

## ゴルジ装置の 分析電子顕微鏡的研究

理学部 成水秀一・山岡郁雄

### 1. はじめに

前世紀の終わりにCamillo Golgiが鍍銀法を用いて細胞内に検出される網状構造を発見し、それをゴルジ装置と名付けて以来、電子顕微鏡が世に出現するまでゴルジ装置について様々な論議があった<sup>6) 7)</sup>。一つは、ゴルジ装置を分泌物形成の場とする、現在一般的となっている説で、もう一つは、ゴルジ装置を人工産物とする説である。これらは鍍銀法や鍍オスミウム法で検出される網状構造を光学顕微鏡で観察することにより得られた見解である。電子顕微鏡が出現しておよそ20年後の1956年DaltonとFelixは<sup>1)</sup>、マウス十二指腸と精巣上体の上皮細胞で初めてゴルジ装置を電顕観察し、この装置は、空胞、層板、小胞の三要素の集合体であるとし、Golgi complexと名付、内網装置が実在することをしめした。

しかし、我々の研究室では、鍍銀法での硝酸銀による光顕的Golgi検出像を、どう解釈するか検討してきた結果、この像の本体は構造物ではなく、好銀物質であると考えてきた<sup>3) 4) 9) 10)</sup>。では、この好銀物質とは何であるのか。我々の研究室のこれまでの研究により考えてきた仮説がある。その一つは、Golgi complexをペプチドが通過する際、それを介在する輸送小胞は、膜が非常に薄いか、あるいは全く無いのではないか。しかし、電顕的には多数の小胞を観察することができる。 flasモを、 $Ca^{2+}$ の入った液中で切断すると細胞の内容物が、液中でドロップ状になり液と混じり合わないが、その液から $Ca^{2+}$ を除くと内容物は液中に拡散してしまう。すなわち、Golgi complexの形成面側でもこれと同様なことが起こっているのではないか、という考えである。他の一つは、形成面側ではたえず輸送小胞とcisternaeの融合や、輸送小胞の出芽が起こっており、そこで膜を形成する要素も多量に必要になってくると思われる、という考えである。つまり、この形成面側に

は、 $Ca^{2+}$ とリン脂質がなければならず、それがリン酸カルシウムという形で存在しているのではないかというものである。現在のところ、後者についてはまだ明確なアプローチが無い。

本研究は、第一の仮説に焦点を当て、鍍銀法によるゴルジ装置の黒化像が何であるのか、どのようにして起こるのか、また、ピロアンチモン酸カリの特性（2価の陽イオンと結合して沈澱を生じる）を利用して、 $Ca^{2+}$ を含む2価の陽イオンの沈澱を起こし、それが何であるのかを分析してこの仮説について検討した。

### 2. 材料及び方法

#### 2-2. 材料

生後3ヶ月から半年のC57bl/6系マウスを用いた。

#### 2-2. グルタルアルデヒド、オスミウムの二重固定

マウスの十二指腸腺細胞の通常の固定像（以下、一般像と略す）を得るために、次のような固定を行った。まず、摘出した組織片を、水平のマイクロウェーブ固定に基ずく固定液中で細切し、固定液に浸した。家庭用電子レンジ（東芝ER-625TP, 2.45GHz, 600W）のターンテーブル中央に氷水36ml入りのピーカーを、そして、端に氷水200ml入りのピーカーを置き、固定瓶を中央のピーカー中に立て、マイクロウェーブを15~20秒間照射し、そのまま氷温で2時間前固定した。その後、0.1Mカコジレート緩衝液（pH7.4）で10分間洗浄し、0.1Mカコジレート緩衝液（pH7.4）中に1%四酸化オスミウム、4.5%蔗糖を含む固定液中で、氷温で2時間、後固定した。これを緩衝液で10分間洗浄した後、50~100%エタノール脱水系列を経て、アセトンに置換し、Spurrに包埋した。

