

種々の免疫電子顕微鏡法を用いたウシ副腎皮質 アドレノドキシンの局在

奈良県立医科大学第1解剖学教室

秦 野 修

LOCALIZATION OF ADRENODOXIN IN BOVINE ADRENAL CORTEX USING VARIOUS IMMUNOELECTRON MICROSCOPIC TECHNIQUES

OSAMU HATANO

Department of Anatomy, Nara Medical University

Received January 31, 1990

Summary: Adrenodoxin has been reported to be heterogeneously distributed among the mitochondria within a single parenchymal cell of the adrenal cortex by a pre-embedding immunocytochemical method with horseradish peroxidase-labeled Fab' antibodies. Using various immunoelectron microscopic techniques, I re-examined the distribution of adrenodoxin among the mitochondria in the parenchymal cells of bovine adrenal cortex. By post-embedding immunocytochemistry in combination with the protein A-gold technique, gold particles were seen on all the mitochondria examined in the parenchymal cells. By non-embedding immunocytochemistry (immuno-cryoultramicrotomy) in combination with the protein A-gold technique or a peroxidase-labeled streptavidin-biotin method, all of the mitochondria examined in the parenchymal cells were labeled with gold particles or 3, 3'-diaminobenzidine reaction products. By pre-embedding immunocytochemistry examining transverse ultrathin sections prepared from cryostat sections, the mitochondria in contact with the surface of the cryostat sections were stained at a higher percentage than the mitochondria within the cryostat sections. These results suggest that adrenodoxin is distributed homogeneously among the mitochondria within a parenchymal cell and that mitochondrial heterogeneity is caused by uneven antibody penetration into mitochondria in the pre-embedding method. Within the mitochondria in the parenchymal cells, adrenodoxin was stained on the matrix and inner mitochondrial membrane. Adrenodoxin was also stained on the round and electron-dense intramitochondrial bodies, which were often observed in the mitochondria of parenchymal cells in the zona glomerulosa and in the outer layer of the zona fasciculata. By quantitative immunoelectron microscopy, the density of gold particles on mitochondria in the parenchymal cells of the zona glomerulosa was two to three fold lower than that of the zona fasciculata, while that of the zona reticularis was similar to that of the zona fasciculata. The merits and demerits of pre-, post-, and non-embedding immunocytochemistry are discussed.

Index Terms

adrenodoxin, bovine adrenal cortex, immunoelectron microscopy, localization, mitochondrial heterogeneity

緒 言

ステロイドホルモン生合成には、その最初のステップであるコレステロールの側鎖切断を触媒するチトクローム P-450(SCC)をはじめ、種々のチトクローム P-450 が関与している。これらの P-450 には生化学的な遠心分画法により、ミトコンドリアに存在するタイプと、ミクロソームに存在するタイプがあることがわかっている。アドレノドキシン(adrenodoxin)は、NADPH からアドレノドキシンリダクターゼ(adrenodoxin reductase)に伝達された電子を受取り、ミトコンドリアに局在する P-450(P-450(SCC)と P-450(11 β))にその電子を伝達する機能を持っており²⁾、P-450 の酵素触媒機能(ステロイド水酸化反応)の発現に必須のタンパク質である。アドレノドキシンは、分子量 22,000 ダルトンの前駆体としてポリソームで合成され、ミトコンドリア内にはいったのち切断を受けて、分子量 12,000 ダルトンのタンパク質となつて機能することがわかっている³⁾。

生体高分子の細胞内局在を知るには、細胞分画法のほかに、免疫電子顕微鏡法が存在する。免疫電子顕微鏡法は、細胞分画法では避け難い他成分の混入の問題が無く、直接、目で観察可能であるという長所をもっている。免疫電子顕微鏡法には、大きく分けて 3 種類の方法があり、それぞれ、包埋前染色法(pre-embedding 法)⁴⁾、包埋後染色法(post-embedding 法)⁵⁾⁶⁾、無包埋染色法(non-embedding 法)あるいは immuno-cryoultramicrotomy⁷⁾とよばれている。

