



X線顕微鏡によるホヤ血液細胞内のバナジウムマイクロ分布観察とXANES解析

竹本邦子 関西医科大学物理学教室 〒573-1136 大阪府枚方市宇山東町18-89
木原 裕 関西医科大学物理学教室 〒573-1136 大阪府枚方市宇山東町18-89

要旨

ホヤ血球内におけるバナジウムのマイクロ分布と化学状態を、ESRFの走査型X線顕微鏡ビームライン(ID21)で測定した。マイクロXANES解析の結果、加圧凍結法で凍結し、生きた状態を保ったままのシグネットリング細胞の液胞は3価のバナジウムで満たされており、さらにその液胞内には、4価のバナジウムからなる微粒子が存在していることが分かった。

1. はじめに

生物はある種の金属元素を進化の過程で取り入れ、機能に利用してきた。鉄、銅、マンガンなど呼吸系や光合成系に多く利用されている。バナジウムもゴカイの仲間のエラコリ¹⁾やベニテングダケ²⁾などいくつかの生物に含まれており、なかでもある種のホヤの中では海水中の1000万倍もの高濃度で蓄積されている³⁾。しかし、その生理的な意味は全く理解されていない。

ホヤは、主に浅い海にすむ無脊椎動物で、地球上に広く生息し、これまでに少なくとも3,000種が同定されている。

Table 1に、バナジウムを高濃度に濃縮している代表的な3種のホヤ (*Ascidia gemmata*: バナジウムボヤ, *A. Ahodori*: ナツメボヤ, *A. sydneiensis samea*: スジキレボヤ) と、食用にされるマボヤ (*Halocynthia roretzi*) の各組織中のバナジウム濃度を示す。表から明らかなように、3種のホヤの血球中にはきわめて高濃度のバナジウムが蓄積されている。特に、バナジウムボヤという和名を持つ *A. Gemmata* の血球には、バナジウムが、海水に溶解している濃度35 nMの1000万倍に相当する350 mMという高濃度で濃縮している^{4,5)}。比較的濃縮され易いとされている鉄においても、褐藻中に濃縮されている鉄の濃度は海水の1万倍程度であることから、ホヤの体内に濃縮しているバナジウムの濃度がいかに高いかということが分かる。

では、なぜホヤだけが、これほど高い濃度のバナジウムイオンを体内に濃縮するようになったのか、その濃縮機構は、またその生理的役割は何であるか。これらの答えは未だ得られていない。

バナジウムは多元価元素で、水溶液中では、5価、4価、3価、2価の価数をとりうる。海水中では、一般に5価の陰イオン (HVO_4^{2-}) として存在している。

ホヤの血液細胞は、形態学的分類により、シグネットリング細胞、モルーラ細胞、コンパートメント細胞などほぼ

Table 1 Concentration of vanadium in tissues of several ascidians (mM).

	<i>A. gemmata</i>	<i>A. ahodori</i>	<i>A. sydneiensis samea</i>	<i>Halocynthia roretzi</i>
Tunic	N.D.	2.40	0.06	0.010
Mantle	N.D.	11.20	0.70	0.001
Branchial basket	N.D.	12.90	1.40	0.004
Blood cells	347.20	59.90	12.80	0.007
Serum	N.D.	1.00	0.05	0.001

N.D. not determined

10種類に区分されている。バナジウムがどの細胞に選択的に含まれるかも興味のあるところである。

我々は、走査型X線顕微鏡をホヤの血液細胞観察に応用し、世界で初めて、生きた状態を保ったホヤの血液細胞中のバナジウム分布を可視化することに成功した⁶⁾。さらに、そのバナジウムの化学的状態を測定することができた⁷⁾。本稿では、走査型X線顕微鏡で行われた、「生きている」状態に近いホヤの血液細胞内におきているバナジウムのマイクロ分布の測定およびマイクロXANES解析について紹介する。

