# 超高圧電子顕微鏡 共同利用実験報告

# 超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告

# 〔目次〕

1.	Onchidium sp. 幼動物の外套にみられる眼外光受容(皮膚光覚)細胞の超高圧電顕観察による立体再構築	
	(片桐展子ほか)	148
2.	超高圧電子顕微鏡による有機化合物微粒子の結晶構造解析	
	(大野 完ほか)	148
3.	アクチンの微小クリスタルの電子線回折像	
	(一海孝光ほか)	149
4.	ギャップ結合で連結した網膜ニューロンの樹状突起の構造	
	(日高 聰ほか)	150
5.	Leupeptin 投与後のラット肝細胞における細胞質貪食機構の研究	
	(野田 亨ほか)	151
6.	超高圧電子顕微鏡を用いた神経細胞の三次元的形態解析	
	(小澤一史ほか)	152
7.	嗅球ニューロンの定量的三次元構造解析	
	(樋田一徳ほか)	152
8.	小脳変性症マウスにおける小脳プルキンエ細胞形態変化の超微細3次元的観察	
	(RHYU, Im-Joo ほカゝ)	153
9.	星状グリア細胞突起の CT 解析	
	(M. Ellisman ほか)	154
10.	プロトプラストの融合過程におけるネットワーク形成	
	(谷口美恵子ほか)	154
11.	マウスとラットにおける樹状突起スパインの頻度および大きさの比較	
	(濱 清)	155
12.	翼手類唾液腺線条部導管細胞の portasome の構造と分布	
	(村上政隆ほか)	155

# 1. Onchidium sp. 幼動物の外套にみられる眼外光受容(皮膚光覚)細胞の 超高圧電顕観察による立体再構築

片桐展子(東京女子医科大学・総合研究所・研究部) 片桐康雄(東京女子医科大学・看護学部) 重松康秀,小坂誠一(東京女子医科大学・総合研究所・共同利用施設) 有井達夫

イソアワモチ類(軟体動物・腹足類)の外套背面は多 数の大小の疣状突起で覆われる。小さな陰影を外套に与 えるとその陰影下に局所的な収縮が起こる。陰影反応は 外套から切り離した小突起でも生ずることから,外套の 皮下組織に分布する眼外光受容器;皮膚光覚(DP)細胞 (Katagiri et al 1990)からの光情報が筋細胞(MF)に伝え られ MF の収縮によると考えられる。幼動物の外套は成 体より疣状突起が少ないが,多数の MF が小突起を含め 結合組織内を諸方向に走行する。これまでに外套の皮下 組織に大形で特異な星形の MF を認めその全容を明らか にした。特異な星形 MF から延びる多数の突起に囲まれ た領域内に DP 細胞を認めたのでその全容を観察・立体 再構築し,星形 MF との関係や陰影反応への関与を探っ た。

材料と方法:生理研年報(22, 2001)参照。

結果と考察: 星形 MF から延びる長い突起が囲む領域 に2個の DP 細胞が存在,両者には成熟度に差異があっ た。DP 細胞は発達した微絨毛とオスミウム染色で黒染 する photic vesicles(PV)が細胞質内に充満するのが特徴 である。DP1 細胞はほぼ球形で細胞質に PV を多量に含 む。核は成体では複雑な切り込みが見られるのに対して 楕円形を呈した。DP2 細胞はまだ未成熟な微細構造を示 し、微絨毛は発達途上にあり細胞質が少なく PV も少な い。立体構築像から得られた DP 細胞のサイズと細胞の 全容量に対する微絨毛と核の占める割合は、DP1 細胞 (474 μ m<sup>3</sup>) では微絨毛 35%, 核 32%で, DP2 細胞 (280 μm<sup>3</sup>) では微絨毛 16%, 核 51%であり, 成熟するにつ れて微絨毛の占める割合が増加,未熟な細胞では細胞質 が少なく核が大きかった。DP1 細胞の軸索は微絨毛の基 部から成体におけると同様に延びるが、DP2細胞の軸索 は細胞質の突起のようである。いずれの軸索も DP 細胞 に近接して走行する小神経束に入る。小神経束は星形M Fの突起の囲む領域内にある太い神経束に合流する。太 い神経束内では DP 細胞の軸索と他の神経繊維との識別 は難しかった。星形 MF は多数の突起を延ばして他の星 形 MF の突起と接し全体として篭状のネットワークを成 して DP 細胞や神経束を囲む。星形 MF は光受容細胞で ある DP 細胞からの情報をもとに他の MF と連携して外 套上の疣状突起を局所的に収縮させると推測される。

