

自然科学総合実験レポート

課題10「細胞」

[個人情報保護の観点から削除]

[個人情報保護の観点から削除]

表: 正規の授業を受講した

裏: 正規の授業を受講した

1 実験の目的

多細胞生物の個体の複雑な体を構成する最小単位は細胞であり、同一の機能をもつ細胞が集まって組織を、様々な組織が集まって器官を、そして様々な器官が集まって個体を形作る。細胞の構造を観察することは生命の営みを理解することに役立ち、細胞の構造や機能を化殺するために今までさまざまな顕微鏡が開発されてきた。近年では、行きている状態での構造を見たり、動的な変化を見たり、ある特定の構造や物質の存在場所を特定し解析したりできるようになっている。

このような背景から、本実験課題では真核細胞の一般的構造と機能の一端を学ぶために タマネギ (*Allium cepa* L.) の鱗茎から採取された表皮細胞を光学顕微鏡と蛍光顕微鏡で観察する。

2 実験の原理

今回、タマネギ (*Allium cepa* L.) の細胞を観察するにあたってメチルグリーン・ピロニン染色液を用いて染色を行った。この染色液にはメチルグリーンとピロニン Y という 2 種類の色素が含まれていて、前者は DNA を青緑色に、後者は核酸 (DNA および RNA) を赤色にそれぞれ染色する。核内には DNA がクロマチンという構造で折りたたまれて存在している。一方で RNA は核小体や細胞質に存在している。結果として、核内の DNA は両方の色素で染色されてやや灰色がかかった青紫色に見え、核小体と細胞質に存在する RNA はピロニン Y のみで赤く染色されることになる。

また、実験 3 では DAPI という蛍光色素と、DiOC₆ という蛍光色素を用いた。DAPI は 2 本鎖 DNA に特異的な蛍光色素として広く用いられている。DAPI は DNA 二重らせんの狭い溝にはまり込むように結合して紫外域の励起光によって青白い蛍光を発する。DiOC₆ はリン脂質からなる生体膜に親和性のある蛍光色素である。炭化水素部分が膜に挿入されるようにして結合し、環状の色素部分が疎水的な環境に置かれると強い緑色の蛍光を発する。使用する濃度によって細胞のさまざまな膜性の構造に特異性をもたせることができる。実験 3 ではミトコンドリアに特異的に結合する濃度で観察する。

3 実験方法

使用した実験器具: 正立型生物顕微鏡 (オリンパス CHT)、接眼マイクロメーター、柄付き針、ピンセット、カミソリの刃、黒鉛筆、カバーガラス、スライドガラス、水差し、ストップウォッチ、メチルグリーン・ピロニン染色キット、キムワイプ、DAPI 染色液、DiOC₆ 染色液、蛍光顕微鏡

3.1 実験 1 生きた細胞の観察

カミソリの刃とピンセットを用いて タマネギ (*Allium cepa* L.) の鱗茎から表皮細胞を採取し、スライドガラスに乗せて水に浸し、カバーガラスをかけてプレパラートを作成して 100 倍と 400 倍で観察した。時間が経つと試料が乾燥していくため、適宜カバーガラスの横から水差しで水を入れて観察した。観察結果はスケッチとして記録し、接眼マイクロメーターを用いて長さを計測してスケールバーを入れた。400 倍で観察する際には簡易暗視野観察も行い、細胞中の微粒子の動きについても観察した。

3.2 実験2 核の染色

実験1と同様にタマネギ (*Allium cepa* L.) の鱗茎から表皮細胞を採取した後、エタノールを1滴かけて2~3分間待つことで固定を行った。エタノールが残っていると染色に悪影響が出るため、表皮片の下に残ったエタノールも蒸発させた。その後、メチルグリーン・ピロニン溶液で染色して余分な色素溶液を吸い取り、水に浸して実験1と同じようにプレパラートを作成して観察した。観察の結果はスケッチとして記録し、スケールバーを入れた。

