



研究技術紹介

間接蛍光抗体法による海藻類の細胞骨格の観察

本村泰三¹・菱沼 佑²

¹北海道大学理学部附属海藻研究施設 051 室蘭市母恋南町 1-13

²山形大学理学部生物学科 990 山形市小白川町 1-4-12

Taizo Motomura and Tasuku Hishinuma 1997: Methods for immunofluorescence observation on the algal cytoskeleton. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 45:175-181.

Basic methods for immunofluorescence observations on microtubules and microfilaments in algal cells are described. Especially, the suitable fixation and the cell wall digestion (removal) are emphasized. Cell wall components in algal cells are characteristically different from land plants, therefore, several attentions are necessary for the penetration of antibodies into the algal cells.

Key Index Words: brown algae, Bryopsis plumosa, cytoskeleton, immunofluorescence microscopy, microfilaments, microtubules.

はじめに

間接蛍光抗体法を用いて、細胞内の標的とする物質や構造物を特異的に染色し、蛍光顕微鏡下で観察する方法は、極めて基本的な手法として多くの研究室で積極的に行われている。現在では多くの生体物質に対する抗体が市販されるようになり、間接蛍光抗体法は他の染色剤による染色実験とほとんど同じように簡単に利用でき、技術的な難しさはほとんどない。この手法の基本的な流れは、1)細胞の固定、2)免疫染色(細胞内の目的抗原への抗体の結合)、3)顕微鏡観察とその記録に要約される。生物学において多くの実験手法がモデル生物を材料に開発されてきたため、我々が対象とする藻類の細胞では、自分たちの材料に適した方法を工夫していく必要がある。本稿では細胞骨格、特に微小管とF-アクチンに焦点を絞り、まず褐藻類を材料にその観察手法について具体的に概説したい。後半は特殊なケースとして多核緑藻のハネモの細胞骨格の観察法について解説する。

陸上植物や藻類を材料に蛍光抗体法を行う場合の主要な問題点は、細胞・組織の適切な固定条件の検索に加え、細胞壁をいかに処理して分子量約15万の抗体分子を細胞内部に入れるかにかかっている。一般に植物

の細胞壁は不定形物質の層に結晶構造部分が埋め込まれた形で存在している。海藻類の細胞壁が高等植物のそれと大きく異なる点として、1)不定形物質の層が結晶構造部分の層と比較して豊富であること、2)中性多糖よりも多陰イオン性多糖が豊富であること、3)硫酸多糖を多く含むことなどが挙げられる。これら細胞壁の特徴は海中条件において、機械的な強度を保ち、浸透圧やイオンの調節に有効であると考えられている。海藻類の構造多糖で最も普通に観察されるのは高等植物同様にセルロースであり、ハネモなどの管状緑藻のようにキシラン、マンナンを持つものもいくつかの種類で観察される。しかし高等植物と比較してセルロース含量は一般にかなり低い(高等植物では植物体の乾重量あたり30%程度であるのに対し、褐藻・紅藻類の場合1-8%である)。また、海藻の細胞壁マトリックス成分には我々の生活にとってみじかな紅藻類の寒天、カラゲナン、褐藻類のアルギン酸、フカンといった極めてユニークな性質を有する多糖などがある。それ故、海藻類を材料とした蛍光抗体法において抗体が細胞内部に入る程度に細胞壁を分解する場合、対象とする材料の細胞壁組成を調べ、それに適した酵素液を調製することが重要である。

1 褐藻類の細胞骨格、特に微小管の観察

1-1 固定

組織や細胞は当然の事ながらまず適切に固定されなければならない。この時、注意すべきことは、抗体の認識する抗原のエピトープの立体構造が固定の間に大きく変化しないことである。間接蛍光抗体法において通常よく使用されている固定法はパラホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドなどを用いた化学固定とアセトン、メタノール、エタノールなどの有機溶媒を用いた固定である。一般に植物細胞の固定の場合には有機溶媒を使用しない。植物細胞の場合には細胞内部に巨大な液胞が存在するために、急激な外部条件の変化が細胞構造に著しくダメージを与えるためと考えられる。しかし、対象とする抗原によっては有機溶媒による固定の方が化学固定よりも抗原性の維持に優れている場合もあるので注意を要する。ただし、本稿で扱う微小管やF-アクチンの観察には、パラホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドを用いるのが無難である。