#### 2. 超高圧電子顕微鏡による有機化合物微粒子の結晶構造解析

ガス中蒸発法によって作成した有機物微粒子を超高圧 電子顕微鏡で観察した。試料は芳香族炭化水素のコロ ネン(C<sub>24</sub>H<sub>12</sub>)微粒子である。昨年度まで主に用いたペリ レン (C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>) 微粒子[1,2]と同様,結晶構造は単斜晶で あるが,晶癖はペリレン微粒子の板状に対し,コロネン 微粒子は針状結晶が多く作成される[2]。融点はペリレン の約 270℃に対しコロネンが約 440℃と有機物の中でも 大野 完,仙石昌也(愛知医科大学) 有井達夫

非常に安定な物質であり,有機物の構造解析を行うには 比較的容易であると考えたが,予想に反して観察は困難 であり,当初は格子像が確認できなかった[2]。

今回,観察に成功したコロネン微粒子は不活性ガスを Ar,ガス圧を10Torr,試料の蒸発温度を240~260℃の条件 で作成した。作成された微粒子のモルフォロジーは,幅 が数十 nm,長さが数 µm の針状結晶が多くみられた。図 1 はその代表的な微粒子の格子像である。格子編は長軸 に対して平行な方向しか現れず,その格子間隔は約 1.02 ~1.04nm であった。結晶構造のデータベースである ASTM カードによると,回折が現れる最も大きな結晶方 位の面間隔はコロネンの場合約 0.95nm であり,これまで に知られているものとは異なる結晶構造を持つ微粒子が 作成された可能性がある。しかしながら,データ数が不 足しているため,他の分析方法でも解析を行い,今後も 引き続き実験を行って確認する必要があると思われる。

#### 参考文献

- 大野 完,仙石昌也,有井達夫:岡崎国立共同研究 機構 生理学研究所年報 第 21 巻 pp.150-151
- 大野 完,仙石昌也,有井達夫:岡崎国立共同研究 機構 生理学研究所年報 第 22 巻 pp.146-147



図1ガス中蒸発法によるコロネン微粒子の格子像(at 1,000 k V)

#### 3. アクチンの微小クリスタルの電子線回折像

低い塩濃度のアクチン溶液にモル比で過剰な ATP を 加えるとアクチンのフィラメントが出来る。このフィラ メントは会合して微小なクリスタルを作る。我々は微小 クリスタルの構造の特徴を明らかにしようと仕事を進 めてきた。厚みのある3次元クリスタルの電子線回折に は超高圧電子顕微鏡(HVEM)が適している。一般的な低 圧の電子顕微鏡では電子線の透過力が十分でない。 HVEM の電子線なら透過することができる。高角での反 射スポットは 2Å辺りまで観測できるが困難な問題もあ る。それは低角散乱領域での回折スポットが弱いことで ある。アクチンの場合にはシート状のクリスタルが層状 に重なっている可能性が高いが(1), HVEM の場合低角 散乱の領域で十分なコントラストの回折スポットが出 にくいと思われる。そこでごく薄いカタラーゼクリスタ ルを用いてこの回折像の反射角度への依存の様子を観 測しておき、このモデルとアクチンフィラメントのクリ スタルの回折像とを比較しながら解析を進めることに した。これにより、観測した回折像が目的のクリスタル からのものかどうかの判断がやり易くなると思う。そこ で, 市販のカタラーゼを 10%の NaCl に溶かした後に,

