

〈ノート〉

琵琶湖水中におけるウイルス感染している細菌細胞の
EM スтейナーを用いた電子染色条件の検討沈 尚¹⁾, 日下部 武 敏²⁾, 清 水 芳 久¹⁾¹⁾ 京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター
(〒520-0811 滋賀県大津市由美浜1-2 E-mail: shin.shou.48a@st.kyoto-u.ac.jp)²⁾ 京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻
(〒615-8540 京都市西京区京都大学桂C-1-3-462 E-mail: kusakabe.taketoshi.2w@kyoto-u.ac.jp)

概 要

ウイルス感染している細菌細胞 (VIC) の観察は微生物ループにおけるウイルスの寄与を評価する上で必要である。本研究では琵琶湖水中の VIC を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察をすべく、酢酸ウラニルの代替電子染色剤として EM スтейナーを適用し、染色条件を検討した。その結果、染色時間は 30 分で十分に細胞内ウイルスを染色し、また染色剤濃度は 1~4 倍希釈で VIC の TEM 画像に明確な違いがないことを明らかにした。また、TEM グリッドを長時間 (30 秒×5 回) 洗浄すると細胞内ウイルスの画像が不鮮明になり、VIC の観察が困難になることが明らかとなった。

キーワード：透過型電子顕微鏡 (TEM), EM スтейナー, 電子染色剤, ウイルス感染している細菌細胞

原稿受付 2017.7.7 原稿受理 2017.8.24

EICA: 22(2・3) 27-31

1. 背 景

ウイルスは水環境中で最も多く存在する構造体 (約 10^7 mL⁻¹) である。中でも細菌へ感染するウイルス (バクテリオファージ) は、感染に伴って細菌細胞を溶菌させて溶存態有機物へと回帰させることで、細菌細胞内の有機物や栄養塩が微生物ループを介して高次の栄養段階へ伝達される経路を抑制する役割がある。このようなウイルスの役割は、水中の無機化速度や栄養塩の循環速度を加速させる点で、海洋中の物質循環において重要な役割を果たしていると認識されている^{1,2,3)}。琵琶湖水中においても、50% 程度の細菌がウイルス感染によって死亡していることが明らかとなっていることから^{4,5)}、琵琶湖物質循環においてもウイルスの重要性が示されつつある。

細菌細胞のうちウイルス感染している細胞の割合 (FVIC, frequency of visibly infected cells) は細菌の死亡率を評価するために必要な値であり、透過型電子顕微鏡 (TEM, transmission electron microscope) はこの FVIC を評価する強力な手段である。酢酸ウラニルはウイルス感染している細菌細胞内のウイルス粒子のコントラストを高めることから、TEM 観察の電子染色剤として広く使用されている^{5,6)}。しかし、酢酸ウラニルは核燃料物質に指定されており、日本国内をはじめ諸外国において使用が厳しく制限されている⁷⁾。研究目的や少量の購入でさえも政府の認可が必要であり、TEM を備えるすべての研究機関が酢酸ウラニルを使用できる

状況ではないことが研究の前進を妨げる一因となっている。そこで酢酸ウラニルの代替電子染色剤として、非放射性であるリンタングステン酸の研究が進められてきた⁸⁾。しかし、ウイルス感染している細菌細胞の観察では酢酸ウラニルと同等の染色能を得ることはできていない⁹⁾。

酢酸ウラニルの代替となりうるものとして EM スтейナー (日新 EM) が挙げられる。EM スтейナーは酢酸サマリウムと酢酸ガドリニウムを含む電子染色剤であり¹¹⁾、生物試料におけるタンパク質箇所を酢酸ウラニルと同等のコントラストで染色する¹⁰⁾。ウイルスは核酸がカプシドと呼ばれるタンパク質で覆われており、細菌が感染しているかどうかは細胞内にウイルス粒子が存在しているかどうかで判断する。したがって、EM スтейナーは酢酸ウラニルの代替染色剤として、ウイルス感染している細菌細胞の観察に適していると考えられる。しかし、水環境中のウイルス感染している細胞 (VIC, viral infected cells) の観察において EM スтейナーを適用した先行研究は見当たらず、その有用性は明らかになっていない。そこで、本研究では大型淡水湖沼である琵琶湖中の VIC を対象に、EM スтейナーを適用し、その染色条件の検討を試みた。