2. ESRF 走査型 X 線顕微鏡

本実験が行われたESRFのX線顕微鏡ビームライン(ID21)は、数keV領域の走査型X線顕微鏡の研究を行うことのできる世界で唯一の施設である。このエネルギー領域ではバナジウム、硫黄、リン、マグネシウム、シリコンなどの吸収端を利用したXANESを行うことができる⁸⁾。

Fig. 1にX線顕微鏡ビームライン(ID21)の光学系を示す。Si(111)モノクロメータで分光されたX線は、ゾーンプレートで集光され、試料に照射される。試料を掃引しながら透過光および蛍光を検出することにより、吸収像および蛍光像を得ることができる。試料ステージは、ステッ

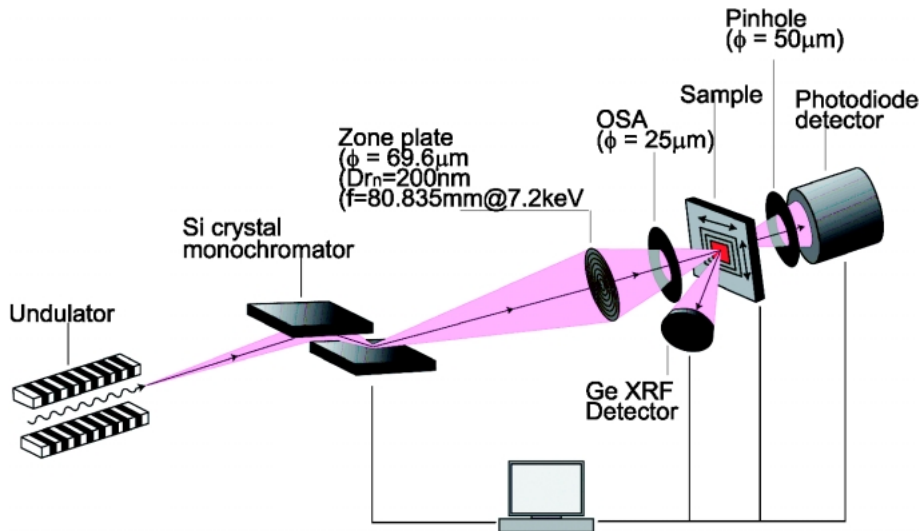


Figure 1. Diagram of the scanning x-ray microscope installed at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) ID21 beamline. The x-ray beam from the undulator at the storage ring is monochromated by a fixed exit double crystal monochromator and focused on the sample by a zone plate objective lens and a small pinhole aperture.

ピングモーターとピエゾ素子を組み合わせた機構を採用し、広い駆動範囲 (± 5 mm) と、高い位置分解能 (10 nm) を持つ。透過光の検出器には、PIN フォトダイオードを、蛍光の検出器には、ゲルマニウム半導体検出器を用いている。試料チャンバーは、減圧することも可能で、またクライオノズルの導入により、凍結試料 (ステージ表面温度 -120°C) の観察も行うことができる。試料チャンバー内の試料ステージと、ハッチの外にある微分干渉型光学顕微鏡の XY ステージとの間には、高精度の位置決め機構が整備されている。これを利用することにより、光学顕微鏡で決定した場所は、X線顕微鏡でも的確に指定することができ、迅速な測定が可能となっている。

本実験では、バナジウムの K 端吸収端よりもやや高エネルギーである 5.5 keV の X 線を用い、吸収像と、バナジウムの蛍光像を同時に撮影した。ビームサイズの最小直径は $1\ \mu\text{m}$ 、試料スキャンの最小ステップは $0.5\ \mu\text{m}$ である。

3. バナドサイトの同定とバナジウムの細胞内分布

実験には、地中海産のホヤ *Phallusia mammillata* および日本産のホヤ *Ascidia sydneiensis samea* を用いた。血球は、密度勾配遠心法により、各細胞集団に分離した後、 4°C の培地の中で保存された。血球はこの状態で、約 1 週間生きつづけることができる⁶⁾。

Fig. 2 は、懸濁液の光学顕微鏡写真である。全体の約 70% がシグネットリング細胞、残りはモルーラ細胞等からなっている。シグネットリング細胞は、そのほとんどが液胞で、細胞膜周辺部に核を有した指輪型の形をしていることが分かる。

