

	こうが だいすけ
氏 名	甲 賀 大 輔
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第174号
学位授与の日付	平成19年 3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名	Three-dimensional ultrastructure of the Golgi apparatus in different cells:high-resolution scanning electron microscopy of osmium-macerated tissues (異なる細胞におけるゴルジ装置の3次元微細構造について—オスミウム浸軟組織の高分解能走査型電子顕微鏡による観察)
論文審査委員	主査 教授 車 田 正 男 副査 教授 牛 木 辰 男 副査 教授 内 藤 眞

博士論文の要旨

序論：ゴルジ装置は、1989年にカミロ・ゴルジにより発見された細胞小器官であるが、今では粗面小胞体で合成された蛋白質の修飾や、選別、梱包などの中心的な装置として知られている。このゴルジ装置の構造については、これまで光学顕微鏡(光顕)と透過型電子顕微鏡(透過電顕)により莫大な数の研究がなされてきた。こうした研究から、一般にゴルジ装置は、扁平な槽が数層積み重なった構造で、シス最外槽、中間槽、トランス最外槽の3つに分類される。しかし実際のゴルジ装置の構造は、三次元的にきわめて複雑な構造をしており、細胞の種類や機能によってもかなり構造が異なることがわかっている。ゴルジ装置のより正確な微細構造と機能の関係が注目を浴びてきている現在、こうした解析の重要性が見直されているが、従来の透過電顕の超薄切片では断片的な情報しか得られず、解析困難なことも多い。そこで本研究では、田中ら(1981,1984)が考案したオスミウム浸軟法を用いて、ラットの精巣上体管上皮細胞、空腸の杯細胞、性腺刺激ホルモン産生細胞(GTH細胞)、脊髄神経節細胞のゴルジ装置を走査型電子顕微鏡(走査電顕)で観察し、その三次元立体構造の解析を行い、それらの細胞のゴルジ装置の形状、ゴルジ層板の槽、シス最外槽の微細構造、トランス最外槽の微細構造について比較検討した。

材料と手法：実験材料として成熟ラット(Wistar系)を用い、試料作製法は、田中らが開発したオスミウム浸軟法(Tanaka and Mitsushima, 1984)に準じた。まず、実験動物を麻酔し、0.5%グルタルアルデヒド液と0.5%パラホルムアルデヒド液の混合液(0.1M 磷酸緩衝液, pH7.4)で灌流固定を行った。その後、目的臓器を摘出し、両刃のカミソリで細切した後、1%OsO₄(0.1M 磷酸緩衝液)で1時間固定した。次に50%ジメチルスルフォキシドに浸漬した状態で、凍結切断を行い、0.1% OsO₄(0.1M 磷酸緩衝液)で70時間浸軟処理を行った。その後、1%タンニン酸と1%OsO₄(0.1%磷酸緩衝液)で導電染色を施し、エタノール上昇系列で脱水後、臨界点乾燥、薄く金属コーティングを行い、電界放出型走査型電子顕微鏡(日立 S-5000)で観察した。

結果：オスミウム浸軟法により細胞の細胞内基質を取り除き、ゴルジ装置の層板を立体的に走査電顕で示すことができた。その結果、以下のようなことが明らかになった。

【ゴルジ装置の全体像】精巣上体管上皮主細胞のゴルジ装置は、火炎を思わせるような構造をしており、核上部に位置していた。シス面は外側に位置していた。空腸の杯細胞のゴルジ装置は、コップ状もしくは筒状の構造で、核上部に位置しており、シス面はやはり外側に位置した。性腺刺激ホルモン産生細胞のゴルジ装置は、きわめて特徴的な球形を呈し、細胞の中央部に位置していた。シス面は外側、トランス面は球の内側に位置していた。脊髄神経節細胞のゴルジ装置は、小さなゴルジ装置が細胞内に散在していた。

【ゴルジ層板の槽】ゴルジ層板の槽の数は、細胞の種類によって大きく異なっていた。またどの細胞においても、ゴルジ層板の槽と槽の連結を確認することはできなかった。

【シス最外槽の微細構造】シス最外槽の形態はいずれの細胞においても基本的には扁平であったが、その表面にはいずれのシス最外槽においても特徴的な小さな孔(径約 30 nm)が多数みとめられた。また、大きな窓もみられたが、こちらは他層板にも同様な窓があいておりトランス側とシス側を連絡する通路を形成していた。杯細胞のシス最外槽は、より複雑な構造で、管状部と扁平な板状部からなっていた。

【トランス最外槽の微細構造】トランス最外槽の構造は、細胞の種類によってかなり多様であった。しかし基本的には管状部および、または小さな板状部からなり、時々互いに結合することでより複雑な構造を呈していた。トランス最外槽のごく近傍にはしばしば小管状の粗面小胞体のみとめられたが、トランス最外槽との直接的な連絡はみとめられなかった。

結論：一般にゴルジ装置の構造は単純な層板構造として表されることが多いが、実際のゴルジ装置の三次元的形状は細胞の種類によって大きく異なることが明らかになった。また、ゴルジ装置を構成する各層板の微細構造についても、細胞によって異なり、特にトランス層板は多様な形状を示すことがわかった。以上の結果はゴルジ装置の機能を考える上に、その構造の多様性を考慮する必要があることを示すものである。

(論文審査の要旨)

ゴルジ装置は、1989年にカミロ・ゴルジによりフクロウのプルキンエ細胞で発見された細胞小器官の一つである。一般的にゴルジ装置は、扁平な槽が数層積み重なった構造で、シス最外槽、中間槽、トランス最外槽の3つに分類されるが、ゴルジ装置の構造は、細胞の種類や機能により異なると共に、透過電顕の超薄切片では解析困難な複雑な構造をしていることが多い。そこで本研究では、ラットの精巣上体管上皮細胞、空腸の杯細胞、性腺刺激ホルモン産生細胞、脊髄神経節細胞のゴルジ装置について、オスミウム浸軟法(田中ら)を用いた走査型電子顕微鏡法で立体構造解析を行い、各細胞のゴルジ装置の形状、ゴルジ層板の槽、シス最外槽の微細構造、トランス最外槽の微細構造について比較検討した。一般にゴルジ装置の構造は単純な層板構造として表されることが多いが、実際のゴルジ装置の形状はきわめて多様で細胞の種類によって大きく異なっていた。ゴルジ装置を構成する各層板の微細構造についても、細胞によって異なり、特にトランス層板は多様な形状をしていた。

以上、本研究は従来超薄切片では解析困難な複雑な構造をしているゴルジ装置の3次元立体的形態を明らかにし、さらに細胞の種類によってこの形態が大きく異なっていることを示した。本研究の成果は今後のゴルジ装置における研究の形態学的基盤として多く引用されることが期待され、その点で学位論文としての価値を認める。