2. 材料と方法

2.1 採水地点と方法

サンプルは 2016 年 8 月 22 日に琵琶湖北湖沖帯 17B

(35° 23' 41"N, 136° 07' 57"E) の表層水 (水深 0.5 m) を、ステンレスバケツを用いて採水した。採水した試料 1 L は船上ですぐに滅菌済みボトル (ポリスチレン, CORNING) に移して、グルタルアルデヒド (最終濃度 1 vol%) による化学固定を行なった。その後、冷蔵保存 (4°C) しながら実験室に持ち帰り、観察まで -30°C で冷凍保存した。

2.2 TEM グリッドの作成および観察

TEM グリッド上での細菌数を確保するため、採水した試料 1 L を 5 mL 程度になるように遠心濃縮した (Beckman, Avanti J-25; 5,000×g, 20 分, 4°C)。濃縮した試料水は TEM グリッド (JEOL; 400 メッシュ, カーボン補強済みフォルムバル支持膜付 Cu グリッド) に超遠心 (Hitachi, Himac CS 100GXII; 70,000×g, 20 分, 4°C) で捕集した⁶⁾。その後、TEM グリッドを室温で EM ステイナーを用いて電子染色し、超純水で洗浄した。洗浄した TEM グリッドは一晚自然乾燥させたのち、透過型電子顕微鏡 H7650 (80 kV, Hitachi) により観察した。観察倍率は 20,000~50,000 倍で実施した。TEM の画像は 16 ビットの CCD カメラ (2048×2048 ピクセル) で撮影した。

2.3 染色条件の設定

染色対象のコントラストを決定する要因として、使用する染色剤の濃度、染色時間および洗浄条件の 3 つが考えられる。EM ステイナーの最終濃度は 1.0, 0.5 および 0.25 倍の 3 条件に設定した。また日新 EM で指定されている EM ステイナーによる染色時間は 30 分間であるが¹¹⁾、細菌細胞内のウイルス粒子を染色する必要があることから、拡散時間を考慮して染色時間を 30 分間と 60 分間の 2 条件に設定した (Table 1)。また、上記の染色条件を検討する際には、TEM グリッドを超純水で 5 回 (各 10 秒) 洗浄した。洗浄条件の検討では、染色条件 a を基準にして、超純水による洗浄を 30 秒×5 回で実施した。

Table 1 Staining conditions

	a	b	c	d
Final staining conc.	1.0	0.5	0.25	0.25
Staining time (min)	30	30	30	60

2.4 画像解析

得られた画像はフリーウェアの画像解析ソフトである ImageJ¹²⁾ および統計ソフトウェアである R¹³⁾ を用いて解析した。また、細菌に対して細菌細胞内部のウイルス粒子が鮮明に観察できる染色条件を導き出すためにコントラストという概念を適用した。ウイルス感染している細菌細胞を、細胞内のウイルス粒子と細菌細胞に分離し、それぞれの輝度 (Brightness) のヒスト