3.3 実験3 蛍光顕微鏡による観察

この実験はTAによるデモンストレーションであった。以下ではTAが行った操作について記す。

3.3.1 DAPI 染色

DAPI染色液で120分程度かけて染色された細胞を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。観察された様子はディスプレイに出力されていて、私達学生はそれを見た。

3.3.2 DiOC₆ 染色

DiOC₆染色液で5~10分程度かけて染色された細胞を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。観察された様子はディスプレイに出力されていて、私達学生はそれを見た。

4 結果

観察して得られたスケッチは別のページにまとめてある。

4.1 実験1

100倍で観察したところ、図1のように見え、400倍で観察したところ図2のように見えた。(なお、図2に関しては複数の細胞を観察した結果を1つの細胞にまとめて書いてある。) 400倍で観察する際に微動ねじを用いて焦点の合う高さをずらして観察を行い、核は球状の形をしていることが分かった。また、このとき、焦点の合う高さによって壁孔が鮮明に見えたりぼやけて見えたりした。また、簡易暗視野観察を用いて原形質流動の速度 ($\mu\text{m} / \text{s}$) を複数回測定したところ、表1の結果が得られた。液胞の場所は、簡易暗視野観察を行って、細胞内の微粒子が通らない領域として観察することができた。

表 1: 原形質流動の速度 ($\mu\text{m}/\text{s}$)

1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	7回目	8回目	9回目	平均
6.96	8.65	10.4	4.94	7.28	8.77	5.04	11.2	14.7	8.66

4.2 実験2

メチルグリーン・ピロニン溶液で染色して400倍で観察したところ、核と核小体は図3のように見えた。また、細胞全体は明視野観察で見ると図4のように見えた。細胞質の中に赤紫色の糸くずかあるように見えた。

4.3 実験3

DiOC₆によって染色された細胞を蛍光顕微鏡で観察すると、米粒のような形の微粒子が1つの細胞に複数個あって、一定の方向に動いている様子が確認できた。この微粒子は、上側と下側にピントを合わせたときにはハッキリと見えたが、中間にピントを合わせるとぼやけて見えた。

DAPIによって染色された細胞を蛍光顕微鏡で観察すると、核が丸く染まって見えたが、核の一部に円形の染色されていない領域がみられることもあった。また、核内で色が均一でない様子や、小さい粒が染色されて見える様子を観察することができた。