Fig. 3 は、ウェットな状態の血液細胞の光学顕微鏡像、X線顕微鏡透過像、バナジウムからの蛍光像である。光

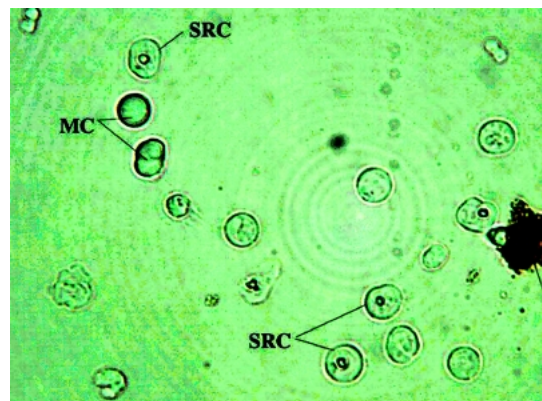


Figure 2. Light microscope image of blood cell suspension. SRC: signet ring cell. MC: morula cell.

学顕微鏡で同定した、シグネットリング細胞、モルーラ細胞、コンパートメント細胞、アメーボ細胞の全ての細胞に対応した透過像が、良好なコントラストで確認できる。しかし、バナジウムの蛍光像では、シグネットリング細胞とアメーボ細胞に対応した細胞しか確認できなかった。以上の結果より、シグネットリング細胞とアメーボ細胞がバナジウムを濃縮している細胞 (バナドサイト) であると同定された。

次にシグネットリング細胞内の、バナジウムの細胞内分布を調べるため、細胞を、凍結乾燥法と浸漬凍結法で固定した試料についてバナジウムの蛍光像の観察を行った。

Fig. 4 は、凍結乾燥試料の X 線顕微鏡像である。バナジウムの分布が、A は液胞内にはほぼ均一に分布しているのに対し、B は細胞膜周辺部にバナジウムが分布している。これは、凍結乾燥を行う過程において、液胞内のバナ