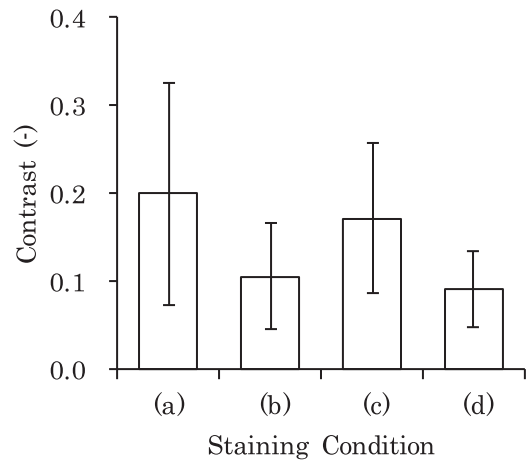


Fig. 1 Comparison of contrast of each staining condition. (a) Final dil.: 1.0-fold, staining time: 30 min. (b) Final dil.: 0.5-fold, staining time: 30 min. (c) Final dil.: 0.25-fold, staining time: 30 min. (d) Final dil.: 0.25-fold, staining time: 60 min. Error bars indicate standard deviation (N=5).

グラムを得た (Fig. 2a~d)。ウイルス粒子から得られたヒストグラムの中でピクセル数の最も多い輝度を $L_{viruses}$ とした。細菌細胞に対しても同様に $L_{bacterium}$ をとり、コントラスト C を次式によって定義した。本研究で用いた輝度は、黒 (輝度 0) と白 (輝度 1) を 16 bit グレースケールで表した値であり無次元である。

$$C = |L_{viruses} - L_{bacterium}| \quad (式 1)$$

コントラスト C が大きいということは、細胞内ウイルスと細菌細胞のヒストグラムのピークが離れていることを意味しており、細菌と細胞内ウイルスの識別が容易になると考えられる。

3. 結果と考察

Fig. 1 は EM ステイナーによる各染色条件の VIC のコントラストを示している。条件 a および c ではコントラストがそれぞれ 0.20 ± 0.13 , 0.17 ± 0.09 であったのに対し、条件 b と d ではそれぞれ 0.11 ± 0.06 , 0.09 ± 0.04 となった (平均±標準偏差, N=5)。平均値では条件 a および c のコントラストの方が、条件 b および d のそれに比べて約 2 倍高い結果となったが、条件 a~d で有意差のある組み合わせは見られなかった (Steel-Dwass 法, $p > 0.05$)。条件 a~d で染色した VIC の TEM 画像とコントラストを Fig. 2 に示す。各 TEM 画像の中心にある楕円形あるいは円筒状を示すものが細菌細胞である。細菌がウイルス感染すると、Fig. 2a~d のようにウイルス粒子が細菌細胞の中に黒い点として確認することができる。4 つの染色条件 a~d から、VIC の細胞内部のウイルス粒子の見え方がほとんど同等であることが分かる (Fig. 2 中の画像は観察された VIC の一例であるが、他の TEM 画像中の細菌細胞内部のウイルス粒子も同じように確認で