アドレノドキシンを含めて 4 種のミトコンドリア内 P-450 関連酵素、すなわち P-450(SCC)、P-450(11 β)、アドレノドキシンおよびアドレノドキシンリダクターゼの局在に関しては、4 種共に免疫電子顕微鏡法・包埋前染色法(pre-embedding 法)により、ミトコンドリア内膜に存在し、また、同一細胞内ミトコンドリア間で、これら酵素を大量に含むものからまったく含まないものまで、その存在量においてミトコンドリア間で不均一性(heterogeneity)に富んでいるという報告がなされている⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。別のグループは同様の pre-embedding 法により、P-450(SCC)と P-450(11 β)に関して陽性のミトコンドリアと陰性のミトコンドリア間に形態に違いがないことから、このミトコンドリア間における酵素存在量の不均一性の存在を疑問視している¹¹⁾。pre-embedding 法の欠点として、抗体の浸透性が悪いということがあげられる。抗体は完全な生体膜を通過することが出来ず、固定

された膜においても、特にミトコンドリアのように内膜、外膜の二重の単位膜に囲まれた細胞内小器官では、抗体がこの二重膜を通過することは非常に困難である。そのためミトコンドリア内抗原の局在の解析は、pre-embedding 法において最も困難なものとされている⁴⁾。pre-embedding 法において、この抗体の膜透過性をより良くするために、蛋白質分解酵素により抗体の低分子化を行い、Fab'まで分解し、染色性をあげている報告がなされている⁸⁾¹⁷⁾が、浸透性において完全であるかどうかは疑問視されるところである。一方、他の 2 種の免疫電子顕微鏡法においては、post-embedding 法⁵⁾¹⁸⁾においても、non-embedding 法⁷⁾においても、ミトコンドリア二重膜はウルトラミクロトームによる超薄切片作成の際に切断されるので、ミトコンドリア内抗原は、膜に邪魔されることなく自由に抗原抗体反応が可能であり、抗体の浸透性の問題はまったく無い。

著者は、アドレノドキシンの免疫電子顕微鏡法による局在を解析している際に、このミトコンドリア間におけるアドレノドキシン存在量の不均一性の問題につきあたり、種々の免疫電子顕微鏡を用いることにより、このミトコンドリア間の不均一性の真偽を検討することになった。本論文では、これらの種々の免疫電子顕微鏡法を用いて明らかになったアドレノドキシンの存在様式、および局在部位、また定量免疫電子顕微鏡法によって明らかになった副腎皮質各層におけるアドレノドキシンのミトコンドリア内存在密度の違いについて報告すると共に、それぞれの免疫電子顕微鏡法の持つ長所・短所についても述べる。

材料および方法

動物と組織固定

20 匹の雌ウシ(成牛)の副腎を屠畜場より入手した。ウシの死後 1 時間以内(朝 7 時から 10 時の間)に副腎を 1mm の厚さでスライスし、以下の種々の固定液で 0~4°C で 3~8 時間固定した。固定液は、1)2% glutaraldehyde(GA)-2% paraformaldehyde(PFA)-0.1 M 磷酸緩衝液 pH7.4(PB)、2)2% GA-1% PFA-0.1 M PB、3)1% GA-1% PFA-0.1 M PB、4)0.5% GA-2% PFA-0.1 M PB、5)0.1% GA-2% PFA-0.1 M PB、6)0.05% GA-4% PFA-0.1 M PB、7)0.05% GA-4% PFA-0.21% ピクリン酸-0.1 M PB、8)2% PFA-0.21% ピクリン酸-0.13 M PB、9) P L P 固定液(0.01 M 過ヨウ素酸ナトリウム-0.075 M リジン-2% PFA-0.037 M 磷酸緩衝液 pH 6.

2)を試した。glutaraldehyde濃度(0~2%)およびピクリン酸の添加は、post-embedding法とnon-embedding法における染色強度にほとんど影響を及ぼさなかったが、pre-embedding法においては、わずかに0.05%のglutaraldehyde添加によっても染色強度の著しい減退が認められた。

post-embedding法に用いる組織は、主に0.5% GA-2% PFA-0.1 M PBで固定後、0.1 M PBで1時間洗い、50%, 70%, 90%, 100%エタノールで脱水した後、低温包埋樹脂Lowicryl K4Mに包埋し、紫外線照射を4°Cで3日間行い重合させた¹³⁾。Reichert社 Ultracut Eを用いて作成した超薄切片をニッケルグリッドに拾い、免疫細胞化学的染色を行った。

non-embedding法に用いる組織は、主に2% GA-2% PFA-0.1 M PBで固定後、2.3 M sucrose-50 mM PBに1時間浸透させた後、液体窒素で凍結し、Reichert社 FC4で作成した凍結超薄切片をニッケルグリッドに拾い、免疫細胞化学的染色をおこなった。

pre-embedding法に用いる組織は、主に4% PFA-0.1 M PBで固定後、順に10%, 20%, 30% sucrose-0.1 M PBに浸透させ、クリオスタット切片(20 μ m)を作成し、20mM PB-0.9% NaCl(PBS)で洗った後、PBS中に浮遊させた状態で免疫細胞化学的染色をおこなった。

