

明視野で細胞骨格を観察できる植物細胞のプレパラートの作成

佐野(熊谷) 史・六本木太一郎・高橋直之

群馬大学教育実践研究 別刷

第33号 9～13頁 2016

群馬大学教育学部 附属学校教育臨床総合センター

明視野で細胞骨格を観察できる植物細胞のプレパラートの作成

佐野(熊谷) 史¹⁾・六本木 太一郎²⁾・高橋 直之³⁾

1) 群馬大学教育学部理科教育講座

2) 群馬大学教育学部附属小学校

3) 群馬県立桐生女子高等学校

Preparation of the plant cell specimen in which one can observe microtubules under bright field microscope.

Fumi KUMAGAI-SANO¹⁾, Taiichiro ROPPONGI²⁾, Naoyuki TAKAHASHI³⁾

1) Department of Science Education, Faculty of Education, Gunma University

2) Elementary School Attached to the Faculty of Education, Gunma University

3) Gunma Prefectural Kiryu Girls' High School

キーワード：植物細胞、細胞骨格、微小管、明視野観察

Keywords : plant cell, cytoskeleton, microtubule, bright-field microscopy

(2015年10月30日受理)

1 はじめに

細胞骨格は真核細胞に普遍的に見られる繊維状構造の総称で、近年では原核生物にも同様の構造が認められることがわかってきている。「骨格」という名称のとおり、繊維状の形態をとることで機能を発揮する性質があり、さまざまな結合タンパク質とともに細胞の形態の形成や維持、細胞内の物質の輸送など、広範な機能を示す細胞内構造である。細胞骨格には微小管、アクチン繊維、中間径フィラメントの三種類が含まれ、特に微小管は、植物細胞においては分裂・伸長双方に重要な役割を果たすことが知られている。

その重要性から、平成21年3月告示の文部科学省高等学校学習指導要領¹⁾では、「3 内容の取扱い」において「細胞骨格にも触れること」と明記される学習内容となった。そのため、現行の「生物」の教科書では細胞骨格が前述した三種類に大別されることやそれらの構造の特徴、大まかな機能などが書かれており、「生

物基礎」でも発展や参考という形で紹介されるようになった。しかし、実は前の指導要領の元でも、細胞骨格に関わる現象のいくつかは、細胞骨格との関連が明確に述べられないまま取り上げられていた。一つは細胞分裂であり、染色体を分離する装置である紡錘体の紡錘糸は微小管でできている。が、かつての「生物Ⅰ」の教科書では正体不明の繊維状構造として図示されており、現在の「生物基礎」の教科書にも同様の図が掲載されている。また、中学校理科の教科書では、染色体を両極に引っ張る繊維が名称のない状態で図示されている。もう一つは筋収縮であり、かつての「生物Ⅱ」では収縮のメカニズムにおけるアクチンフィラメントの働きに関して詳細な記述が見られ、これは現在の「生物」の教科書にも引き継がれている。これら広範な現象に関わる繊維状構造が細胞骨格と総称されるものの一員であり、記載された現象に特異的なものではないことが明記されたことにより、「生物」まで学ぶ生徒の細胞に関する理解が深まることが期待される。

このように高校生物の必修事項となったとはいえ、教科書に掲載されている細胞骨格の写真は蛍光顕微鏡や電子顕微鏡といった、通常高等学校には存在しない設備を用いた観察像であるため、身近な画像とはいえない。また、大学の基礎的な教科書でも細胞骨格は取り上げられているが、実際に観察まで行うことはあまりなく、教える側の高校教員の多くは自分自身で細胞骨格を観察した経験がないようである。さらに細胞骨格の存在を実感させる学校教材はまだ開発が進んでいない。そのため、全ての真核細胞に存在する普遍的、基本的な構造であるにも関わらず、特殊な顕微鏡を使わないと存在を認めることができない、理解の難しい存在のように認識されてしまう危惧がある。そこで、植物細胞を材料として、高等学校でも馴染み深い明視野の光学顕微鏡で微小管を観察できるプレパラートを作成する方法を確立することを試みた。さらに方法を簡便化し、免許状更新講習において小、中、高教員を対象とした実践を行った。

2 明視野で植物細胞の微小管を観察できるプレパラートの作成方法の検討

前述したように、教科書に掲載されている細胞骨格の写真の多くは蛍光顕微鏡像である。この画像を得る技法の一つは、観察したい分子を特異的に認識する抗体(一次抗体)と、一次抗体そのものを認識する抗体(二次抗体)に蛍光物質で“色”をつけたものの二種類を使い、観察したい分子に“色”がつくようにする、間接蛍光抗体法である(図1)。この方法と同じ原理で、蛍光物質で“色”をつける代わりに金粒子で光を遮ることによって明視野や電子顕微鏡で観察できる状態にする方法があり、植物細胞でも*Haemanthus*の内乳において微