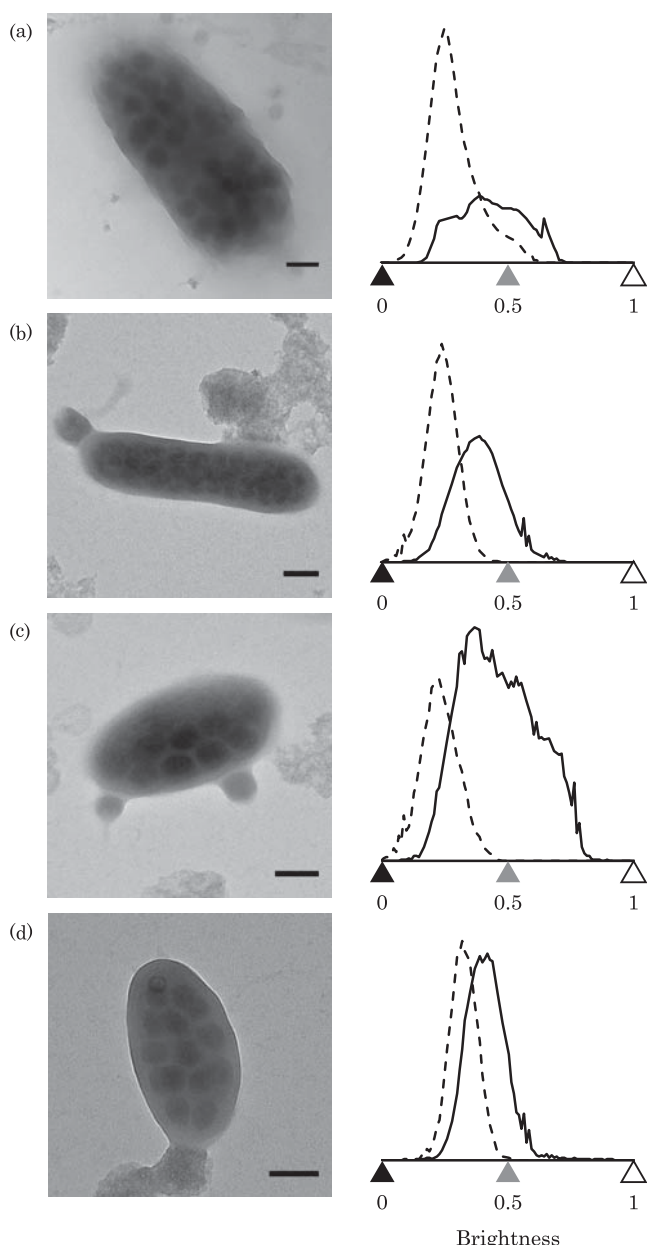


Fig. 2 Transmission electron micrographs and histogram of brightness distribution of virally infected bacterial cells stained by different conditions. Intracellular viral particles were clearly detectable at each staining condition. (a) Final dil.: 1.0-fold, staining time: 30 min. (b) Final dil.: 0.5-fold, staining time: 30 min. (c) Final dil.: 0.25-fold, staining time: 30 min. (d) Final dil.: 0.25-fold, staining time: 60 min. Black, gray and white triangles along the abscissa indicate the minimum (0.0), center (0.5) and maximum (1.0) brightness, respectively. Dashed and solid line indicate the histogram of intracellular viral particles and viral infected bacterial cell, respectively. Scale bars=100 nm.

きる)。しかし、**Fig. 1**で示すように、同じ染色条件でも誤差が大きいのは、水環境中の細菌群集を対象としているため、多種多様な細菌が存在していることで染色のされ方が異なるためだと考えられる。つまり、細菌の大きさや細胞密度、細胞壁、あるいは細胞内部のウイルス粒子の充填率などによってEMステイナーが細胞内部に拡散する際の効率が変わってくるためだと考えられる。しかし、いずれの場合も細菌細胞

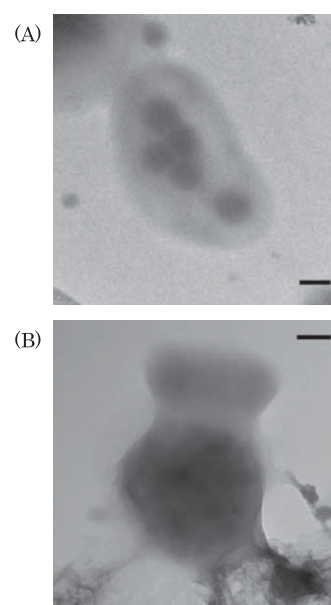


Fig. 3 Transmission electron micrographs of virally infected cells washed by ultrapure water for 30 s, five times after staining process. (A) Viral particles inside the cell were detectable, but the viral particles and the cell were vaguely outlined. (B) Intracellular viral particles were hardly detectable. Scale bars indicate 100 nm

内部のウイルス粒子は明瞭に観察することができていた。したがって、EMステイナーは30分で細菌の細胞内部に十分に拡散しており、細胞内ウイルス粒子を染色できることが分かった。また、染色剤の濃度では、原液~4倍希釈では細胞内ウイルス粒子の観察に影響しないことが明らかとなった。