形態観察だけの通常の電子顕微鏡法に用いる組織は、0.5% GA-2% PFA-0.1 M PBで固定後、更に2%オスミウムで2時間後固定し、エポキシ樹脂(Luweak 812:半井化学)に包埋した。

アドレノドキシンの精製と抗血清の作成

アドレノドキシンは、ウシ副腎皮質ミトコンドリア画分より、Suharaら¹⁴⁾の方法により精製されたものを用いた。アドレノドキシンに対する抗血清は、ウサギを精製アドレノドキシんで、OhashiとOmura¹⁵⁾の方法で免疫したものを用いた。このアドレノドキシン抗血清は、オクタローニ二重拡散法により、精製アドレノドキシンおよび副腎皮質ミトコンドリアの超音波処理抽出液の両者に対して、一本の沈降線を形成した。

protein A-gold液の調整

平均直径5nmと6nmの金コロイドをSlotとGeuze¹⁶⁾の方法で作成し、Roth⁹⁾の方法でprotein A(pharmacia社)と結合させた。調整したprotein A-gold液は、使用前に1.4%のウシ血清アルブミンを含むPBS(BSA-PBS)で希釈して用いた。

post-embedding法における免疫細胞化学的染色

免疫細胞化学的染色は、以前の報告(Hatanoら¹³⁾)を改変したものであり、原理的にRoth⁹⁾の方法と同じであ

る。ニッケルグリッド上の超薄切片をBSA-PBSで10分間の前処理をし、BSA-PBSで100倍希釈した抗アドレノドキシン抗血清で一晩反応させた後、BSA-PBSで洗浄し、0.05% Tween 20 (Sigma)を含むBSA-PBSで50倍希釈したprotein A-gold (5nm)液で2時間反応させ、0.05% Tween 20を含むBSA-PBSで洗浄し、更にBSA-PBSで洗浄、蒸留水で洗浄後、4%酢酸ウランで6分間、Reynolds' lead citrateで90秒間染色し、電子顕微鏡(日本電子JEM1200EX)で観察した。

対照実験として、抗アドレノドキシン抗血清と精製アドレノドキシンとを、1 μ lの抗血清に対して100 μ gの精製アドレノドキシンの割合であらかじめ一晩反応させておいたものを、抗アドレノドキシン抗血清の代わりに用いた。また、別の対照実験として、抗アドレノドキシン抗血清を正常ウサギ血清に代えて反応させた。

non-embedding法における免疫細胞化学的染色

Tokuyasu⁷⁾の方法を少し改変して行った。ニッケルグリッド上の凍結超薄切片をPBSで洗浄、2% gelatinで10分間の前処理をし、0.1% gelatin-10 mM glycine-0.9% NaCl-50mM PB(GGPBS)で洗った後、2% BSA-GGPBSで100倍希釈した抗アドレノドキシン抗血清で1時間反応させた。次に、GGPBSで洗浄し、2% BSA-GGPBSで50倍希釈したprotein A-gold(6nm)液と1時間反応させた。その後GGPBSで洗浄、0.1M PBで洗浄、2% glutaraldehyde-0.1 M PBで20分間固定後、蒸留水で洗浄して、2%中性酢酸ウラン溶液で10分間処理した。ついで蒸留水で洗浄し、0.02%酸性酢酸ウラン-0.2%メチルセルロース-2%ポリエチレングリコール(MW1540)で10分間処理した後、グリッドをループですくいあげ、過剰の液を濾紙で除き乾燥させて、電子顕微鏡で観察した。