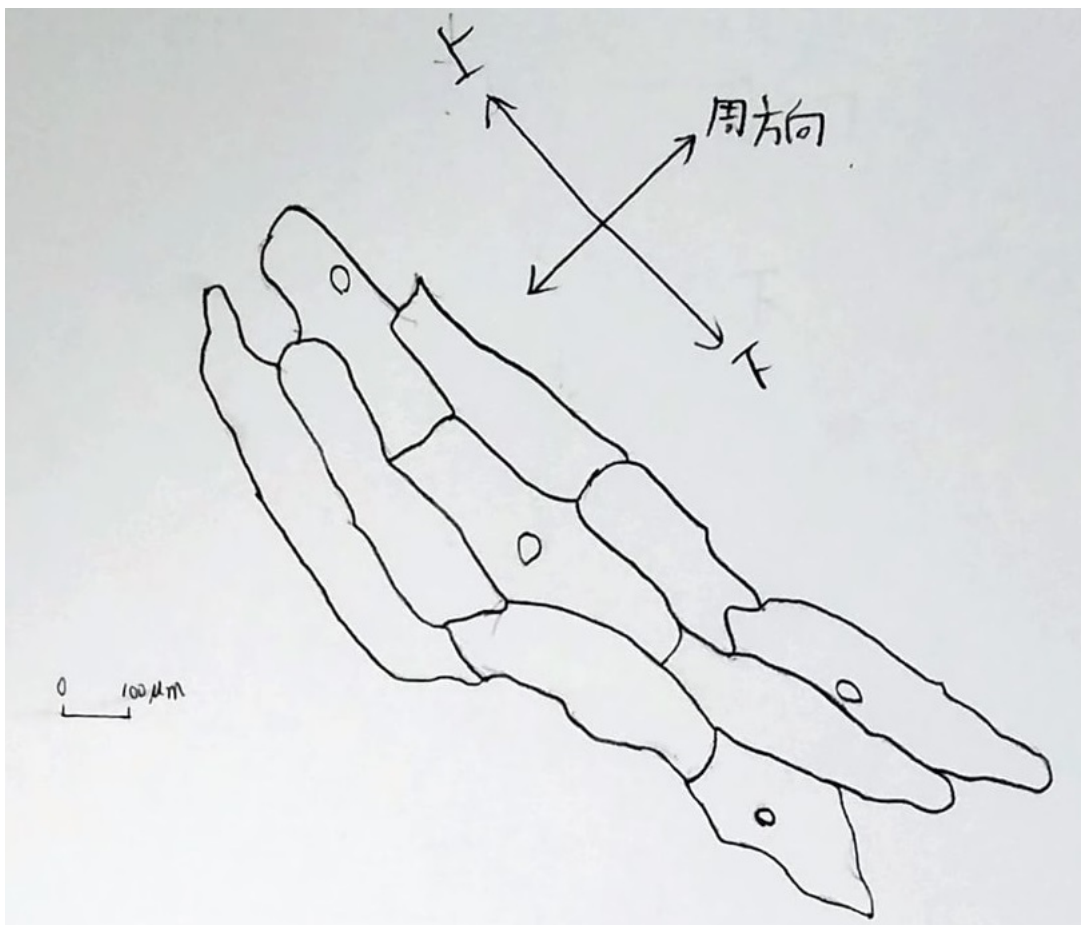


図 1: 100 倍で観察した細胞のようす 丸で描かれているのは核 (nucleus) である。

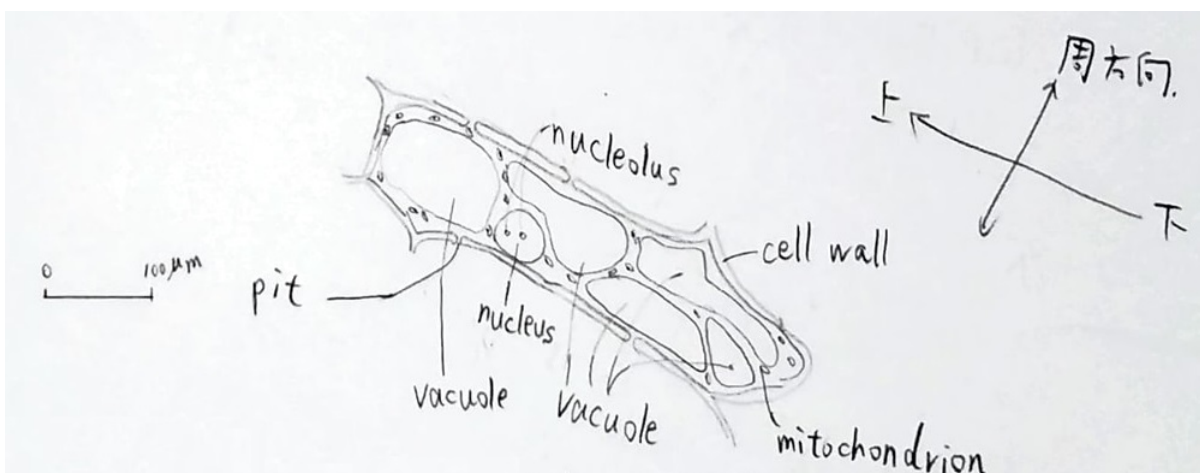


図 2: 400 倍で観察した細胞のようす。複数の細胞を観察した結果をまとめてある。

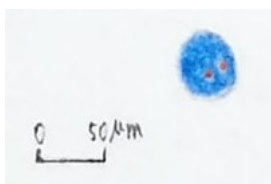


図 3: 染色した核と核小体 (400 倍)