超純水による洗浄は、染色過程で残っている余分な染色剤を洗い流す役割がある。VICのコントラスト上昇を目的として洗浄条件の検討も行った。**Fig. 3A**および**Fig. 3B**に示しているTEM画像は、染色条件a(染色剤最終濃度:1.0倍,染色時間:30分)により染色を行った後に、超純水による洗浄条件を10秒間×5回から30秒間×5回に変更したものである。細菌細胞内のウイルス粒子は確認できるものの($C=0.13$)、その輪郭は不鮮明であり、また細菌細胞自身のバックグラウンドとのコントラストも低かった(**Fig. 3A**)。また、**Fig. 3B**では細菌細胞の輪郭があいまいになっているだけでなく、細胞内部のウイルス粒子の識別が困難だった($C=0.03$)。これは洗浄過程を長く設定したために、細胞周辺の染色剤のみならず、ウイルス粒子と結合した染色剤が洗い流されたために、細菌細胞自身との識別が難しくなったと考えられる。

4. 結 論

本研究では、VICを観察する際に、従来から使用されている酢酸ウラニルの代替染色剤として、EMステイナーを提案し、染色条件を検討した。琵琶湖水中

の VIC の観察において、EM ステイナーは 30 分程度で十分に細菌の細胞内に拡散しており、染色剤は 1~4 倍希釈で VIC のコントラストに違いがないことを明らかにした。上記の染色条件では、細菌細胞内部のウイルス粒子も明瞭に観察できることを示した。ただし、洗浄時間をより長時間実施した場合には、細胞内部のウイルス粒子は認識できるものの、その輪郭は不鮮明になり、コントラストの改善には逆効果であることが明らかとなった。したがって、他の水環境中の細菌群集を対象に EM ステイナーによる VIC 観察の検討を行う際には、染色時間は 30 分間で固定し、染色剤の濃度を検討すれば十分である。

本研究で得られた染色条件の結果から、条件 a (染色剤最終濃度: 1.0 倍, 染色時間: 30 分) を用いて琵琶湖水中の感染率 (FVIC) を求めた。本研究で使用したサンプルでは、水深 0.5 m で $1.6 \pm 0.7\%$ 、水深 60 m で $1.4 \pm 0.4\%$ となった (TEM グリッド数は 1 サンプルあたり 3 枚用意し、1 グリッドあたり 500 細胞以上の細菌を観察した)。この結果は酢酸ウラニルを用いた先行研究 (琵琶湖北湖の表層 (0.5 m) および深層 (60 m) で FVIC が 1~4% 程度の範囲) と同等のオーダーにある⁵⁾。このことから本研究で示した染色条件は妥当であると考えられる。

今後は、本研究で得られた EM ステイナーの染色条件を用いて、琵琶湖水中の FVIC (細菌細胞のうちウイルス感染している細胞の割合) の評価を実施し、ウイルスが琵琶湖物質循環に与える影響を明らかにしていく必要がある。また、バーストサイズ (溶菌する際の放出ウイルス数) の評価法の 1 つとして、VIC 中のウイルス粒子の計数がある。リントングステン酸によるバーストサイズの評価では、細胞中のウイルス粒子が不鮮明であり、酢酸ウラニルに対して過小評価されている⁹⁾。これは、VIC 中のウイルス粒子がリントングステン酸による染色では不鮮明であるからである。本研究で得られた VIC の TEM 画像では、細胞内粒子が鮮明に観察できており、酢酸ウラニル染色による VIC のウイルス粒子の見え方と類似している^{6,9)}。バーストサイズの評価に対しても EM ステイナーは酢酸ウラニルの代替染色剤になりうる。今後は、EM ステイナーを用いたバーストサイズの評価に関しても更なる検討を進めていく必要がある。