褐藻細胞の固定には、3%パラホルムアルデヒドと0.5%グルタルアルデヒドを含む適当な緩衝液のもとで室温もしくは4℃で30-60分間行う。海産の藻類の場合には浸透圧の調節のために2-4%のNaClを加える。微小管やF-アクチンなどの細胞骨格構造の観察にはEGTAやMgCl₂を含む"Good buffer"を用いる場合が多い。当研究室では通常PHEM bufferを緩衝液として用いている。この時、10xsolを作製しておくことと便利である。実際に上記の固定液を30ml調製する手順を説明すると以下の様になる。50mlのビーカーに純水20ml程度をいれ、ホットプレート上で約60℃に暖めながら、0.9gのパラホルムアルデヒド(最終濃度3%, TAAB社)と0.9gのNaCl(最終濃度3%)を加え、さらに1NのNaOH溶液を4-5滴加える。しばらく攪拌するとパラホルムアルデヒドは完全に溶ける。室温まで液温が下がった後に、50-75%のグルタルアルデヒド(TAAB社)を最終濃度0.5%になるように加え、さらにPHEM bufferの10x solを3ml加える(これで固定液のpHは7.4となっている。pHメーターで確認する必要は無い)。最終濃度30mlにメスアップした後に、ろ過して固定液として使用する。この固定液は保存は利かないので、調製後2-3日の内に使いきってしまう。

固定は固定液の中で30-60分間行う。褐藻類の細胞壁中には大量のアルギン酸が含まれるために、固定液中のEGTAによりアルギン酸が可溶化し(アルギン酸に結合しているカルシウムをEGTAのキレート作用に

より外す)、以下の酵素処理無しに細胞がバラバラになる場合もある。例えば、コンブ類の単子嚢などは、原形質が固定操作の間に突出するため後に述べる様な酵素処理を必要としない。また、目的とする細胞の種類によっては酵素処理を必要とせず、この固定液中のEGTAの作用のみで抗体が細胞壁を透過できるようになることもあるので、一度確認した方が良い。固定した組織はPBSで5分毎に3回洗浄する。遊走子など細胞壁を持たない細胞は当然のことながら以下の細胞壁消化酵素処理のステップは省けるので固定液とともにポリ-L-リジンをコートしたカバーガラス(18x18mm)に滴下し、少し風乾させカバーガラスに附着させ、その後小型シャーレ(直径3cm)中でPBSで洗浄する。

1-2 細胞壁消化酵素処理

植物細胞の場合には細胞膜の外側に細胞壁が存在するために、そのままでは抗体は入らない。そのため、細胞壁消化酵素を用いてある程度外部の細胞壁を消化しなければならない。上述したように藻類の細胞壁は陸上植物のそれと構成多糖が大きく異なるために注意を要する。通常、褐藻類を材料とする場合、酵素液(3% abalone acetone powder (SIGMA), 2% cellulase Onozuka R-10(YAKULT HONSHA), 3% BSA, 0.1mM PMSF in PBS)で4℃から室温条件で1時間程度処理し、細胞壁を柔らかくし抗体の入りをよくする。その後、組織をPBSで5分毎に3回洗浄し、ポリ-L-リジンをコートしたカバーガラスに張り付ける。

ところで、細胞の種類によっては上記の細胞壁酵素処理によっても抗体が入らない場合が多々ある。この場合は細胞をポリ-L-リジンをコートしたカバーガラスとスライドガラスの間に挟み、軽く押しつぶすと良い。細胞はポリ-L-リジンをコートしたカバーガラスの方に張り付いている。これにより細胞壁の一部が裂けるために抗体が内部に入るようになる。