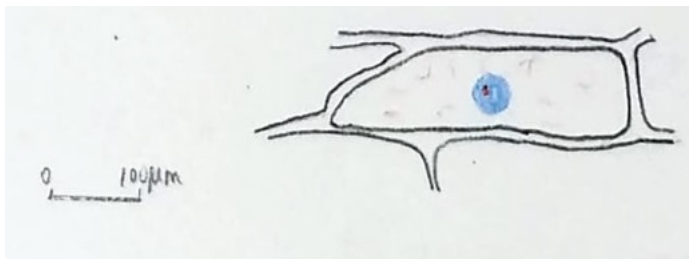


図 4: 明視野観察で見た染色された細胞 (400 倍)
細胞質の中に、赤紫色の糸くずが浮いているような見た目をしている。

5 考察(設問への回答)

図1から、タマネギ (*Allium cepa* L.) の鱗茎から採取された表皮細胞は、上下方向に長く周方向に短い長方形のような形状であることがわかる。このことから、タマネギ (*Allium cepa* L.) の鱗茎が成長する際は細胞が主に上下方向に伸びていくものであると考えられる。

また、メチルグリーン・ピロニン染色液の、DNA を青紫色に、RNA を赤紫色にそれぞれ染めるという性質と図4にみられる染色された細胞の様子から、細胞内でDNA 主に核に存在して、RNA は核小体のほかにも細胞質全体に存在することや、細胞質に存在するRNA は細長い形に見えることがわかる。DAPIを用いた観察の結果からは、DNA は核だけでなく細胞内にある微粒子にも存在すること、核小体にはDNA は存在しないことがわかる。DiOC₆を用いた観察の結果からは、DAPIを用いた観察や簡易暗視野観察で細胞内に見えた微粒子がミトコンドリアであることがわかる。つまり、核だけでなくミトコンドリアにもDNA は存在することがわかる。

実験3では、核内で色が均一ではないようすが観察できた。この原因には、たとえば核内で転写が行われていて、それに伴って核内でDNA が圧縮されて収納されているところが一部ほどけているということが考えられる。

DiOC₆を用いて観察した際に、微粒子(ミトコンドリア)が鮮明に見えるのは上側と下側にピントを合わせたときで中間にピントを合わせるとぼやけて見える様子が観察された。このことから、細胞内でミトコンドリアが存在するのは主に細胞の上側と下側(表面近く)で、中間には液胞があると考えられる。つまり、今回観察した表皮細胞の立体的な構造は、図5のようになっていると考えられる。また、簡易暗視野観察を行うと核の近くにもミトコンドリアがあるのが見えたこと、ミトコンドリアは酸素呼吸によってエネルギー源となるATPを生成すること、液胞の機能はふつうは貯蔵である[1]こと、DNAを複製する際にATPが加水分解される[2]ことを考えると、核は液胞の中ではなく細胞質に存在すると考えたほうが妥当であると考えられる。

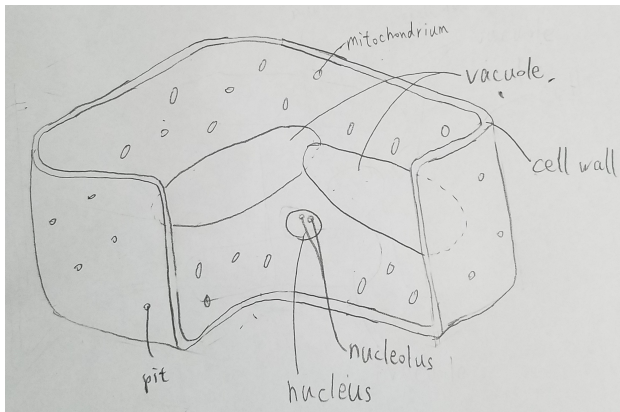


図5: 今回観察した細胞の断面(一部)を表した模式図。今回の観察でみられた構造を描きこんである。

原形質流動では、複数個のミトコンドリアが一定の方向に向かって移動している様子が観察できた。仮にミトコンドリア自身が運動している場合、様々な方向に運動することもあると考えられるが、今回はそのような様子は観察できなかった。したがって、ミトコンドリアは液流に乗って動いていると考えられる。