pre-embedding法における免疫細胞化学的染色

厚さ20 μ mのクリオスタット切片を、浮遊法により以下の処理を行った。BSA-PBSで10分間の前処理をした後、BSA-PBSで2000倍に希釈した抗アドレノドキシン抗血清と15時間反応させ、その後PBSで洗浄、BSA-PBSで200倍希釈したビオチン化抗ウサギIgG抗体(ABC kit, Vector社)と一晩反応させ、PBSで洗浄、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ(生化学工業)と2時間反応させ、PBSで10分間2回洗浄、50mM Tris-HCl(pH7.6)で1回洗浄後、0.05% 3,3'-diaminobenzidineと0.01% H₂O₂を含む50mM Tris-HCl(pH7.6)液で5分間DAB反応を行い、PBSで洗浄、1% Osmium tetroxideで1時間の後固定後、エタノールで脱水し、エポキシ樹脂(Luweak 812:半井化学)に包埋した。

超薄切片をクリオスタット切片に、平行あるいは垂直に作成し、4%酢酸ウランで20分間、Reinolds' lead citrate で3分間染色し、電子顕微鏡で観察した。

光学顕微鏡レベルの免疫細胞化学

厚さ $1\mu\text{m}$ のLowicryl K4M切片をスライドガラス上に固着させ、post-embedding法における免疫細胞化学的染色の項で述べたprotein A-gold法で染めた後、銀増感(Janssen社のsilver enhancement kitを使用)をおこなった。

定量免疫電子顕微鏡法

post-embedding法で免疫染色した切片の電子顕微鏡写真より、6個の実質細胞のミトコンドリア上の金粒子数を数えた。ミトコンドリアの断面積は、Leitz社の半自動イメージアナライザによって測定し、ミトコンドリア単位断面積($1\mu\text{m}^2$)あたりの金粒子数を計算した。

結 果

1. 光学顕微鏡レベルでの免疫細胞化学

ウシ副腎のLowicryl K4M切片を、ウサギ抗ウシ・アドレノドキシン抗血清、引続きprotein A-gold液で処理した後、銀増感をおこない、アドレノドキシンの光学顕微鏡レベルでの局在を調べると(Fig.1), 球状帯, 束状帯, 網状帯の実質細胞細胞質に銀の沈着が認められた。球状帯の染色強度は、束状帯や網状帯に比べてより弱かった(Fig.1a,b)。副腎被膜や副腎髄質, また副腎皮質内の非実質細胞, すなわち内皮細胞, 結合組織系の線維芽細胞, 血管腔内の細胞などは染色されなかった(Fig.1c)。

2. 包埋後染色法(post-embedding法)

低温包埋樹脂であるLowicryl K4Mに包埋したウシ副腎の超薄切片を、抗アドレノドキシン抗血清、引続きprotein A-gold液と反応させた。金粒子は副腎皮質の三層すべての実質細胞のミトコンドリア上に存在した(Fig.2,4,5)。副腎被膜や副腎髄質, また副腎皮質内の非実質細胞, すなわち内皮細胞, 結合組織系の線維芽細胞, 血管腔内の細胞などの上には金粒子は認められなかった。実質細胞においては、調べた限りすべてのミトコンドリア上に金粒子は認められ、他の細胞内小器官すなわち、細胞核(nuclei)、滑面及び粗面小胞体(smooth and rough endoplasmic reticulum)、一次および二次リソソーム(primary and secondary lysosome)、ペルオキシソーム(peroxisome)、ゴルジ体(Golgi apparatus)、脂肪滴(lipid droplet)、及び細胞質基質上には、金粒子は認められなかった。

2-1 束状帯. 金粒子は調べた限りすべてのミトコンドリア上に認められた(Fig.2)。束状帯のミトコンドリア

は、直径約 $0.6\mu\text{m}$ のほぼ球形をしており、そのクリステは小胞状(vesicular)ないし小管状(tubular)の形態をしている。金粒子はマトリックスとミトコンドリア内膜に認められた(Fig.2)。ミトコンドリア単位断面積あたりの金粒子密度を測定すると(Fig.6)、ミトコンドリア $1\mu\text{m}^2$ 当り平均422.8個の金粒子が存在し、その標準偏差は59.3と小さく、ミトコンドリア間でのアドレノドキシン存在密度は均一であった。pre-embedding法を用いて副腎皮質ミトコンドリアは、アドレノドキシンを大量に含むものから、まったく含まないものまで不均一性に富んでいる⁹⁾と報告されているが、その様な不均一性は認めることができなかった。