#### マイクロウェーブ固定用固定液

- 0.1M カコジレート緩衝液（pH7.4）
- 2 % パラフォルムアルデヒド
- 2.5% グルタルアツデヒド
- 0.025%  $CaCl_2$

#### 2-3. 鍍銀法

銀による黒化像（以下、銀染像と略す）を得るた

めに次のような固定をした。摘出した組織片を、Caulfield固定液で3時間、氷温で固定した後、1.5%硝酸銀溶液中に、12時間、24℃で浸漬した。この後、Cajal液で5時間還元し、10分の流水洗の後、各1時間ずつのエタノール脱水系列を経て、Spurrに包埋した。

#### 2-4. アンチモン-オスミウム法固定<sup>10)</sup>

2%ピロアンチモン酸カリは、直前に蒸留水に溶かし、pH7.4に調整した。この2%ピロアンチモン酸カリ溶液と、2%四酸化オスミウム溶液を、等量混合したものを固定液とし、2時間、氷温で固定した。又、この固定法により得られた電顕的黒化像を、以下Sb-Os像と略す。

#### 2-5. 顕微鏡観察

得られたSpurr包埋ブロックは、ウルトラミクロトーム (Porter-Blum MT-2)で、超薄切片にし、酢酸ウラニウムと、クエン酸鉛で、二重染色した後、透過電子顕微鏡 (JEM-100C, 日本電子) で観察した。

また、銀染像については、厚切切片 (600~800  $\mu$ m) を作り、光学顕微鏡 (Olympus, VANOX) での観察も行った。

#### 2-6. 分析電子顕微鏡による分析<sup>8)</sup>

銀染像、Sb-Os像が、それぞれ何の沈澱であるかを分析するために、銀染像は150meshに超薄切片 (約150  $\mu$ m) をすくいとり、電顕観察の後、分析電子顕微鏡 (H-700H, EDAX) で分析した。また、Sb-Os像は超薄切片 (約200  $\mu$ m) を真空蒸着装置 (JEE-4B, 日本電子) でカーボン蒸着し、分析した。

### 3. 結果

#### 3-1. 一般像の観察

十二指腸腺細胞は台形、あるいは三角形をしており、基底部分には核があり上部には電子密度の高い分泌顆粒が多数集合していた。Golgi complexは、核上部を半円形に取り囲むように細胞内に発達していた (図1)。

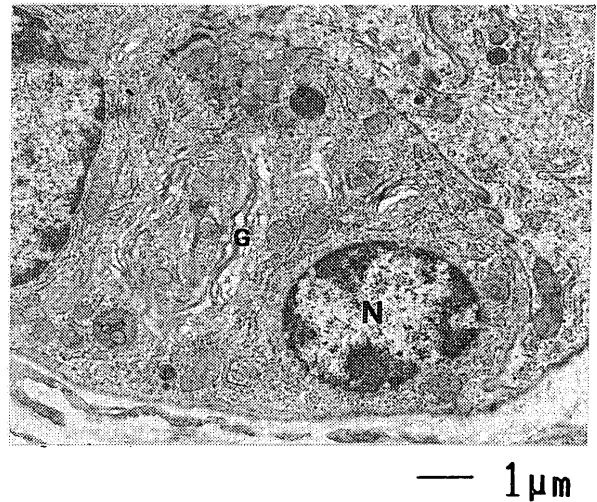


図1

Golgi cisternaeは、約7~9層見られ、形成面側の1, 2層は偏平化したcisternaにはなっておらず、内部の白く抜けたvesiclesが互いに融合したと思われる場面や、rERのリボゾームの無い部位が出芽して、輸送小胞が現れた場面などが観察された。

Golgi complex中央のcisternaeは偏平化し、両端が小胞状に膨れてくびれvesiclesを出芽しているものも見られた。そして、分泌面側のcisternaeは断片化し、多少膨張しており、内部に電子密度の高い物質を含む分泌顆粒が出芽していく場面が数多く見られた (図2)。