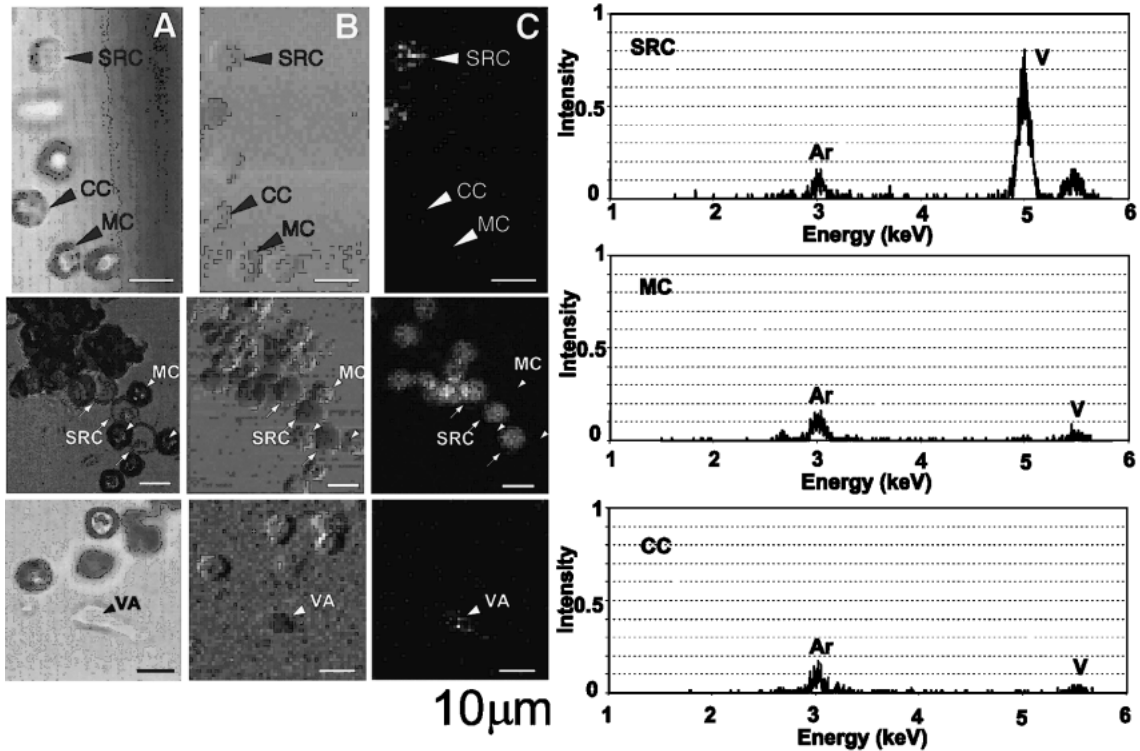


Figure 3. *Phallusia mammillata* blood cells observed by differential interference contrast light microscopy (A), by x-ray microscopy in transmission mode (B), and in the fluorescence mode for vanadium (C) and fluorescence spectra emitted from the blood cells. Transmission and fluorescence images were taken by scanning cells with a $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ resolution. Vanadium is accumulated in signet ring cells (SRC, shown by arrows) and in a vacuolated amoebocyte (VA), but not in morula cells (MC) and compartment cells (CC). Argon peak comes from air.

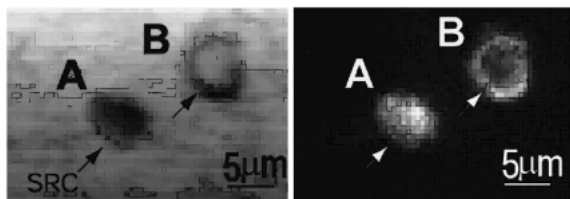


Figure 4. Freeze-dried *Phallusia mammillata* blood cells as shown by x-ray microscopy in transmission (left hand side) and fluorescence mode for vanadium concentration (right hand side). Transmission and fluorescence image was taken by scanning cells with a 5.500 keV x-ray at $0.5\ \mu\text{m} \times 0.5\ \mu\text{m}$ resolution. Vanadium was located in signet ring cells (SRC, shown by arrows).

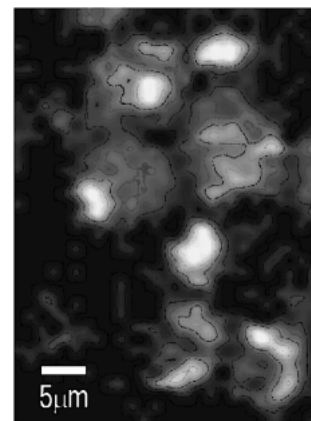


Figure 5. Fluorescence image of vanadium in immersion cryo-fixation by isopentane *Ascidia sydneiensis samea* blood cells.

ジウムが流失した可能性を示唆している。

Fig. 5 は、液体イソペンタン中で浸漬凍結した血液細胞の X 線顕微鏡写真である。バナジウムの分布状態に一貫性はなく、凍結乾燥した試料でも観察された細胞周辺部への濃縮や、複数の内部の高い濃縮部分の存在、液胞内均一分布などが、同じ視野内に見られる。これは、浸漬凍結法で実現できた凍結状態に幅があったことを示している。

以上の結果より、ホヤの血球を生きた状態を保ったまま凍結するには、浸漬凍結法は充分ではないことが分かった。そこで我々は、血球が破裂しないで、細胞内のバナジ

ウムの化学状態を生きた状態で保ったまま凍結できる方法として、加圧凍結法を用いて試料調整を行うことにした。

加圧凍結法とは、210 MPa の高圧液体窒素を試料に一気に吹き付けることにより、生物試料を生きた状態に近い状態で固定する方法である⁹⁾。加圧凍結法では、試料を両面から冷却させることにより、大型の試料 ($\sim 600\ \mu\text{m}$) を、ガラス状態を保ったまま凍結することができる¹⁰⁾。