金粒子は丸く電子密度の高いミトコンドリア内顆粒上にも認められた(Fig.3a,b,c)。このミトコンドリア内顆粒は束状帯外層部に頻りに認められたが、束状帯内層部にはほとんど認められなかった。大きなミトコンドリア内顆粒では、ミトコンドリア内にいっぱい広がる程の大きな顆粒も存在し、この大きな顆粒上にも同様に金粒子は認められた。大きなミトコンドリア内顆粒は、一見すると脂肪滴の様な印象を与えるが、脂肪滴は、今回用いたLowicryl K4M包埋切片においては、電子密度が低く、ほとんど透明(electron-lucent)である(Fig.3a)ので容易にミトコンドリア内顆粒と区別がついた。金粒子は脂肪滴上には認められなかった(Fig.3a)。大きなミトコンドリア内顆粒を持つミトコンドリアは、ミトコンドリアそのものの直径も他のミトコンドリアに比べて大きいものが多かった。

2-2 球状帯. アドレノドキシンの局在を示す金粒子は、球状帯実質細胞ミトコンドリアのマトリックスとミトコンドリア内膜に認められた(Fig.4a,b)。マトリックスにおける局在は、マトリックスの領域が広いミトコンドリアにおいてははっきりと確認された(Fig.4a,b)。またミトコンドリア単位断面積当りの金粒子密度は、ミトコンドリア $1\mu\text{m}^2$ 当り平均173.5個であり、束状帯ミトコンドリアに比べて2.4分の1の低密度であった(Fig.6)。

アドレノドキシンの局在を示す金粒子は、丸く電子密度の高いミトコンドリア内顆粒上にも認められた(Fig.4a,b)。このミトコンドリア内顆粒は、球状帯実質細胞に非常に多数存在しており、副腎皮質すべての層のうちで最も高頻度に存在していた。また、大きさもミトコンドリア内にいっぱい広がった程の大きなミトコンドリア内顆粒が多数存在していた。この様に大きなミトコンドリア内顆粒を持つミトコンドリアは、通常の形態を持つミトコンドリアに比べて、直径がより大きくなっているものが多かった。ミトコンドリア内にいっぱい広がっ

ている大きなミトコンドリア内顆粒は、一見したところミトコンドリアとは思われず、むしろ脂肪滴に思われるが、1)脂肪滴はこのLowicryl K4M 包埋切片において明るく抜けて見えるのに対して、電子密度が高く黒く見えることと、2)オスミウム後固定、エポキシ樹脂包埋した標本で観察すると、ミトコンドリアの内膜、外膜に相当すると思われる二重の単位膜が存在すること(Fig.8)から、ミトコンドリアであると判断された。

2-3 網状帯。網状帯ミトコンドリアにおける所見は、束状帯ミトコンドリアの所見と似ており、特に束状帯の内層部のミトコンドリアの所見とよく似ていた。アドレノドキシンの局在を示す金粒子は、調べた限りすべての実質細胞ミトコンドリア上に認められた(Fig.5)。ミトコンドリアは、直径約 $0.6\mu\text{m}$ のほぼ球形をしており、そのクリステは、小胞状(vesicular)ないし小管状(tubular)の形態をしており、束状帯ミトコンドリアよりも小管状のクリステが多い。金粒子はマトリックスとミトコンドリア内膜に認められた。ミトコンドリア単位断面あたりの金粒子密度は、束状帯のものとはほぼ同程度であった。丸く電子密度の高いミトコンドリア内顆粒は、束状帯の内層部と同様に非常にまれにしか存在せず、また小さいものであったが、このまれに認められるミトコンドリア内顆粒上には金粒子が認められた。

2-4 対照実験。1)1次抗体として、精製アドレノドキシンの前もって反応させておいた抗アドレノドキシンの抗血清を用いた時、全ての実質細胞ミトコンドリア上、および丸く電子密度の高いミトコンドリア内顆粒上において、金粒子はほとんど存在しなくなった(Fig.7)。他の細胞内小器官および非実質細胞においても、金粒子はほとんど存在しなかった。また、2)1次抗体として、抗アドレノドキシンの抗血清の代わりに正常ウサギ血清を用いた時も、1)と同様に全ての細胞内小器官に、金粒子はほとんど存在しなかった。

3. 包埋前染色法(pre-embedding 法)