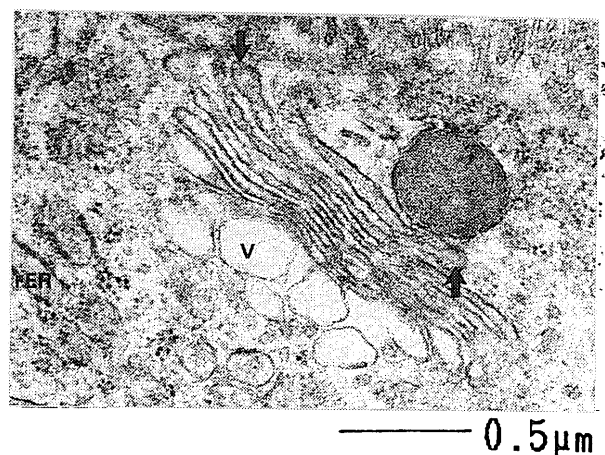


図2

#### 3-2. 銀染像の観察及び分析

##### (1)電子顕微鏡による観察

細胞は銀染のため荒れており、Golgi complexの

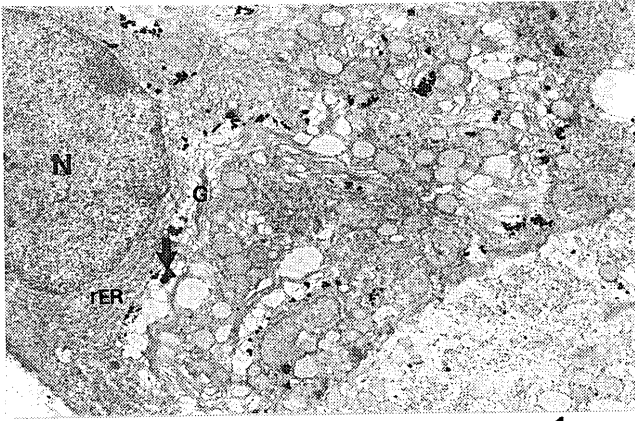


図3 — 1μm

形成面側のcisternaeはvacuolationを起こしていた。黒化物はGolgi領域に黒い沈殿の塊として特異的に局在し、形成面側の1層目あるいは2層目のcisternaの外側の細胞質と、膜に接した内部に見られた(図3)。

(2)分析電子顕微鏡による分析

これらの銀染像を分析してみると、Agのみが検出されるものとAgと同時にPが検出されるものがあった。また、染色した試料を用いたのでPbも検出されたが、Agの分析に何ら影響はなかった(図4)。

3-3. Sb-Os像の観察及び分析

(1)電子顕微鏡観察

細胞は鍍銀法の試料と同様に荒れており、Golgi complex形成面側のcisternaeはvacuolationを起こしていた。黒化像は銀染像に比べ量的にはすくないもののGolgi complex形成面側と、cisternaeに局在を

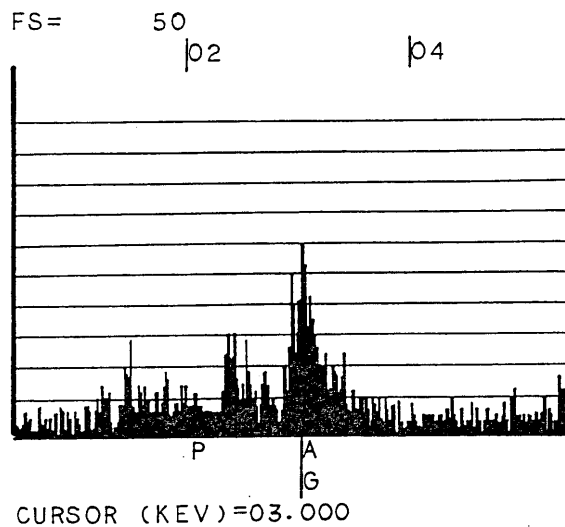


図4

示し、粒子がもっとも細かいものであった。黒化像は、cisternaeの膜に接して内側に多数見られ、膜上に存在するものもあった。

同じ固定法で固定時間を6時間としたものでは、細胞内はさらに荒れ、Golgi complex周囲は染色性が低下していた。Sb-Os像は、固定時間2時間のものに比べ、量的に増加しており、形成面側のcisternae膜外側の細胞質にも認められた(図5)。