1-3 界面活性剤処理

次に、0.5-5% Triton X-100 in PBSで30-120分間程度処理する。単に細胞膜に穴をあけ、抗体が入りやすいように処理するだけなら低濃度で十分である。しかし、植物細胞では内部に多数の葉緑体が存在するために、それから溶出するクロロフィルが蛍光顕微鏡下で強く赤く光るために観察しにくい場合がある。特に、標識二次抗体でローダミンなどの赤系の蛍光色素を用いる場合は深刻である。勿論、使用する蛍光顕微鏡が適切なカットフィルターを装着している場合には問題

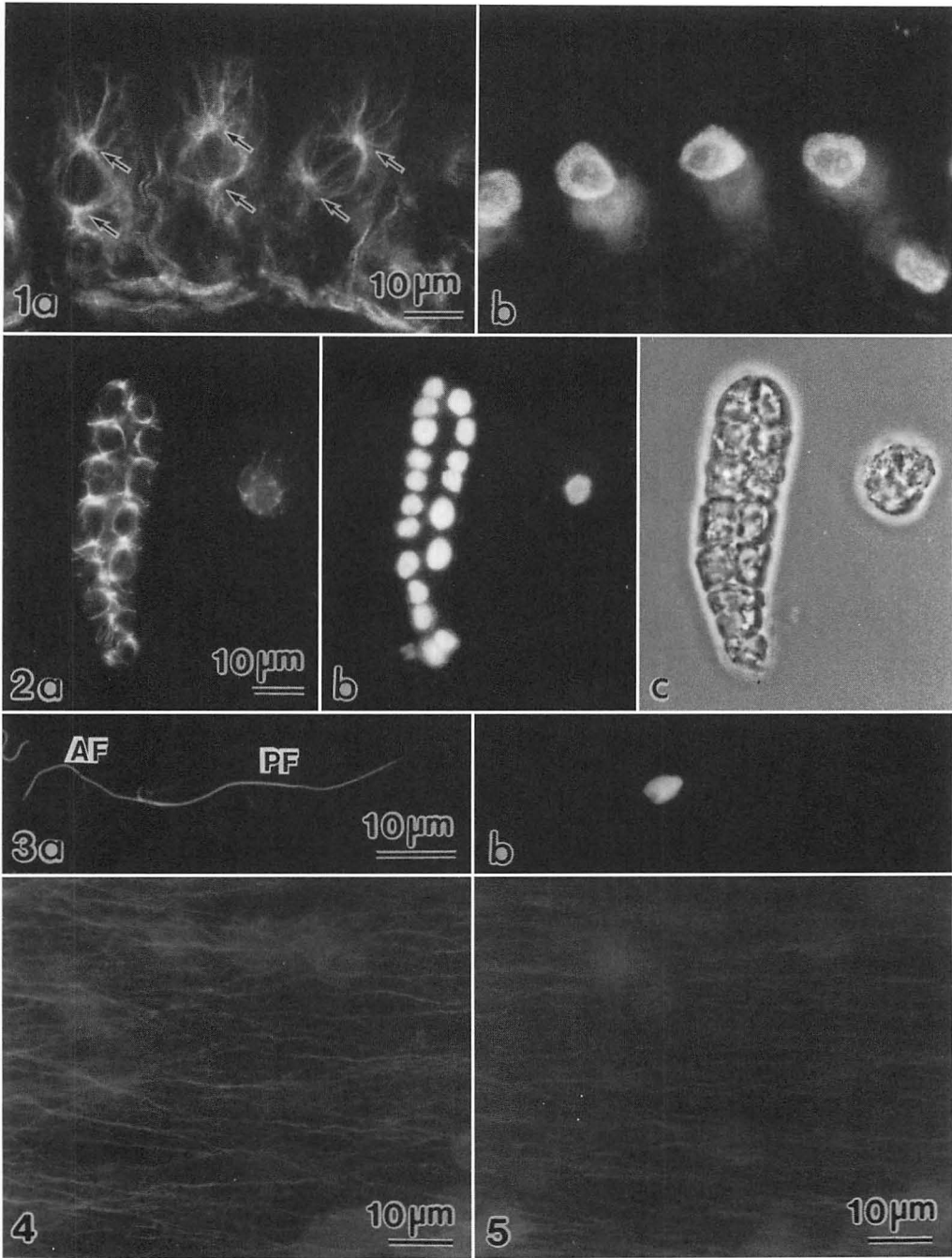


図 1a,b アミジグサの微小管と核。微小管が核付近の2つの極（矢印、セントロゾーム）に収束している。
 図 2a,b,c ミツイシコンブの若い胞子体の微小管と核。
 図 3a,b ミツイシコンブの精子の微小管と核。コンブの精子は後鞭毛（PF）が前鞭毛（AF）よりも長い。
 図 4 ハネモの微小管。細胞長軸は横方向。
 図 5 ハネモのF-アクチン。細胞長軸は横方向。

ではない(クロロフィルとローダミンをかなり分離することは可能である。種々の蛍光色素に対応するカットフィルターはアメリカのOMEGA OPTICAL社から入手が可能である)。できる限り組織・細胞からクロロフィルを脱色したい場合は、高濃度のTriton X-100で長時間処理する。Triton X-100の処理後、サンプルはPBSで5分毎に3回洗浄し、次のブロッッキングに移る。

1-4 ブロッッキング

一次抗体、二次抗体の対象抗原以外への非特異的な吸着を防ぐために、30-50 μ lのブロッッキング液(2.5% スキムミルク, 5% 正常ヤギ血清, 0.1% NaN₃ in PBS)をカバーガラス上に付着したサンプルに加え、30°Cで30分程度処理する。特に褐藻植物では細胞内にフェノール顆粒を大量に含む場合があるので、ブロッッキング処理は必須である。なお、ブロッッキング、一次・二次抗体処理を含めて処理時間が長くなるので、カバーガラス上の処理液の蒸発を防ぐように工夫する。直径10cmのシャーレを反転し、下になった外側のふたの方に蒸留水で湿らせた直径9cmのろ紙をひき、その上にカバーガラスを置きシャーレの内側でふたをして使用すると便利である。