一海孝光(愛知県立芸術大学) 有井達夫

水に透析して得られるごく薄いクリスタルを用いて HVEMの生じる回折像を観測した。約6nmの格子が観 察された。回折像においては,狭い領域からの回折像を 撮ってみると比較的短い間隔に相当する回折斑点が見 られたが,それとともに,その間がストリークでつな がっているのも観察された。この結果は,部分的にカタ ラーゼの構造を反映すると考えられる。低角においては, 構造を反映する回折斑点が観察されていないためさら に検討中である。

以上述べたように HVEM では染色しなくてもカタ ラーゼクリスタルの実像や回折像を得ることができた。 従って,この方法によれば染色物質が引き起こす様々の アーティファクトへの心配を除くことができる。次に考 慮しなければならないのは照射損傷である。低圧の電子 顕微鏡によるタンパクのクリスタルの観察では照射損 傷が大きな問題となるが,HVEMの観察においては厚い クリスタルを観測できることから照射損傷が通常の場 合よりは少なくなる可能性がある。さらに HVEM ではイ メージングプレートが使用でき,照射量を少なくしても 感度よく回折像を捉えることができる。このような特性 を持つ HVEM を用いて現在アクチンフィラメントのク リスタルの観察を継続している。 (1) 生物物理 42 巻 S41 [2002] 一海孝光, 有井達夫 ア クチン微小クリスタルの超高圧電子線回折

# 4. ギャップ結合で連結した網膜ニューロンの樹状突起の構造

光受容神経組織である網膜のニューロンの二次元的な 配列様式は各々のタイプによって異なっており,それら の分布の解明は光情報処理の神経機構の解析にとって重 要である。これまでに,双極細胞,アマクリン細胞及び 神経節細胞が同一タイプの間で特定のモザイクを呈しな がらギャップ結合で連結していることを明らかにした。 我々は,電気生理学的手法によってニューロンの活動を 解析した後に,神経活動をギャップ結合で連結した神経 突起の形態と相関して,各タイプに特徴的なギャップ結 合の視覚機能上の意義を調べている。電気生理学的に同 定した網膜ニューロンを細胞内標識し,超高圧電子顕微 鏡を用いて,厚さ数 μmの樹脂包埋切片を解析すること によってギャップ結合で連結した神経突起の三次元形態 を解明することが本研究の目的である。

視覚生理学的に調べて来た網膜神経節細胞について, 平成13年度は引き続き,ラット網膜を用いて解析した。 成熟Wistar系ラットから剥離した全載網膜標本を用いて 核染色色素 DAPIで標識したα-神経節細胞を形態学的に 同定し,37℃でO<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>を供給したAMES'溶液で潅流し ながら微小電極法またはパッチクランプ法によって電流 注入に対するスパイク列応答を解析した後に,電極内に 充填したルシファー黄とビオチン複合物を用いて細胞内 注入法によって細胞を標識した。ビオチン複合物 (Neurobiotin, Vector)を注入した標本の電子顕微鏡解析 のための処理(日高と橋本,1993)を経て,光学顕微鏡に よって注入細胞と周囲の標識細胞との接触突起を同定し た後,エポン樹脂包埋した標本から,1-5 µm の厚さの網 膜切片を作成し,ギャップ結合で連結した樹状突起の3 次元構造を超高圧電子顕微鏡で1,000 kV で解析した。

電気生理学的に解析した神経節細胞の形態をルシフ アー黄の標識から alpha-神経節細胞として同定した。組 織化学反応(日高と橋本,1993)によって注入した 日 高 聰 (藤田保健衛生大・医・生理)