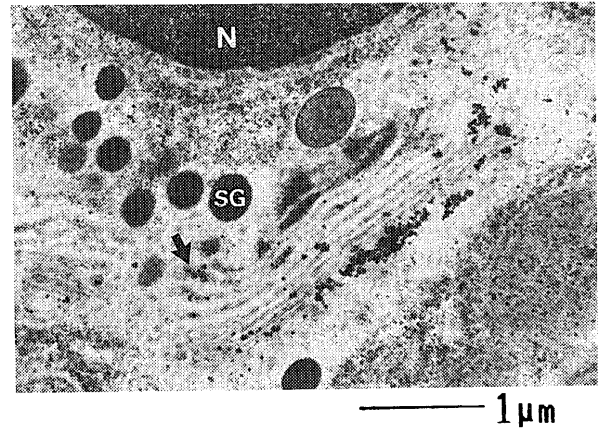


図5

(3)分析電子顕微鏡による分析

固定時間2時間、6時間共に、CaとSbの特性X線のエネルギー値が近似しているため、CaのK線とSbのL線が1つのピークとして検出されたがその値からSbのK線の標準値を差し引くとCa独自のピークが認められた(図6)。

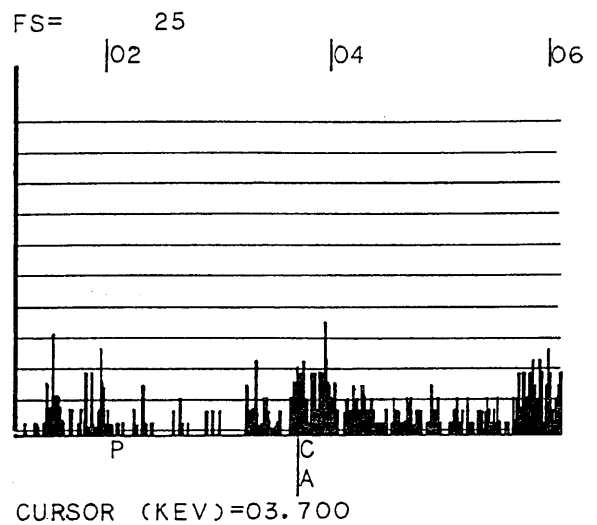


図6

### 3-4. 試験管テスト

銀染の過程で、リン酸カルシウムが硝酸銀処理によってリン酸銀になることを試験管内で調べてみた。リン酸カルシウム溶液 (①) の入った試験管に、硝酸銀溶液 (②) を加えると不溶性の沈殿 (③) を生じた。この沈殿について分析電子顕微鏡で分析すると、P・K線とAg・L線が検出された。さらに、この沈殿を生じた溶液にピロアンチモン酸カリ (④) を加えるとまた別の白色沈殿 (⑤) を生じた、硝酸銀による沈殿 (③) とピロアンチモン酸カリによる沈殿 (⑤) とを同時に分析電頭により分析すると、P・K線、Ag・L線と同時に、Ca・K線とSb・L線の複合した一つのピークが得られた (図7)。この値から、Sb・L線の標準値を差し引くと、最終的にP・K線、Ag・L線、Ca・K線が検出された (図8)。