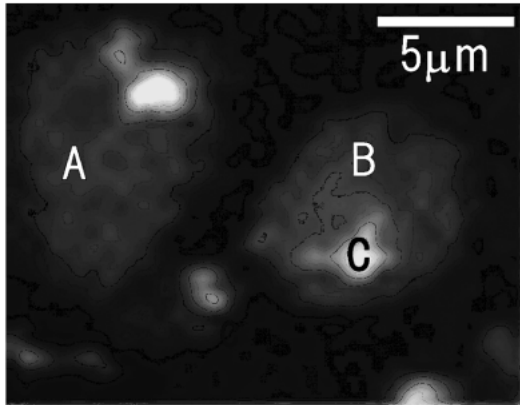


Figure 6. Fluorescence image of vanadium in high pressure cryo-fixation *Ascidia sydneiensis samea*. Boole cells.

凍結試料は、加圧凍結装置 (BAL-TEC社製 HPM010)¹¹⁾を用い作製した。懸濁液を滴下し、しばらく置いたコロジオン膜の張られた電顕メッシュを、専用の銅製の試料セル2枚で挟み、加圧凍結装置で凍結する。凍結後は、液体窒素中で保管し、試料ホルダーへの取り付けも液体窒素中で行われた。

Fig. 6は、加圧凍結した細胞のX線顕微鏡写真である。液胞内は、バナジウムで満たされていることが分かる。その液胞内には、直径約3μmの大きさの高いコントラストを示す微粒子が確認できる。そのバナジウム蛍光強度は、液胞内バナジウムの4倍以上を示している。この微粒子は、全てのシグネットリング細胞の液胞内で観察できた。

4. 血液細胞内バナジウムのマイクロ XANES 解析

加圧凍結したシグネットリング細胞の液胞内のバナジウムと、バナジウムの高い蛍光強度を示した微粒子内のバナジウムについてマイクロ XANES 解析を行った。Fig. 7はマクロ XANES とマイクロ XANES スペクトルである。マイクロ XANES のビームサイズは、1μmで、液胞内 (A, B) と高い集積を示す部位 (C) で測定を行った。横軸は金属バナジウム箔から得られたエッジからのエネルギーシフト量を、縦軸はバナジウム蛍光強度を表す。蛍光強度は、バナジウムの K 吸収端から50 eV 以上離れた強度で規格化してある¹²⁾。

バナジウムのプレエッジは、価数に大変敏感で、例えば、酸化バナジウムは、価数が高いほど、金属バナジウムのエッジからのエネルギーシフト量が大きくなり、また強度が高くなる^{13,14)}。また、バナジウム錯体の配位子 (リガンド) や対称性も、吸収端とプレエッジのエネルギーシフト量および蛍光強度の変化に強く反映される。Frank 等は、ホヤの血球集団の XAFS を行い、存在する可能性のある様々な種類のバナジウム錯体の標準 XANES 測定を行ってきた¹⁴⁻¹⁶⁾。これらのデータを元に、プレエッジに