Neurobiotin の局在を検出し、注入細胞から回りの同型の 細胞へ tracer coupling を示した標本を超高圧電子顕微鏡 解析に用いた。光学顕微鏡下での観察から、Neurobiotin で標識された隣接する alpha-神経節細胞の樹状突起の先 端同士の間で直接の接触の可能性があると観察された標 本を,厚さ3 µmの網膜水平断の連続切片を用いて超高 圧電子顕微鏡で解析し,光学顕微鏡での観察と超高圧電 子顕微鏡での解析の対応を試みた。光学顕微鏡で見られ た樹状突起の先端同士の間の接触の所に、厚切り切片の 超高圧電子顕微鏡での解析から、確かに樹状突起間の結 合が認められた (Fig. 1A)。そこには電子密度の高い close membrane apposition が観察され、隣接する網膜神経節細 胞の樹状突起間にギャップ結合の存在が考えられた。超 薄切片での解析から, Neurobiotin で標識された隣接する alpha-神経節細胞の樹状突起間で形態学的に認められる ギャップ結合を同定した (Fig. 1B)。最近, 我々は Wistar 系ラット網膜の神経節細胞がギャップ結合チャネル蛋 白・コネキシン 36 を発現していることを明らかにした (Hidaka 等, 2002)。今回の超高圧電子顕微鏡解析で同定 した隣接する網膜神経節細胞間のギャップ結合の存在は, コネキシン36の細胞発現に対応し、また、神経節細胞間 のギャップ結合にコネキシン 36 チャネルが局在してい ることが示唆された。網膜神経節細胞でのコネキシン36 の発現と細胞間でのギャップ結合の形成の視覚機能を電 気生理学的に解析している。

#### [文献]

日高 聰, 橋本葉子 (1993) ビオチン複合物 (biocytin, Neurobiotin) 注入による細胞内標識法と神経系解析への 応用. 日本生理誌 55:241-254.

Hidaka, S., Kato, T. and Miyachi, E.-I. (2002) Expression of gap junction protein connexin36 in adult rat retinal ganglion cells. J. Int. Neuroscience, Vol 1, pp 3-22.



Fig. 1. Direct gap junction connections between retinal ganglion cells, revealed by high voltage (A) and conventional electron microscopy (B). [A], A close membrane apposition (arrowheads) between Neurobiotin-labeled peripheral dendrites of the tracer-coupled rat alpha-retinal ganglion cells, observed at 1,000 kV in a tangential 3 µm section in thickness. Note that gap junctions occur at dendritic tips. [B], A gap junction between labeled peripheral dendritic tips of the coupled alpha-retinal ganglion cells, revealed by conventional electron microscopy at 75 kV in an ultrathin section. Scale bars: 10 µm for A, and 200 nm for B.

# 5. Leupeptin 投与後のラット肝細胞における細胞質貪食機構の研究

これまで leupeptin 投与後のラット肝細胞は自己貪食を 示す実験モデルとして研究されていた。しかし,厳密な 意味でこのモデルが真の自己貪食胞を表わすものである か,またその形成膜がこれまで提唱されてきた小胞体膜 であるか否かを改めて検証した。

ラットに leupeptin を 2mg/100gの量で投与し,投与後 20分後に肝を還流固定した。対照群には薬剤を投与しな い正常ラットの肝を用いた。それぞれから採取した組織 を形態観察用試料とフェリシアン化カリウム・オスミウ ム法で形質膜を高電子密度に標識した試料の2種類を作 製し,それぞれを電顕で観察した。

薬剤投与後の肝細胞には自己貪食胞様構造が現れたが, それらの多くは形質膜の近くに比較的多く分布していた。 形質膜直下には一部,滑面化した小胞体が存在していた。 また自己貪食胞様構造にはしばしば粗面小胞体から延び るリボゾームを欠いた層板が一体化しているものも認め られた。稀に形質膜の一部が細胞質内にのび,自らの細 胞質を取り囲むものも観察された。

フェリシアン化カリウム・オスミウム法で形質膜を高

野田 亨 (京都大学大学院医学研究科生体構造医学講座)