1-5 抗体処理

ブロッッキング液をろ紙で吸い取った後に、PBSで1/50に希釈したモノクローナル抗 β -チューブリン抗体(アマシャムジャパン)を30-50 μ l加え、30°Cで60min処理する。なお、なかなか手に入らない貴重な抗体を使用する場合には、できる限り使用する抗体の量を少なくしたい。この様な場合にはカバーガラスに10 μ lの抗体を滴下し、その上からカバーガラスよりも一回り小さく切ったパラフィルムをかぶせるようにすればよい。購入した抗体は一次抗体であれ二次抗体であれ希釈することなくエッペンドルフチューブに小分けし、-80°Cのディープフリーザーに保存しておく。そして必要ときにPBSで使用濃度に希釈して冷蔵庫中で保存するようにする。一次抗体処理が終わったサンプルはPBSで5分毎に3回洗った後に、標識二次抗体で処理する。普通はPBSで1/50に希釈したFITC標識-抗マウスIgG(ヤギ)を50 μ lカバーガラス上のサンプルに加え、30°C, 60min処理する。染色が薄い場合には、一次・二次抗体の濃度をあげたり、処理時間を長くする。また抗体処理の前に、トリプシンなどのタンパク質分解酵素で処理するのも有効な方法である(Aruga et al. 1977)。

抗体処理の終了した後、PBSで数回洗い、0.1-1 μ g-DAPI/1ml in PBSで室温10分間染色する。退色防止剤として0.2% *p*-phenylenediamineを含むMowiol 4-88 mounting medium (Osborn and Weber 1982)で封入する(この封入剤に包埋し、-20°C保存することにより半永久的なプレパラートとなる)。落射蛍光顕微鏡(オリンパス)で、微小管観察(FITC染色)にはB励起、核観察(DAPI染色)にはU励起で観察する。写真撮影はコダックTri-XフィルムをASA1600に増感して用いる。現像はパンドールで行い、最終的には印画紙に焼き付ける。