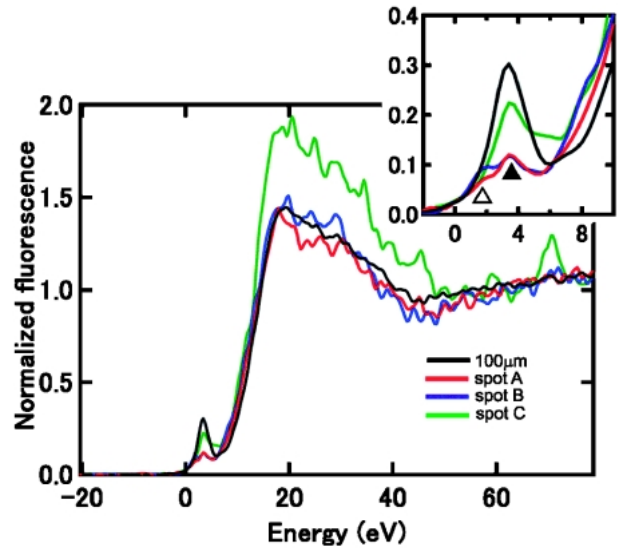


Figure 7. Vanadium K-edge XANES spectrum of whole blood cells and micro XANES spectra in vacuole and from the micro-granule. Black line: whole blood cells, red line: vacuole (Fig. 6 spot A), blue line: vacuole (Fig. 6 spot B), green line: micro-granule (Fig. 6 spot C). Beam size of XAFS is 100 μm and micro XAFS is 1 μm. Samples were kept at -120°C. X-ray energy was 5.500 keV. Fluorescence yields were normalized to 1 at the energy above the main absorption edge, 50 eV. Pre-edge peak energy shift, ▲: 3.4 eV, △: 1.8 eV.

よるバナジウムの同定を行った。A と B 点のプレエッジピークは、3.4 eV と1.8 eV の2つのピークからなり、C 点は3.4 eV のピークからなる。Frank 等の結果から、3.4 eV のピークは、4 価のバナジウム、1.8 eV のピークは、3 価のバナジウムと推定することができる。

ここで、液胞と微粒子に存在するバナジウムの全てが、それぞれ全て3価と4価であると仮定すると、1個のシグネットリング細胞に存在するバナジウムの存在比は、細胞液胞と微粒子の占める体積率から換算することができ、98 : 2 という値が求まる。この値は、ESR と放射化学分析法から求めた値97.6 : 2.4 と非常によく一致する¹⁷⁾。

ところが、100 μm のビームを用いて、同じ加圧凍結試料の XANES 測定では、ほとんどが4価のバナジウムという結果が得られた⁷⁾。この結果は、懸濁液中には、血液細胞内に存在しているバナジウム以外にバナジウム元素が存在している可能性を示すものである。Frank 等も、採取場所の異なるホヤの血球細胞では、バナジウムの3価と4価の存在比が異なるという結果を得ており¹⁶⁾、このことは今後の検討課題であるといえる。

ところで、液胞内に存在している微粒子 (グラニュール) の存在については、これまでも研究者等には知られており、光学顕微鏡で観察することもできる。また、分析電子顕微鏡観察において、この微粒子からバナジウムが検出されたという報告もある¹⁸⁾。これより、我々が検出した主に4価のバナジウムからなる直径約3μmの微粒子は、上

述のグラニューールと同じものである可能性がある。

5. まとめ

走査型 X 線顕微鏡を用いて、ホヤの血球細胞の中で、シグネットリング細胞とアメーバ細胞がバナドサイトと同一とすることができた。シグネットリング細胞の液胞は、主に 3 個のバナジウムで満たされており、その中に、主に 4 個のバナジウムからなる直径 3 μm 程度の微粒子 (グラニューール) が存在していることが分かった。

今後は、バナジウム化合物の配位構造の決定に大きな手がかりを与えると考えられる硫黄をターゲット元素として、マイクロ XANES 解析を行う予定である。

謝辞

本稿は、広島大学理学部附属臨海実験所の道端齊教授、植木龍也助教授、ESRF の Dr. J. Susini, Dr. F. Barbara, Dr. M. Salomé, 長浜バイオ大学の山本章嗣教授、東京慈恵医科大学の佐々木博之博士らとの共同研究の内容をまとめたものである。ホヤの採取にあたっては、東京大学海洋研究所大槌臨海研究センター (現国際沿岸海洋研究センター) の盛田孝一技官をはじめとするスタッフおよびナポリの Stazione Zoologica 'Anton Dohrn' のスタッフの方々にお世話になった。改めて深く感謝の意を表したい。