電子密度に染めだした試料の厚切り切片を作製し,超高 圧電顕で形質膜の形状を観察したところ,正常ラットで は一部で指状陥入様の構造ををとるが,その他の部位は 直線的な細胞境界を示した。Leupeptin 投与後のものでは 形質膜が球状にどちらか一方の細胞の細胞質へ突出する ものが正常組織に比較して増加しており,また直接形質 膜との連絡が捉えられないが,形質膜に沿って分布する 自己貪食胞様構造の限界膜も高電子密度に染めだされた。 しかし,形質膜よりやや内部の細胞質に分布する自己貪 食胞様構造には高電子密度の反応産物は認めなかった。

以上の結果より, leupeptin に誘起された自己貪食胞と これまで呼ばれていたものの中には隣接する細胞質を細 胞内に取り込み,消化する特殊な異物貪食胞,および形 質膜の陥入により形成される自己貪食胞などが含まれて いる可能性が高まった。これらの貪食胞の限界膜は小胞 体ではなく,形質膜である。ところが,小胞体由来の層 板が自己貪食胞様構造と一体化しているものも観察され ていることから,小胞体由来の限界膜をもつ自己貪食胞 の出現も否定できない。しかし,これらの構造の中には

#### 6. 超高圧電子顕微鏡を用いた神経細胞の三次元的形態解析

小澤一史, 謝 藏霞, 河田光博(京都府立医科大学第一解剖学教室)

本研究は、超高圧電子顕微鏡の高解像力とステレオ観 察効果を利用し、種々環境下,特に老化や血中循環ステ ロイドホルモン濃度の変化に伴う脳の神経細胞の超微細 構造変化について三次元的に描出,形態学的,定量的に 計測を行うことを目的とした。通常の透過型電子顕微鏡 による観察から、様々な細胞体内の変化やシナプスの変 化等が認められたが、特に軸策や樹状突起の変化につい ては二次元的観察の限界があり、充分な情報が得られな いでいた。しかし、超高圧電子顕微鏡を用いて、ゴルジ 渡銀染色を行った試料をステレオ観察することにより, 特に樹状突起及びその棘 (spines) の変化をダイナミック に捉えることが出来た。大脳皮質や海馬領域の神経細胞 では、若い動物(2ヶ月齢のラット)では高い密度でき ちんとしたヘッドとテイルを有する樹状突起の棘が鮮や かに観察されるのに対して、老化動物(24ヶ月齢のラッ ト)ではこれらの密度が低下し、また棘の形態が萎縮す るような像が観察され、老化に伴う変動が顕著に観察さ れた。また,ステロイドホルモン受容体を有する神経細 胞では、これらのホルモンの変動に対応すべく、形態変 動が起こることが示唆されている。例えば、性周期に伴 うエストロゲン変動によって,エストロゲン受容体が発 現する神経細胞の樹状突起の形態変化が示唆され、報告 されている。これらの現象を、より立体的にかつ詳細に 観察する目的で、超高圧電子顕微鏡を用いて、様々なス テロイドホルモンの変化、例えば性腺摘出による性ホル モン欠如状態や副腎摘出によるコルチコステロイドの欠

如状態、あるいは欠落させたホルモンの補充による神経 細胞への影響について、現在、さらに観察を続けている。



図1 2ヶ月齢ラットの大脳皮質神経細胞樹状突起のステ レオ像



図2 24ヶ月齢ラットの大脳皮質神経細胞樹状突起のス テレオ像

# 7. 嗅球ニューロンの定量的三次元構造解析

桶田一徳(徳島大学医学部)

嗅覚の一次中枢・嗅球内の糸球体は、特定な匂い刺激 に特異的に反応し, 嗅覚の機能的構造単位として注目さ れている。この糸球体には嗅受容細胞(入力)と投射ニ ューロン (高次中枢への出力) がシナプス結合をするが,