2 ハネモ (*Bryopsis plumosa*) の細胞骨格の観察

ハネモにおける間接蛍光抗体法による細胞骨格の観察方法としてMenzel and Schliwa (1986)により原形質分離を利用した方法がすでに報告されている。今回紹介する方法は、細胞切片を作り、抗体を液胞内から導入する方法であり、彼らの方法に比べてより簡便で、また細胞質の変化を伴わないため、その観察像は細胞内における細胞骨格の本来の配向により近いものと考えられる。方法の概略を図6に示した。これらの操作を行う際、ピンセットあるいはピペットを用いて液胞内を各溶液が充分かん流するように注意する必要がある。また、基本的な操作や試薬、諸注意などについては、適宜、前項を参照されたい。

2-1 材料の調製

材料のハネモ (*B. plumosa*) は、宮城県松島で採集したものを単葉的に、23°C、連続照明下でPES培地を用いて継代培養している。このような培養条件下では、新しい培地に継代後、葉状部は多少分枝するが、その後はほとんど分枝せず、主軸も側枝も同じような長い管状の形態をなす。ハネモ細胞は高い再生能力を持つため(Tatewaki and Nagata 1970)、藻体の一部を切断することにより500 μ mほどの太さがある、任意の長さの管状の細胞を簡単に調製することができる。ハネモ細胞は大きな液胞と薄い細胞質からなる管状の細胞であり、細胞質はさらに遠心により容易に移動する葉緑体の存在する内質と、核などが存在する外質とからなると考えられる。細胞骨格の観察には、葉状体の先端から2cm位の長さで切断し、その後2-3日培養して仮根を再生させた管状の細胞を用いている。このような単純な形態をした細胞では、細胞を500gの低速で遠心して蛍光観察の妨げとなる葉緑体を細胞の一端に寄せることにより、容易に細胞骨格の観察ができる。