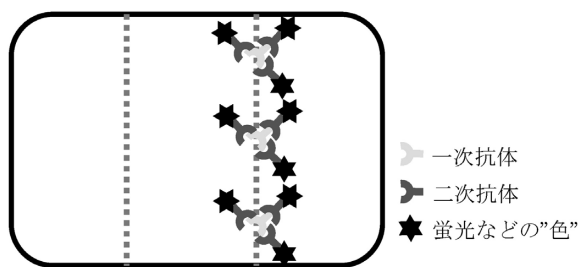


図1 間接抗体法のイメージ

そのままでは見えにくい細胞内構造(例えば左側点線の繊維状構造)も、二次抗体を標識している蛍光などの“色”で右のように可視化することができる。

小管を観察した例²⁾などが報告されている。そこで、微小管の観察に適した細胞であるタバコ懸濁培養細胞BY-2(以下BY-2細胞)に、この方法を応用することを試みた。

BY-2細胞は、液体培地に懸濁した状態で培養している。細胞が比較的大きく、一列の鎖状に増殖することが多いため、細胞の内部構造の観察に適している。さらに細胞周期の同調法が確立されており、細胞周期各期における細胞骨格の動態など細胞内構造の解析によく用いられている^{3) 4)}。この細胞の微小管を間接蛍光抗体法で染色する方法は既に確立されているため⁵⁾、一次抗体の反応まではその方法を用い、蛍光標識された二次抗体を用いる手順以降を改変することにした。

2-1 方法

まず準備として、カバーガラスにポリリジン(Poly-L-lysine、シグマアルドリッチ)を塗布して、細胞を接着させるポリリジンプレートを作成しておいた。植え継ぎ3日目のBY-2細胞を10 mL遠沈管にとり、固定液(4%ホルマリンを含むPMEG液、後述)で室温、1時間固定した。固定液を捨て、沈んでいる細胞とほぼ同量のPMEG液(50 mM PIPES、5 mM EGTA、1 mM 硫酸マグネシウム、1%グリセロール、pH 6.8)に懸濁した後、小シャーレに入れたポリリジンプレートに乗せて20分間静置した。接着しなかった細胞をPMEG液で洗い流し、酵素液(1%セルラーゼ、0.05%ペクトリアーゼ、0.4 M マニトールを含むPMEG液)を滴下して5分間静置し、植物細胞の細胞壁を部分的に消化して抗体が通過できる状態にした。PMEG液で3回洗い、ディタージェント液(1% NP-40、0.4 M マニトール、5 mM EGTAを含むPBS液、後述)を滴下して15分間静置し、細胞膜を部分的に消化して抗体が通過できる状態にした。PBS液(20 mM Na-phosphate、150 mM NaCl、pH 7.0)で3回洗い、グリシン液(0.1 M グリシン、1% BSA、0.05% Triton X-100を含むPBS液)を滴下して10分間静置し、細胞周辺の状態を整えるとともに抗体が余分なところに付かないようにブロッキングを行った。PBS液で3回洗い、微小管を構成するタンパク質であるチューブリンを認識する一次抗体(マウス抗 α -チューブリン抗体、クローンDM1A、シグマアルドリッチ)を滴下して30分間静置した。PBS液で3回洗い、マウスIgGを認識する金粒子標識二次抗体

(Nanogold-Fab' fragment of goat anti-mouse IgG、Nanoprobes) を滴下して30分間静置した。PBS液で1回洗い、脱イオン水を注いで5分間静置することを2回繰り返した後、銀増感試薬 (LI Silver Enhancement Kit、Nanoprobes) を滴下して20分間静置した。脱イオン水で3回洗い、マウント液 (マウントクイックアクエオス、大道産業) を滴下しておいたスライドガラスにマウントしてプレパラートを作成した。観察は明視野で行い (Axiophot 2、Carl Zeiss)、画像は顕微鏡用CCDカメラ (QIClick、QImaging) を用いて取得した。