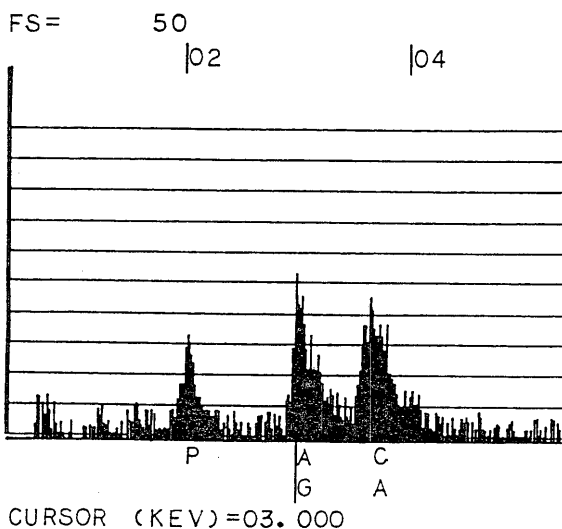
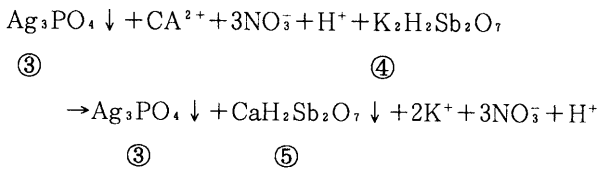
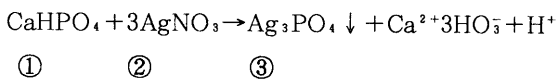


図7

### 4. 考察

電子顕微鏡の出現によりGolgi complexが空胞、層板、小胞の三つの成分の集合体であることが明ら

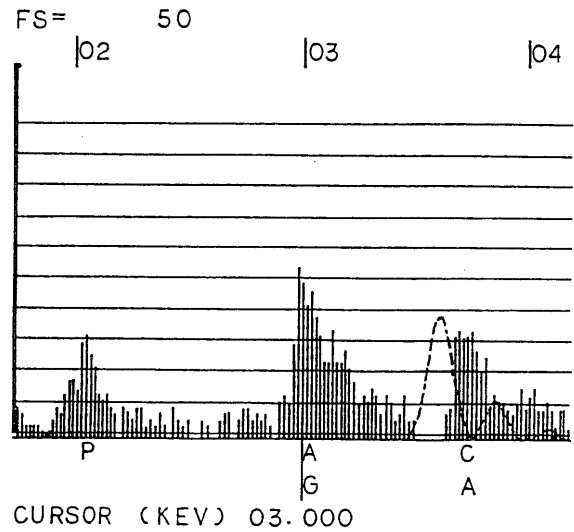


図8

かにされたが、鍍銀法による硝酸銀の黒化像はなんであるのか未だ解明されていない。長谷・山岡<sup>3)</sup>は、光顕的銀線像を細胞化学的手法で検討した結果、Golgi complexの網状黒化像の検出される位置にリン酸カルシウムの存在を予測した。また、Lison (1960) は、鍍銀法はカルシウム検出法と考えられることを報告した。つまり、銀染によりGolgi complexの形成面側に存在するリン酸カルシウムは、硝酸銀処理でリン酸銀となり、これを金属銀に還元することによってカルシウムを銀に置き換えて検出することが可能であるという。

本研究では、光顕的銀染像を得るためにCaulfield固定後硝酸銀で処理したが、検出された銀染像は電顕観察の結果、Golgi complex形成面側のcisternae外側の細胞質に多く認められた。この像はこれまでの当研究室で得られたものとほぼ一致する。

また、試験管中のリン酸カルシウム溶液に硝酸銀溶液を加えると、不溶性の沈殿を生じる。この沈殿について分析電頭を用いて分析した結果、Ag・L線のみのピークが検出されるものと、Ag・L線と同時にP・K線が検出されるものがあったこれらは、先に述べた長谷・山岡<sup>3)</sup>やLison (1960) の考えを強く支持するものであると考えられる。即ち、硝酸銀処理によってリン酸カルシウムはリン酸銀へ変化し、それを還元することで銀のみが検出されるはずなのだが、還元不足などの要因により還元銀と同様に