3-1.ウシ副腎の $20\mu\text{m}$ のクリオスタット切片を、抗アドレノドキシンの抗血清、ビオチン化抗ウサギIgG抗体、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼの順に反応させ、DAB反応後、エポキシ樹脂包埋したものから超薄切片を作成し、電子顕微鏡で観察すると、副腎皮質実質細胞ミトコンドリアには、アドレノドキシンを大量に含むもの(濃く染色されるもの)や、少量含むもの(薄く染色されるもの)、あるいは全く含まないもの(染色されないもの)等、アドレノドキシンの含有量に関して、同一細胞内ミトコンドリア間で不均一性に富んでいるという結果が得られた(Fig.9a)。これは、先に観察した post-embedding

法において、ミトコンドリア間でアドレノドキシンの含有量が均一であるという結果に、相反するものであった。

3-2.次に、同様に pre-embedding 法によって抗原抗体反応後、エポキシ樹脂包埋したものからクリオスタット切片に垂直に超薄切片を作成し、電子顕微鏡観察すると、クリオスタット切片表面に接したミトコンドリアは70~80%のミトコンドリアがアドレノドキシンの対して強く反応陽性であったのに比べて、切片内部のミトコンドリアは30~40%が反応陽性であり、切片表面に接したミトコンドリアの方が、切片内部のミトコンドリアよりも約2倍多く反応陽性であった(Fig.9b)。

4. 無包埋染色法(non-embedding 法もしくは immuno-cryoultramicrotomy)

4-1.ウシ副腎皮質を固定後、樹脂包埋することなく、直ちに凍結超薄切片を作成し、抗アドレノドキシンの抗血清、引続き protein A-gold と反応させ、電子顕微鏡で観察すると(Fig.10,11)、post-embedding 法と同様に実質細胞の全てのミトコンドリア上に金粒子が認められ、同一細胞内ミトコンドリア間では、金粒子は一樣の標識密度であった(Fig.10a)。ミトコンドリア内では、金粒子はマトリックスとミトコンドリア内膜に認められた(Fig.11a)。また、丸く電子密度の高いミトコンドリア内顆粒上にも金粒子は認められた(Fig.11b)。ゴルジ装置(Fig.10b)、滑面小胞体(Fig.10a)など、他の細胞内小器官には金粒子は認められなかった。

4-2.ウシ副腎皮質の凍結超薄切片に、抗アドレノドキシンの抗血清、ビオチン化抗ウサギIgG抗体、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼの順に反応させ、DAB反応を行った(Fig.12)。この方法は先におこなった pre-embedding 法(3-1)と比べて、同じく凍結切片であり、2次抗体以下の反応方法も同じであるが、反応させる際の切片の厚さが異なっているだけである。すなわち pre-embedding 法のクリオスタット(凍結)切片の場合、 $20\mu\text{m}$ であったが、この凍結超薄切片の場合、約 $0.1\mu\text{m}$ の薄さである。凍結超薄切片上でDAB反応産物は、直径約 50nm の粒状の顆粒(Fig.12b)としてすべてのミトコンドリア上に認められ(Fig.12a)、pre-embedding 法の結果(Fig.9a)と相反するものであった。