参考文献

- 1) T. Ishii, I. Nakai, C. Numako, K. Okoshi and K. Okamoto: *Naturwissenschaften* **80**, 268 (1993).
- 2) H. Kenifel and E. Bayer: *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 3075 (1986).
- 3) M. Henze: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **72**, 494 (1911).
- 4) H. Michibata, T. Terada, N. Anada, K. Yamakawa and T. Numakunai: *Biol. Bull.* **171**, 672 (1986).
- 5) H. Michibata, Y. Iwata and J. Hirata: *J. Exp. Zool.* **257**, 306 (1991).
- 6) T. Ueki, K. Takemoto, B. Fayard, M. Salomé, A. Yamamoto, H. Kihara, J. Susini, S. Scippa, T. Uyama and H. Michibata: *Zool. Sci.* **19**, 27 (2002).
- 7) K. Takemoto, T. Ueki, B. Fayard, M. Salomé, J. Susini, A. Yamamoto, H. Kihara, S. Scippa and H. Michibata: X-Ray Microscopy (Proceedings of the 7th International Conference, J. Susini et al., ed., EDP Sciences, 2003) 333-336.
- 8) J. Susini, R. Barrett, B. Kaulich, S. Oestreich and M. Salomé: X-Ray Microscopy (Proceedings of the 6th International Conference, Meyer-Ilse, W., Warwick, T. and Attwood, D.: editors, AIP Conference Proceeding, 1999) 19.
- 9) H. Moor and U. Riehle: Proc. 4th European Reg. Conf. of

Electron Microscopy 2, 33 (1968).

- 10) R. Dahl and L. A. Staehelin: *J. Electron Microsc. Tech.* **13**, 165 (1989).
- 11) H. Moor: Cryotechniques in biological electron microscopy (R. A. Steinvrecht and Z. Zierold, editors. Springer-Verlag/Germany, Berlin, 1987) 175.
- 12) J. Wong, F. W. Lytle, R. P. Messmer and D. H. Maylotte: *Phys. Rev. B.* **30**, 5596 (1984).
- 13) T. D. Tullius, W. O. Gillum, R. M. K. Carlson and K. O. Hodgson: *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 5670 (1980).
- 14) P. Frank, K. O. Hodgson, K. Kustin and W. E. Robinson: *J. Biol. Chem.* **273**, 24498 (1998).
- 15) P. Frank and K. O. Hodgson: *Inorg. Chem.* **39**, 6018 (2000).
- 16) P. Frank, R. M. K. Carlson, E. J. Carlson and K. O. Hodgson: *J. Inorg. Biochem.* **94**, 59 (2003).
- 17) J. Hirata and H. Michibata: *J. Exp. Zool.* **257**, 160 (1991).
- 18) L. S. Botte, S. Scippa and M. de Vincentiis: *Experientia* **35**, 1228 (1979).

著者紹介



竹本 邦子

関西医科大学物理学教室

E-mail: takemoto@makino.kmu.ac.jp

略歴:

東京工業大学理工学研究課金属工学専攻博士課程終了。博士 (工学)。1995年関西医科大学物理学教室助手を経て、現在、同教室講師。放射光を光源とした X 線顕微鏡の開発および応用研究に従事。主に、立命館大学 SR センター X 線顕微鏡ビームライン (BL12) 利用。



木原 裕

関西医科大学物理学教室

E-mail: kihara@makino.kmu.ac.jp

略歴:

東京大学理学系研究科物理学専門課程単位取得退学、理学博士。自治医科大学講師等を経て、現在関西医科大学物理学教室教授。専門: X 線顕微鏡, 蛋白質のフォールディング。

Micro XANES Study on Vanadium in Ascidians Alive Blood Cells Investigated by Fluorescence Scanning X-Ray Microscopy at ID21 at ESRF

Kuniko TAKEMOTO Department of Physics, Kansai Medical University,
18-89 Uyama-Higashi, Hirakara, Osaka, 573-1136, Japan
Hiroshi KIHARA Department of Physics, Kansai Medical University,
18-89 Uyama-Higashi, Hirakara, Osaka, 573-1136, Japan

Abstract

X-ray microscope installed at the beam line ID21 at European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) was used to the elucidation of micro-distribution and chemical states of vanadium in ascidians. In combination with a high pressure cryo-fixation technique, we have succeeded in observing uniform distribution of vanadium in the vacuole, in identifying the 3rd valency in the signet ring cell, and more importantly in finding granules rich in vanadium of the 4th valency