これには多様な局所ニューロンが介在しシナプス結合 する。

本研究は,超高圧電子顕微鏡 H1250M の 1000kV の加 速電圧による高解像力を利用し, 嗅球・糸球体層の介在 ニューロンの複雑な樹状突起網の三次元構造を明らか にすることを目的とし,特に今年度は複雑な糸球体内樹 状突起網を構成する tyrosine hydroxylase (TH)免疫陽性 介在ニューロンに焦点を絞り解析を行なったものであ る。

方法は昨年度に引き続き,抗 TH 抗体,ビオチン化 2 次抗体, および蛍光と 1.4nm 金コロイド同時標識 Streptavidin を用い染色し,共焦点レーザー顕微鏡によっ て観察後,これに銀増感 DAB 発色を応用して TH ニ ューロンを選択的に標識した。エポン包埋後これを最終 的に 5μm 厚の切片に薄切し,超高圧電子顕微鏡にて立体 解析を行なった。

TH ニューロンは主にして糸球体に局在する傍糸球体 介在ニューロンであるが、一部はより大型の投射ニュー ロンタイプが糸球体層から外網状層(表層)にかけて存 在する(図1)。超高圧電子顕微鏡により、糸球体内の樹 状突起は径1µmを超える比較的太い樹状突起と、径1µm



図 1 ラット嗅球の糸球体層よりの外網状層に見られる TH ニューロン。Bar; 20 µ m。

以下の細い突起が互いに絡み合っているのが観察され る。このうち太い突起は分枝構造が少なく直線的に走行 しているのが特徴的である。一方細い突起は比較的多く の分枝構造を有し,時に数珠玉状に波打った構造を呈し ているのが特徴的であった(図 2)。以前観察を行った calbindin 免疫陽性介在ニューロンのように樹状突起が糸 球体内の特定の領域に限局して分布することなく,両タ イプの突起共より広範な領域に突起を伸長しているこ とが明らかとなった。現在,これらの2種類の突起構造 が単一のニューロンの異なる部位か,あるいは異なる種 類のニューロンによるものかを識別し,更にシナプス結 合の解析との対応を試みている。

TH ニューロンのように複雑な樹状突起網の個々の突 起構造については共焦点レーザー顕微鏡の解像力の限 界を超え,その詳細は明らかになっていない。このため 超高圧電子顕微鏡による高解像力が期待され,今後連続 切片による立体解析も計画している。



 図2 ラット嗅球糸球体内における TH ニューロンの樹 状突起構造。Bar; 20 µ m。

# 8. 小脳変性症マウスにおける小脳プルキンエ細胞形態変化の超微細3次元的観察

RHYU, Im-Joo (Korea 大学医学部) 有井達夫, 井本 敬二

The rolling mouse Nagoya (tgrol/tgrol) is a spontaneous P/Q-type calcium channel mutant, which is suggested as an animal model for human neurologic disease such as autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6), familial hemiplegic migraine, and episodic ataxia type-2. Morphology

of the spines is reported to reflect functional status of the neurons. To understand the functional status of Purkinje cell in calcium channel insufficiency, dendritic spines were analyzed quantitatively.

After rapid Golgi preparations of the rolling and wild

cerebellum, the blocks were embedded in Epon-Araldite mixture. 4-µm sections were cut and observed with high voltage electron microscopy operated at 1,000 kV. Dendritic spine density and length of the spine were measured with NIH image.

Many spines emanating from the proximal dendrites in

rolling mice were observed. The average spine density was  $2.12 \pm 0.18/10 \ \mu\text{m}$  in wild and  $1.78 \pm 0.22/10 \ \mu\text{m}$  in rolling. The average length of the spines was  $1.12 \pm 0.21 \ \mu\text{m}$  in wild and  $0.82 \pm 0.21 \ \mu\text{m}$  in rolling. The density and height of the spines were significantly decreased in rolling Purkinje cells (p < 0.01).