2-2 結果と考察

2-1 で示した手順により、BY-2細胞の長軸方向と垂直に並んだ茶〜黒色の繊維状構造を明視野で観察することができた (図2a)。

一次抗体処理を行わない場合には、細胞質全体が茶〜黒色に見えたが、繊維状の構造は観察されなかった (図2b)。したがって、この繊維状構造は微小管であると考えられる。植物細胞では分裂間期の細胞表層に、微小管が同じ向きに並んだ表層微小管と呼ばれる構造が形成され、細胞壁セルロース微繊維の向きを規定することで細胞の伸長方向を制御していることが知られており⁴⁾、今回観察された構造はこの表層微小管であると考えられる。一方、試料には分裂中の細胞も含まれているはずであったが、紡錘体など分裂に関わる構造が明確にわかる細胞は見つからなかった。表層微小管がきれいに見える条件では、紡錘体のように微小管が密に存在する構造にとって染色や増感が強すぎて繊維状に見えなかったのかもしれない。また、蛍光物質を用いた染色像と比較すると、ほとんどの細胞で細胞質にもかなり強い染色が見られ、微小管を観察しにくい細胞もあった。より鮮明な表層微小管と、表層微小管以外の微小管構造を観察するためには、更なる条件検討が必要かもしれない。

なお、De Meyら²⁾ は、金粒子で標識した二次抗体で操作を終えて微小管の観察を行っていたが、今回検討した限りでは二次抗体まででは微小管が観察されず (図2c)、金粒子に対してさらに銀増感の手順を加えることではじめて微小管を茶色〜黒色の繊維状構造として観察することができた。また、観察する際には開口絞りをあまり絞らないほうが良好な観察像となることがわかった。

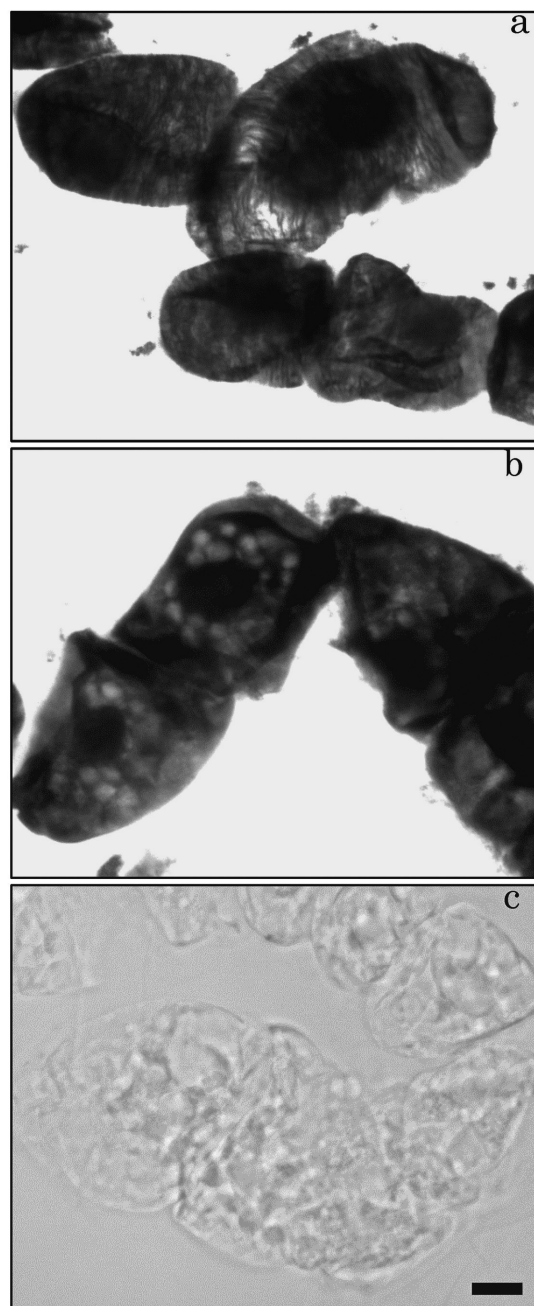


図2 染色像

a 微小管の染色像 b 一次抗体なし c 銀増感なし
明るさ、コントラストはImageJで調整した。スケールバーは10 μm

以上より、分裂間期にあるBY-2細胞の表層微小管を明視野で観察する手順を確立することができた。

3 免許状更新講習における実践

平成25年度から平成27年度の3年間に渡り、2で確立した方法を活用して、免許状更新講習において「植物の形を支える細胞骨格」と題した講習を行った。受

講対象者は「理科を担当する中・高教諭、植物や細胞に関心の深い小教諭」とした。

3-1 実践に向けた工夫と手順の改良

高等学校の「生物」における細胞骨格の画像や記載内容は基本的に動物細胞のものである。そこで講習では、1～2時限に細胞骨格と植物の体のつくりに関する講義を行って植物細胞における微小管の重要性を理解してもらった上で、3～5時限で微小管の染色と観察を行った(1時限は60分、6時限目は履修認定試験)。また、昼食時間を考慮して、一次抗体の反応時間は60分とした。