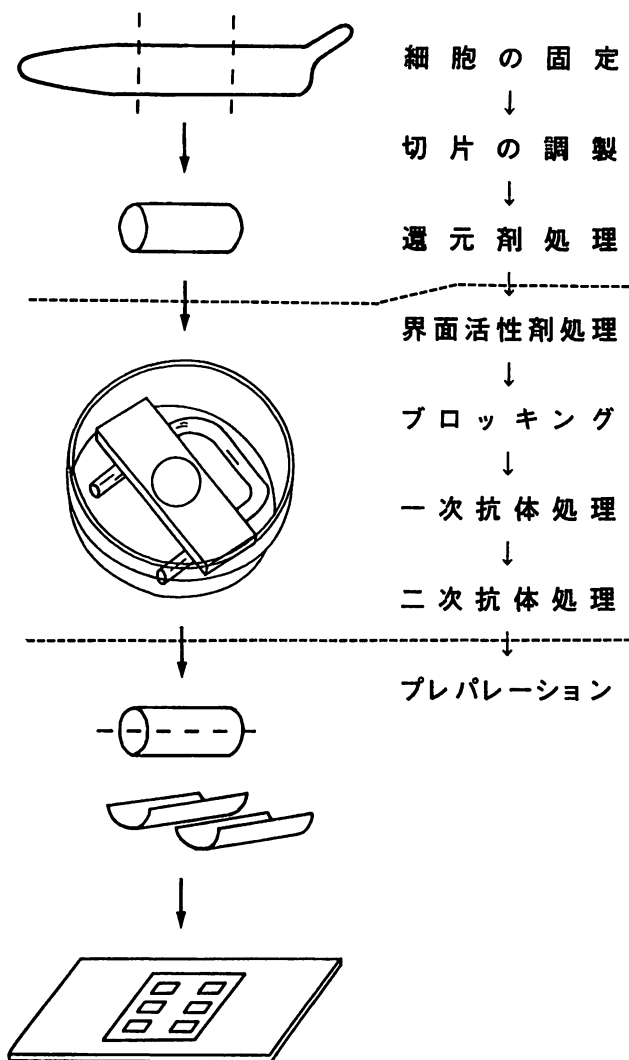


図6. 間接蛍光抗体法によるハネモ細胞骨格観察の概略

2-2 細胞の固定

細胞の固定法は微小管を観察するか、F-アクチンを観察するかで異なるが、固定後の操作は同じである。

ハネモ細胞の微小管観察では、グルタルアルデヒドを海水に直接添加して作った1%グルタルアルデヒド海水で細胞を1時間固定する。固定液のpHの調整は行わず使用する。また、F-アクチンを観察する場合は、F-アクチンが化学固定により壊れやすいため、タンパク質の架橋剤であるMBS (m-maleimidobenzoyl N-hydroxysuccinimide ester) で細胞に前処理を施す

(Sonobe and Shibaoka 1989)。300 μ M MBS 海水で3-4分間細胞を処理した後、2%パラホルムアルデヒドと0.5%グルタルアルデヒドを含むMBS海水で1時間固定する。

いずれの場合も固定した細胞は海水を交換しながら3回以上洗浄し、そして細胞を3-4 mmの長さに切断し管状の切片にする。切片を調製する場合、あらかじめ細胞の一部をピンセットで強く挟み傷を付け、膨圧を低下させた後に切断するようにする。膨圧が高い状態で切断すると、調製した切片にゆがみが生じ、細胞骨格

の配向が変化する可能性がある。

2-3 還元剤処理

海水中で切断した切片をPBSで一度洗浄した後、グルタールアルデヒドによる非特異的蛍光を減じるため、Gralway and Hardham (1986)の方法に従い、0.1% NaBH_4 を含むPBSに15分間浸す。 NaBH_4 による還元処理の時間はこれより長くてもよいが、溶液は使用直前に調製する。切片を海水から直接、あるいは海水が切片に残ったまま NaBH_4 -PBSに移した場合、溶液中に沈殿が生じるので注意をする。

2-4 界面活性剤処理とブロッキング

還元剤処理した切片をPBSに戻し十分洗浄する。つぎに、液胞膜における抗体の透過性を高め、また蛍光観察の妨げとなる葉緑体クロロフィルの自家蛍光を減少させるために、切片を界面活性剤である1% Triton X-100を含むPBS-BSAで30-45分間処理する。Triton X-100の濃度は高等植物の場合に比べ高濃度であり、固定が不十分な場合には細胞骨格タンパク質の溶出があり得ることを留意しておく必要がある。クロロフィルの緑色が薄くなったのを確認し、切片をPBS-BSAに移し3回洗浄する。そして、抗体の非特異的吸着を防ぐために、洗浄が終わった切片をPBS-BSAの入ったホールスライドガラスに移し、湿室中で37℃、1時間同じPBS-BSAでブロッキングを行う。図6に示したように、湿室は10cmシャーレの底とスライドガラスとの間にU字型のガラス棒で隙間をもうけ、この部分に水を入れることにより簡単に作ることができる。

2-5 免疫染色

ブロッキング終了後、ホールスライドガラス中の切片を抗体で染色する。ホールスライドガラスを利用した場合、20本位の切片であれば一回の染色に用いる抗体は100 μl で十分である。

微小管の間接蛍光抗体法では一次抗体としてモノクローナル抗 α -、抗 β -チューブリン抗体(アマシャムジャパン)、二次抗体としてFITC標識抗マウスIgG(アマシャムジャパン)を用いている。一次抗体は1/25に、2次抗体は1/20にそれぞれPBS-BSAで希釈し使用する。またF-アクチンの観察には一次抗体として1/125に希釈した抗アクチンC4モノクローナル抗体(ICN)を用い、二次抗体は微小管の場合と同じ抗体を用いている。抗チューブリン抗体の場合は1時間、抗アクチン抗体の場合は6-12時間、36℃でインキュベートす

る。一次抗体処理が終わった切片はPBS-BSAで3回以上丁寧に洗浄し、二次抗体と同様に1時間インキュベートする。その後3回以上、十分にPBS-BSAで洗浄し、切片をPBS-BSAの入った6cmシャーレに移す。