謝 辞

本研究は平成 28 年度河川基金 (28-5211-041) の助成を受けたものです。本研究を遂行するにあたり、

滋賀県琵琶湖環境科学研究センターの皆様には採水調査ではご協力を賜りました。また、京都大学大学院医学研究科総合解剖センター電子顕微鏡室のスタッフの皆様には技術的なご支援を賜りました。ここに記して謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) J. A. Fuhrman: Marine Viruses and their Biogeochemical and Ecological Effects, *Nature*, Vol. 399, pp. 541-548 (1999)
- 2) K. E. Wommack and R. R. Colwell: Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems, *Microbiology and Molecular Biology Review*, Vol. 64, pp. 69-114 (2000)
- 3) C. A. Suttle: Marine Viruses — Major Players in the Global Ecosystem, *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 5, pp. 801-812 (2007)
- 4) H. Takasu, T. Kunihiro and S. Nakano: Protistan grazing and viral lysis losses of bacterial carbon production in a large mesotrophic lake (Lake Biwa), *Limnology*, Vol. 15, No. 3, pp. 257-270 (2014)
- 5) A. S. Pradeep Ram, Y. Nishimura, Y. Tomaru, K. Nagasaki and T. Nagata: Seasonal Variation in Viral-induced Mortality of Bacterioplankton in the Water Column of a Large Mesotrophic Lake (Lake Biwa, Japan), *Aquatic Microbial Ecology*, Vol. 58, pp. 249-259 (2010)
- 6) L. M. Proctor and J. A. Fuhrman: Viral Mortality of Marine Bacteria and Cyanobacteria, *Nature*, Vol. 343, pp. 60-62 (1990)
- 7) International Atomic Energy Agency: International Basic Safety Standards for Protection Against Ionizing Radiation and for the Safety of Radiation Sources, International Atomic Energy Agency (1996)
- 8) M. J. Dykstra and L. E. Reuss: *Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques, and Troubleshooting*, 2nd edn, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2003)
- 9) A. S. Pradeep Ram, T. Nagata, Y. Tomaru and K. Nagasaki: Tungstate Compounds as an Alternative to Uranyl Acetate for Enumerating Viral-infected Prokaryote Cells in Aquatic Systems, *Aquatic Microbial Ecology*, Vol. 47, pp. 209-212 (2007)
- 10) M. Nakakoshi, H. Nishida and E. Katayama: New Versatile Staining Reagents for Biological Transmission Electron Microscopy that Substitute for Uranyl Acetate, *Journal of Electron Microscopy*, Vol. 60, No. 6, pp. 401-407 (2011)
- 11) 日新 EM 株式会社: EM ステイナー
<http://nisshin-em.co.jp/information/emstainer.html> (最終アクセス: 2017 年 6 月 22 日)
- 12) C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* Vol. 9, pp. 671-675 (2012)
- 13) R Development Core Team: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2005)

Electron Staining using EM Stainer for detecting Viral Infected Bacterial Cells in a Fresh Water Lake (Lake Biwa, Japan)

Shang Shen¹⁾, Taketoshi Kusakabe²⁾ and Yoshihisa Shimizu¹⁾

¹⁾ Research Center for Environmental Quality Management, Kyoto University

²⁾ Department of Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University

† Correspondence should be addressed to Shang Shen

(Research Center for Environmental Quality Management, Kyoto University E-mail: Shang.Shen.48a@st.kyoto-u.ac.jp)

Abstract

Since the regulation of uranyl acetate severely restrict its use for scientific research, we examined an alternative stain (EM stainer; gadolinium triacetate and samarium triacetate) for detecting intracellular viral particles in bacterial cells in Lake Biwa under a transmission electron microscopy. We found that 30 min was enough to stain intracellular viruses and 1~4 x solution (final dil.) staining reagent did not affect to contrast of viral infected cells (VIC). In these staining conditions, intracellular viral images were clearly observed. We also found that longer washing process to remove excess stains worsened the viral images. The above results suggest that EM stainer can be useful as alternative to uranyl acetate for observing viral infected cells in fresh water lakes.

Key words : transmission electron microscopy, EM stainer, staining reagent, viral infected bacterial cells, viruses