## 9. 星状グリア細胞突起の CT 解析

濱 清

M. Ellisman, M. Martone, N. Yamada (Univ. Calif. NCMIR)

我々は高い電子線透過能と、5 ミクロンを越える生物 試料でも4-5ナノメターの解像力が期待できる1,000kV 超高圧電子顕微鏡の特性を利用して、主として Golgi 染 色を行ったラット CNS における星状グリア細胞突起の 3 次元立体計測を行っている。

海馬及び,大脳皮質で球形の細胞枝ドメインを形成す る細胞質性星状グリア細胞の突起を3ミクロンの切片を 用いて,CTを行った(例えば図1)。

超高圧電顕を用いて-60 度から+60 度まで 2 度間隔 で連続傾斜撮影を行い、トモグラフイー解析を行ってい る。CT 三次元再構成には、UCSD、NCMIR によるソフ トを用いている。さらに、再構成画像の表示や表面積な どの計測には、Mayo 財団による analyze7.5.5 ソフトウェ アを、用いた。体積/表面積の値は、19-33/μm と、大き な値を取ることが明らかとなった。

<u>и</u> +8° -8°

図1 グリア細胞の CT 解析による像から求めた再構成 ステレオ像(交差視)

# 10. プロトプラストの融合過程におけるネットワーク形成

谷口美恵子, 鈴木繁二, 広瀬貴士 (名古屋大学工学研究科)

植物培養細胞に、パルス電場をかけると細胞融合が、 おこる。 AC 電場で、細胞同士が接合し、DC 電場で 融合が、開始する。この過程で、アクチンフィラメン トが、ネットワークを形成し、細胞融合に必要な構造を、 構築する。今回は、アクチンフィラメントを結びつけて いるジョイント分子の構造を、より高分解能でとらえる ことを目的としている。超高圧電顕の持つ深い焦点深度 は、比較的厚い試料に有効に作用する。 ダイズ及びレタスを, 明・暗室で, 培養し, プロトプラ ストを, 調整する。これに, AC 及び DC 電場をかけて, 細胞融合を, 起こさせ固定包埋した切片試料を作成して, 超高圧電子顕微鏡を用いて, 切片試料を, 室温でまたは 液体窒素温度まで冷却して, ステレオ観察することによ り, アクチンフィラメントに結合しているミオシン様分 子の構造を, 明らかにしようと試みているところである。 また, このほかに, ミオシン単分子の運動に関連して

# 11. マウスとラットにおける樹状突起スパインの頻度および大きさの比較

#### 濱 清

中枢神経細胞にとって主な興奮性入力の場であるスパ インは、興奮伝達効率の調節とシナプス可塑性に重要な 関わりを持っている。そこで光顕による形態の解析が行 われてきたが、光顕では分解能の限界があり、真の値を 求めることが困難である。そこで超高圧電顕を用いて、 厚い試料を立体観察し、解析することにより、定量的な 値を求める方法を用いて種による変化を明らかにするこ とを目的にしている。これまでのラットにおける樹上突 起スパインの頻度の値は,既に報告しているように,細 胞の核に近いところでは,(3.4±0.4)個/µm 核から離れた 位置で(2.0±0.3 個)/µm である。このときのスパインの 表面積と樹状突起の表面積にも一定の関係がある。マウ スにおいては,これらの値が,どのように変化するかを 定量的に求める方向で,研究を進めている。

# 12. 翼手類唾液腺線条部導管細胞の portasome の構造と分布

村上政隆

Bernard Tandler, Carlton J. Phillips (州立テキサステック大学環境健康研究所,理学部生物学)

昆虫幼虫の中腸で栄養物吸収の第一段階を担う膜輸送 体蛋白のひとつ H<sup>+</sup> V-ATPase の V1 subunit が microvilli 細胞膜直下に存在する約10nmの粒子 portasome に局在す ることが見い出された。この portasome の存在は無脊椎 動物あるいはカメで知られているが、哺乳類については 知られていなかった。最近果物を餌とする種々の翼手類 (コウモリ)の唾液腺線条部導管細胞にこの portasome が 多量に見い出された。一般に唾液腺線条部導管細胞は、 Na 再吸収 K 分泌機能をもち、ATPase 活性が高く、H<sup>+</sup>ポン プをもつといわれてきたが, portasome の形態/分布と機 能発現の関連は不明である。平成13年度,超高圧電顕を 用い,厚い試料を立体観察し,線条部導管細胞における portasomeの構造と細胞内分布を立体的に観察し,輸送機 能との関連を解析する目的で,計画を申請採択されたが, 残念なことに9月11日の同時多発テロ事件により,共同 研究者の来日が延期され,本研究の実施は不可能となっ た。