2-6 プレパレーション

実体顕微鏡下で免疫染色の終わった管状の切片を長軸方向に二つに切断し、シート状の切片にする。これをピペットを使ってスライドガラスに載せ、切片はすべて液胞側が上を向くようにピンセットで調製し、カバーガラスをかける。そしてカバーガラスの一方の端に封入剤を置き、反対側の端からろ紙でカバーガラス内の溶液を吸い取ることで封入剤に置換し封入する。封入剤としては退色防止剤である0.1% *p*-phenylenediamine (W/V)を含むグリセロール溶液(無蛍光グリセリンとPBS-BSAを1:1で混合)を用いている。

試薬の調製

* PBS: NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Na_2HPO_4 0.7g, KH_2PO_4 0.2g, (pH7.4)を純水に溶かし、1lにメスアップする(10x sol.を作製しておくとう便利である)。もしくは137 mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 8mM Na_2HPO_4 (PH7.3)に0.1% (W/V)の NaN_3 を含む溶液。

* PBS-BSA: PBS溶液に0.1%の(W/V)フラクシオンVの牛血清アルブミンを含む溶液。

* poly-L-lysine coated cover glass: 洗剤できれいに洗浄し純水でリンスした後に、乾熱処理(200℃、2-3時間)したカバーガラスに0.1-1.0mg/mLのpoly-L-lysine水溶液を1滴落し全面に広げ、濾紙で吸い取った後に風乾させる。poly-L-lysine水溶液はエッペンドルフチューブに1mlずつ小分けし-20℃で保存する。

* PHEM buffer: PIPES 60mM, HEPES 25mM, EGTA 10mM, MgCl_2 2mM, pH7.4. 10x sol.を作製しておくとう便利である。10x solの溶液を100 ml作製する際には、100 mlのビーカーにあらかじめ純水50 ml程度入れておき、さらにNaOHの顆粒を数十粒入れ、スターラーで攪拌しながら、それぞれの試薬を加える(PIPESやEGTAは溶液のpH5.5-6.0付近で溶ける)。最初は溶けずに白濁しているが、pHメーターで計りながらさらにすこしずつNaOHの顆粒を加え、最終的にpHを7.4に合わせ、メスアップして100 mlとする)

* 酵素液 (3% abalone acetone powder (SIGMA: アワビ

消化管のアセトン粉末), 2% cellulase Onozuka R-10 (YAKULT HONSHA), 3% BSA, 0.1mM PMSF (phenylmethansulfonyl fluoride) in PBS) : PBS に 3% abalone acetone powder, 2% cellulase Onozuka R-10, 3% BSA を加え, 氷冷しながらスターラーで攪拌し, ミラクロスでろ過した後に冷却遠心機で 12,000rpm, 30分遠心する。上清を酵素液として使用する。

参考文献

- Aruga, H., Motomura, T. and Ichimura, T. 1997. A proteolytic enzyme, trypsin, for immunofluorescence observation of microtubules in algal cells. *Phycol. Res.* 45:141-144.
- Galway, M. E. and Hardham, A. R. 1986. Microtubule reorganization, cell wall synthesis and establishment of the axis of elongation in regenerating protoplasts of the alga *Mougeotia*. *Protoplasma* 135:130-143.
- Menzel, D. and Schliwa M. 1986. Motility in the siphonous green alga *Bryopsis*. I. Spatial organization of the cytoskeleton and organelle movements. *Eur. J. Cell Biol.* 40:275-285.
- Osborn, M. and Weber, K. 1982. Immunofluorescence and immunocytochemical procedures with affinity purified antibodies: tubulin-containing structure. In Wilson, L. (Ed). *Methods in Cell Biology*, Vol.24. Academic Press, New York, pp.97-132.
- Sonobe, S. and Shibaoka, H. 1989. Cortical fine actin filaments in higher plant cells visualized by rhodamine-phalloidin after pretreatment with m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester. *Protoplasma* 148:80-86.
- Tatewaki, M. and Nagata, K. 1970. Surviving protoplasts in vitro and their development in *Bryopsis*. *J. Phycol.* 6: 401-103.