還元されなかった銀が検出されたものと思われる。

ピロアンチモン酸カリは、2価の陽イオンと結合して不溶性沈殿物を生じるという特性を持っている。この特性を用いて銀染像の検出される部位に存在すると考えられるリン酸カルシウムのカルシウムを検出すると考えられたSb-Os像は、固定時間の短い2時間のものでは量的に少なく、Golgi形成面側のcisterna膜上、あるいは膜内部に認められたものがほとんどであったが、6時間固定したものでは、銀染像のようにcisternaの外側の細胞質に検出された。この違いは恐らく固定液にオスミウムを使用しているので組織への浸透時間が遅くなり、反応産物の量に影響したものと思われる。そして、Sb-Os像は、分析電顕による分析結果から、はっきりとカルシウムを含むことが確認された。このことは、銀染で得られるGolgi黒化像の本体が、やはりリン酸カルシウムであることを強く裏づけるものである。

また一方、沈殿はcisternaの膜に接した内部や、輸送小胞の分泌のために膨張しているcisternaの内部にも検出されており、このことが分泌顆粒がGolgi complexで形成される過程において、カルシウムイオンが顆粒の安定性、融合能力、移動などのために必要であるというTartakoff & Vassalli<sup>2)</sup>の考えを支持すると同時に、当研究室の第一の仮説、即ちERから膨張し移行するvesiclesの形成と移動にリン酸カルシウムが関与するという考えを部分的に裏づけていると考えられる。しかし、カルシウムイオンのストックと考えられるリン酸カルシウムのGolgi complexでの局在性が次に起こるであろうカルシウムイオンの放出とどのようにつながるのかについてはまだ明確とは言えない。輸送小胞による移動にはATPが必要であるらしいこと<sup>5)</sup>や、Golgi complex形成面側にはALPaseが検出されることから、この部位でのリン酸カルシウムからの遊離が考えられるかもしれない。

また、電顕出現以前にGolgi検出法として鍍銀法と同様に用いられていた鍍オスミウム法による黒化像の検出される部位が銀染像の検出される部位と位置的にほぼ一致していることから、当研究室第二の仮説が考えられているが、現在まだ明らかな報告はない。今後、分析電顕的に鍍オスミウム法による黒

化像を分析し、リン酸カルシウムとの関係を検討する必要があるであろう。

#### 参考文献

- 1) Dalton, A. J. & Felix, M. D., (1956); A comparative study of the Golgi complex. *J. Biophys. Cytol.* 2(Suppl), 79-84.
- 2) Tartakoff, A. M. & Vassalli, P., (1977); Plasma cell immunoglobulin secretion. *J. Exp. Med.* 146, 1332-1345.
- 3) Nagatani, Y. & Yamaoka, I., (1961); Studies of the Golgi substance which creates silvered Golgi apparatus in the epididymal cells of the mouse. *Sci. Rep. Yamaguchi Univ.* 12, 23-42.
- 4) Nagatani, Y. & Yamaoka, I., (1963); Problem in the Golgi apparatus revealed by electron microscopy. *Bull. Marina Biol. Stut. Asamushi XI*, 229-239.
- 5) Jamieson, J.D. & Palade, G.E., (1967); Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. I. Role of the peripheral elements of Golgi complex. *J. Cell Biol.* 34, 577-596.
- 6) 藤田尚男, (1988); ゴルジ装置の話(その1). *電子顕微鏡*, 23, 132-138.
- 7) 藤田尚男, (1988); ゴルジ装置の話(その2). *電子顕微鏡*, 23, 18-32.
- 8) 水平敏知, John C. Russ, (1978); 分析電子顕微鏡, 日本メディカルセンター
- 9) Yamaoka, I., Katsuta, S., and Nagatani, Y. (1984); Silver-impregnation of the Golgi complex in epididymal epithelial cells of Mice. *Cell Structure and Function.* 8, 339-346.
- 10) 石川浩子, (1983); ゴルジ装置の本体に関する細胞学的研究(VI).卒業論文