## 《超高圧電子顕微鏡共同利用実験での業績リスト》

#### A) 英文原著論文

- Noda T, Fujimoto K, Ide C (2001) Annulate lamellae are interconnected by three distinct cisternal structures. Acta Histochem. Cytochem. 34, 103-110.
- Nagata, T (2001) Three-dimensional high voltage electron microscopy of thick biological specimens. Micron 32, 387-404.
- 3) Murakawa R, Kosaka, T (2001) Structural features of

mossy cells in the hamster dentate gyrus, with special references to somatic thorny excrescences. J. Comp. Neurol. 429, 113-126.

 Kosaka K, Aika Y, Toida K, Kosaka T (2001) Structure of intraglomerular dendritic tufts of mitral cells and their contacts with olfactory nerve terminals and calbindin-immunoreactive type 2 periglomerular neurons. J. Comp. Neurol. 440, 219-235.

- Saito Y, Katsumaru H, Wilson C J, Murakami F (2001) Light and electron microscopic study of corticorubral synapses in adult cat: evidence for extensive synaptic remodeling during postnatal development. J. Comp. Neurol. 440, 236-244.
- B) 学会発表
- 片桐展子,重松康秀,片桐康雄(2001.2)無脊椎動物(腹足類)の外套組織に分布する筋繊維の三次元形態解析。第323回東京女子医科大学学会例会(東京)
- 日高 聰,宮地栄一(2001.3)神経系で発現するギャップ結合チャネル蛋白・コネキシンの解析。第78回日本生理学会大会(京都)
- Toida K(2001.4) Cathecolaminergic Neurons in the Olfactory Bulb. The 9th Intern. Catecholamine Symposium (Joint Congress with "The 5th Intern. Conf. Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease") (Kyoto)
- 小澤一史,謝 蔵霞,落合育雄,河田光博(2001.4) 超高圧電子顕微鏡による老齢ラット脳の神経細胞の 超微細構造。第 106 回日本解剖学会全国学術集会 (南国)

- 5) 片桐展子,重松康秀,有井達夫,片桐康雄 (2001.5) 腹足類の外套組織にみられる筋繊維の超高圧電顕観 察とその立体再構築。日本電子顕微鏡学会第 57 回学 術講演会(福岡)
- 6) 樋田一徳 (2001.5) 共焦点レーザー顕微鏡を組みあ わせた電子顕微鏡連続切片再構築法による嗅球ニ ューロン構成の三次元構造解析。日本電子顕微鏡学 会第 57 回学術講演会(福岡)
- Hama K (2001.5) High voltage electron microscope in cell and tissue research. Korea Elect Micros Soc.(Korea)
- 8) 小澤一史,謝 蔵霞,落合育雄,秋山翹一,有井達 夫,河田光博(2001.9) 超高圧電子顕微鏡を用いた 老化ラットの海馬および大脳皮質領域における神経 細胞の超微細構造観察。第24回日本神経科学および 第44回日本神経化学合同大会(京都)
- 9) 片桐展子,重松康秀,有井達夫,片桐康雄(2001.10) イ ソアワモチ幼動物の皮膚光覚細胞と特異な星形筋細 胞の超高圧電顕観察。第72回日本動物学会大会(福 岡)
- Toida K (2001.12) Neuronal organization in the rat olfactory bulb. The 6th Japan-China Joint Meeting on Histochemistry and Cytochemistry (第 42 回日本組織細 胞化学会総会・学術集会兼催)(東京)