達した粗面小胞体が層状に存在している。したがって、上記コイにおける事実はホモジナイズによって混合した

脾細胞の粗面小胞体からリボゾームが遊離したものではないかと考えられるが、細長い囊胞状膜構造物についてはゴルジ膜である可能性も否定できない。この点については、今後指標酵素の局在を検査し、確認してみる必要がある。

FLEISCHER ら²⁾はウシの肝細胞からゴルジ膜の分離を行った際、当該分画の沈澱の部位により混在成分に相違のあることを観察した。沈澱上層部には細胞膜由来と考えられる長い膜成分が、また、底層部には粗面小胞体が混在していて、ゴルジ成分が最も豊富なのは中層であったという。本研究でも、MT、RER および SER 画分のすべてで、沈澱の部位により混在成分およびその混在割合に差異のあることが判明した。このような現象は、細胞内小器官を密度差によって遠心分離する場合には避けられないものと考えられる。したがって、特定の小器官に局在する酵素活性やその変動を研究する場合、特に目的とする酵素が混在する他構成成分にも局在する場合には十分注意する必要がある。より精度の良い結果を得るためには、他構成成分の混在割合が最低の沈澱部分だけを使用すべきである。

形態学的立場から細胞内小器官を含む各画分の純度を検定しようとする場合は、分画操作による変性程度についても知っておかねばならない。そこで、報告されている硬骨魚類の肝細胞形態像¹¹⁻¹⁴⁾と比較してみたところ、ウナギのミトコンドリアは破損像も非常に少なく、形態保存状態が最良であると判断された。また、コイ、ウナギとも粗面小胞体と滑面小胞体は類円形に変形していた。しかし、構造破損の有無については今回の結果からは明確な判断が下せなかった。一方、コイのミトコンドリアは構造の破損が多く観察され、形態保存が悪かったと判断された。コイの MT 画分は他の画分がすべて遠心分離終了直後に固定されたのに対し、8時間冷蔵保存後に固定したためとおもわれる。遠心分離直後の固定標本がないので比較できず断定し得ないが、分画方法をほぼ同一とし分離直後に固定したウナギ MT 画分のミトコンドリアの形態保存が良好であったことからすると、上記の破損現象は分離後固定するまでの冷蔵保存中に生じたものと推察される。破損が生じると膜などに結合している酵素では、活性に影響を受けることも考えられるので、形態学的純度検定を目的とする場合だけでなく、生化学的研究の場合にも、遠心分離後できる限り短時間に処理する必要がある。

冒頭でも述べたように、魚類の組織あるいは器官の細胞分画画分についての形態学的純度検定はあまり試みられていない。本研究で用いた方法により形態学的純度検定が可能であることを確認することができたので、今後ひろく実施されることを望んでいる。また、形態学的純

度を定量的に表示するために、画分の目的とする成分の個数と混在成分の個数を測定し、その比率を求めることも必要であると考えられる。

文 献

- 1) S. FLEISCHER, B. FLEISCHER, and W. STOECKENIUS: *J. Cell Biol.*, **32**, 193-208 (1967).
- 2) B. FLEISCHER, S. FLEISCHER, and H. OZAWA: *J. Cell Biol.*, **43**, 59-79 (1969).
- 3) 佐藤 了: 細胞分画法 (佐藤了編), 岩波書店, 東京, 1972, pp. 225-229.
- 4) 西 義美: 細胞分画法 (佐藤了編), 岩波書店, 東京, 1972, pp. 47-66.
- 5) H. GLAUMANN, H. JANSSON, B. ARBORGH, and J. L. E. ERICSSON: *J. Cell Biol.*, **67**, 887-894 (1975).
- 6) P. K. REDDI, S. M. CONSTANTINIDES, and H. A. DYMSZA: *J. Food Sci.*, **37**, 643-648 (1972).
- 7) Y. MAKINODAN, H. TOYOHARA, and S. IKEDA: 日水誌, **48**, 1501 (1982).
- 8) 串田 弘: 細胞, **11**, 32-35 (1979).
- 9) M. L. WATSON: *J. Biophys. Cytol.*, **4**, 475-478 (1958).
- 10) E. S. REYNOLDS: *J. Cell Biol.*, **17**, 208-213 (1963).
- 11) T. YAMAMOTO: *Arch. Histol. Jap.*, **24**, 335-345 (1964).
- 12) U. N. WELSCH and V. N. STORCH: *Arch. Histol. Jap.*, **36**, 21-37 (1973).
- 13) S. YAMANE: 宮大農報, **23**, 307-321 (1976).
- 14) D. E. HINTON and C. R. POOL: *J. Fish Biol.*, **8**, 209-219 (1976).

Explanation of plates

Plates (Figs. 2-12) show electron micrographs of MT, RER, and SER fractions from the livers of carp and eel.

Fig. 2. An upper part of the sediment of MT fraction from carp liver. The great part of mitochondria are ruptured or broken down. Dense bodies are lysosome- or peroxisome-like organelles.

Fig. 3a. A lower part of the sediment of MT fraction from carp liver. Cristae and matrix of many mitochondria are broken down. Arrow shows lysosome-like body.

Fig. 3b. Showing a magnified picture of mitochondria in the lower part of the sediment of MT fraction from carp liver.

Fig. 4a. MT fraction from eel liver. The greater parts of mitochondria are in good condition. Dense bodies are lysosome- and peroxisome-like organelles. A few glycogen particles are seen.

Fig. 4b. Showing a magnified picture of mitochondria of MT fraction of the eel liver.

Fig. 5. An upper part of the sediment of RER fraction from carp liver. Rough endoplasmic reticula are mixed with membranous substances.

Fig. 6. Other upper part of the sediment of RER fraction from carp liver. Many membranous structures are narrow, longer saccular in shape.

Fig. 7. Dense crowds of free ribosomes in a lower part of the sediment of the RER fraction from carp liver.

Fig. 8. Crowds of rough endoplasmic reticula and free ribosomes in other lower part of the sediment of RER fraction from carp liver.

Fig. 9. Homogeneous place consisting of rough endoplasmic reticula of RER fraction from eel liver.

Fig. 10. Contamination with mitochondria in the RER fraction of eel liver at one place of the sediment.

Fig. 11a. One place of the sediment of RER fraction from carp liver. The sediment consists almost of smooth endoplasmic reticula.

Fig. 11b. Showing a magnified picture of the SER fraction from carp liver.

Fig. 12. Other place of the sediment of SER fraction from carp liver. Contamination with rough endoplasmic reticula or free ribosomes is seen.