実験に不慣れな人材を含む多人数で実験を行うことを考慮し、使う器具を工夫することで手順の簡便化を図った。まず、酵素液など薬剤の滴下には滴びん(小)を使い、高等学校でも用いることが少ないマイクロピペットは少量を扱う抗体とマウント液のみに用いることにした。マイクロピペットの使い方は、ポリリジンプレートへの細胞の接着を待つ間に、1 mLの水を採取して重さを量ることで、各自にあらかじめ確認してもらった。また、PMEG液やPBS液などの洗いの溶液は30 mL容量の滴びん(大)で直接注ぎ、液を捨てるときはスポイトを使うようにした。観察に用いた双眼の光学顕微鏡は学校現場には一般的でないため、染色中の空き時間を利用して、立体感のあるスギナの胞子で観察の練習を行った。

3-2 結果と考察

受講者の校種の内訳は、平成25年度は小4名、中2名、高6名の計12名、平成26年度は小2名、中5名、高4名、中等教育学校教員1名の計12名、平成27年度は小2名、中3名、高7名、特別支援学校1名の計13名であった(小:小学校教員、中:中学校教員、高:高等学校教員)。予想通り、細胞骨格を教えなければならなくなった高等学校教員の受講希望者が多い傾向にあった。

観察中に確認したところ、平成25年度はほぼ全員のプレパラートで図2aのような表層微小管の染色像を観察することができた。しかし、平成26年度は約半数のプレパラートで染色があまりよくなかった。良好な染色像も見られたことから、細胞自体の問題ではなく、手順の問題であることが考えられたため、平成27年度

は抗体など少量の液体がポリリジンプレートから流れ出したときの対処法など、特に染色結果に影響を及ぼしそうな手順については数名ずつ丁寧に説明するように配慮した。その結果、平成27年度はほぼ全員のプレパラートで表層微小管を観察することができた。

免許状更新講習受講者評価書によれば、受講者の多くが講習内容に満足だったようである。「I. 本講習の内容・方法についての総合的な評価」の項目では、平成25年度は「よい」が11名、「だいたいよい」が1名、平成26年度は「よい」が10名、「だいたいよい」が2名であった。「II. 本講習を受講したあなたの最新の知識・技能の修得の成果についての総合的な評価」の項目では、平成25年度は「よい」が7名、「だいたいよい」が5名、平成26年度は「よい」が10名、「だいたいよい」が2名であった(平成27年度はまだ評価が出ていない)。自由記入欄には、「今後の授業に活かせる」「理解が深まった」といった記述の他、「(実験が)楽しかった」という感想も見られ、直接細胞骨格を教えることがない校種の教員にとっても興味深いものであったようである。

この方法で作成したプレパラートは、冷蔵保存で少なくとも2年間は微小管の観察ができることを筆者らの研究室で確認しているため、講習で作成したプレパラートは持ち帰ってもらっているが、その後の活用の有無については調査していない。大量に準備することが難しいために実施できていないが、この方法で作成したプレパラートを高等学校の生徒に観察させることで、細胞骨格についての理解が深まるかどうかの検討も行っていきたいと考えている。

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金(若手研究(B) 課題番号22730684)の助成を受けて行った。

4 参考文献

- 1) 文部科学省(2009) 高等学校学習指導要領、東山書房
- 2) J. De Mey, A. M. Lambert, A.S. Bajer, M. Moeremans, M. De Brabander (1982) Visualization of microtubules in interphase and mitotic plant cells of *Haemanthus* endosperm with the immuno-gold staining method. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1898-1902.
- 3) F. Kumagai-Sano, T. Hayashi, T. Sano, S. Hasezawa

- (2007) Cell cycle synchronization of tobacco BY-2 cells. Nature Protocols 1, 2621-2627. 分裂装置とその制御機構』町田泰則, 福田裕穂監修 秀潤社
- 4) 馳澤盛一郎, 熊谷 史 (2000) 「2-1 細胞周期進行にともなう細胞骨格のダイナミズム」(74-82頁), 『植物細胞の分裂 5) 熊谷 史, 馳澤盛一郎 (1997) 「4-1 微小管とアクチン繊維の二重染色法」(132-139頁) 『植物の細胞を観る実験プロトコール』福田裕穂, 西村幹夫, 中村研三監修 秀潤社

(さの(くまがい) ふみ・ろっぽんぎ たいいちろう・たかはし なおゆき)