原形質流動の分子的メカニズムとそれを支えるエネルギーについて調べた結果を以下にまとめる。細胞骨格に沿って動くモータータンパク質が細胞内の細胞小器官や巨大分子の移動にかかわっていて [3]、多くのモータータンパク質は ATP を加水分解することで自らの構造を変化させて一方向へ進む力を生み出している [3]。また、輸送小胞も多くの場合は細胞骨格に沿って動くモータータンパク質によって能動的に輸送されている [4]。

ここまで調べたことから、原形質流動は細胞骨格に沿ってモータータンパク質が一定の方向に動くことで引き起こされ、ATP を加水分解することで得られるエネルギーによって支えられていると考えられる。

原形質流動と単純拡散を比較する。水溶液中での分子の拡散は、時間 Δt とその間に分子が動く平均二乗距離 $\overline{x^2}$ の関係として

$$\overline{x^2} = 2D\Delta t \quad (1)$$

のように記述できる (D は拡散定数で、 10^{-6} から $10^{-8}[\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}]$ 程度の値をとる)。

図 3 から細胞の上下方向の長さを求めると、およそ $446\mu\text{m} = 4.46 \times 10^{-4}\text{cm}$ である。式 5 で $\overline{x^2} = (4.46 \times 10^{-4})^2 \approx 1.99 \times 10^{-7}$ となるような Δt を考えると、 Δt は 9.95×10^{-2} から $9.95[\text{s}]$ 程度の値をとる。一方、原形質流動の場合は表 1 の平均値を用いて計算すると細胞の上下方向に端から端まで移動するのにおよそ $51.5[\text{s}]$ かかることになる。つまり今回観察した細胞では原形質流動に乗せて物質を運搬するよりも単純拡散を用いて物質を運搬したほうが速いということになる。ここで、先述したように原形質流動は細胞骨格に沿ってモータータンパク質が一定の方向に動くことで引き起こされると考えられている。そのため、同じ生物では原形質流動の速度はどこも等しいと考えることができる。しかし、式からは、かかる時間は距離の二乗におよそ比例するということが読みとれる。つまり、じゅうぶん大きい細胞をもつ生物の場合や、原形質連絡を通過してじゅうぶん大きい距離を移動する場合は原形質流動のほうが単純拡散よりも短時間で物質を輸送できると考えられる。したがって、原形質流動は生物が大きくなるために必要であると考えられる。

6 結論

今回の実験課題では、タマネギ (*Allium cepa* L.) の鱗茎から採取された表皮細胞を 100 倍と 400 倍の倍率で観察した。観察の際にはメチルグリーン・ピロニン染色液を用いたり、簡易暗視野観察を行ったり、TA によるデモンストレーションとして DAPI や DiOC₆ を用いて蛍光観察をしたりした。観察の際に、原形質流動の速度を測定した。そして観察結果をスケッチや表にまとめ、鱗茎の生長や細胞内の構造、原形質流動について考察を行った。

その結果、タマネギ (*Allium cepa* L.) の鱗茎がどのように成長するか仮説を立てたり、ミトコンドリアにも DNA が含まれていることを確認したり、核が存在する領域について考えたり、原形質流動の分子的メカニズムや必要性について考えたりすることができた。このため、本実験の目的である真核細胞の一般的構造と昨日の一端を学ぶということではできたといえる。

参考文献

- [1] ヴォート基礎生化学 第 5 版 (東京化学同人) 5 ページ

- [2] Essential 細胞生物学 原書第 4 版 (南江堂) 209 ページ
- [3] Essential 細胞生物学 原書第 4 版 (南江堂) 155～156 ページ
- [4] Essential 細胞生物学 原書第 4 版 (南江堂) 505 ページ