考 察

ミトコンドリア間の染色性

著者は、post-embedding 法を protein A-gold 法と組み合わせて用い、ウシ副腎皮質におけるアドレノドキシンの局在を調べた。ウシ副腎皮質を Lowicryl K4M に包埋した超薄切片において、調べた限りすべての実質細胞ミトコンドリア上に、アドレノドキシンの局在を示す金粒子が認められた (Fig.2,4,5)。またミトコンドリア単位断面積当りの金粒子標識密度は、束状帯ミトコンドリア間で均一であった (Fig.6)。同様の結果は、他の親水性樹脂である LR Gold や LR White に包埋したウシ副腎皮質超薄切片においても認められた (未発表データ)。これらの結果は、pre-embedding 法によって報告されている副腎皮質ミトコンドリアは、同一細胞内ミトコンドリア間でアドレノドキシンを大量に含むものからまったく含まないものまで、その酵素含有量において不均一性に富んでいるという報告⁸⁾と相反するものであった。そこで著者も、pre-embedding 法を用いてアドレノドキシンの局在を調べてみると、報告されている様に、ミトコンドリアは、同一細胞内ミトコンドリア間でアドレノドキシンを大量に含むものからまったく含まないものまで、その酵素含有量において不均一性に富んでいるという結果が得られた (Fig.9a)。用いる免疫電子顕微鏡法の違いによるこのような結果の食い違いを統一的に解釈するために、著者は、更に他の免疫電子顕微鏡法を試みた。post-embedding 法⁵⁾と pre-embedding 法⁴⁾の中間の性格を持つと考えられる凍結超薄切片⁷⁾を用いた protein A-gold 法においても、全ての実質細胞ミトコンドリア上に、ミトコンドリア間で均一な密度でアドレノドキシンの局在を示す金粒子が認められた (Fig.10a)。また、更に凍結超薄切片を用いて、pre-embedding 法で用いた染色方法であるところの、1次抗体、ビオチン化2次抗体、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼのあと DAB 反応を行うという染色方法を行った。この方法は pre-embedding 法と同じく凍結切片であり、その切片の厚さが pre-embedding 法の場合 20 μm であるのに対して、凍結超薄切片の場合約 0.1 μm と非常に薄いという違いがあるだけであり、他の反応は同じである。この場合も、post-embedding 法と同様にすべての実質細胞ミトコンドリアに DAB 反応産物が認められた (Fig.12)。これらの結果から、ミトコンドリア間の染色性の不均一性は厚い切片 (20 μm) においてのみ認められ、薄い切片 (約 0.1 μm) においては、樹脂包埋切片、凍結切片を問わず認められないということが明らかになった。副腎皮質ミトコ

ンドリアは、直径約 0.6 μm であるので、20 μm の切片 (pre-embedding 法) の場合は、抗体がミトコンドリア内に到達するために、ミトコンドリアの内膜、外膜の2重の単位膜を通過しなければならない⁴⁾。一方、凍結超薄切片 (non-embedding 法)、あるいは樹脂包埋超薄切片 (post-embedding 法) の場合は、切片の厚さは約 0.1 μm と非常に薄いために、1個のミトコンドリアを約 6 枚に薄切できることになり、このことは、抗体がミトコンドリア内抗原と反応する際、ミトコンドリアの内膜と外膜による障壁がまったくなく、自由に抗原抗体反応が可能であることを意味している。したがって、pre-embedding 法においてアドレノドキシ陰性のミトコンドリアは、本来陰性なのではなく、抗体がそのミトコンドリア内に到達できなかったことに起因して、見かけ上、陰性となるのではないかと考えられる。この仮説を検証するために、pre-embedding 法において、抗原抗体反応をおこなったクリオスタット切片 (20 μm) に垂直に超薄切片を作成し、抗体の切片内部への浸透度を調べてみると、クリオスタット切片表面に接したミトコンドリアは切片内部のミトコンドリアに比べて、約 2 倍の高頻度でアドレノドキシに対して反応陽性であることが明らかになった (Fig.9b)。

Mitani ら⁸⁾¹⁰⁾は、pre-embedding 法を用いて、他のミトコンドリア内 P-450 関連酵素である P-450 (SCC)⁹⁾、P-450 (11 β)⁹⁾ およびアドレノドキシリンダクターゼ⁸⁾ に関しても、ウシ副腎皮質ミトコンドリアは、これら酵素を大量に含むものからまったく含まないものまで不均一性に富んでいると報告している。一方、Geuze ら¹⁷⁾ は non-embedding 法を用いて、ブタ副腎皮質において P-450 (SCC) と P-450 (11 β) がすべてのミトコンドリアに存在していると報告した。著者は、post-embedding 法と non-embedding 法の両法において、ウシ副腎皮質実質細胞のすべてのミトコンドリアが、P-450 (SCC)、P-450 (11 β) およびアドレノドキシリンダクターゼに対して反応陽性であるという所見を得ている (未発表データ)。これらの結果を見てみると、同一細胞内ミトコンドリア間における P-450 関連酵素含有量の不均一性は、pre-embedding 法においてのみ認められ、他の方法 (post-embedding 法や non-embedding 法) では認められないことがわかる。また pre-embedding 法においても、クリオスタット切片表面の、切削によりミトコンドリア内、外両膜が破壊されたミトコンドリアは、切片内部のミトコンドリアより高頻度で染まっている (Fig.9b)。これらの事実から、この不均一性は、pre-embedding 法において抗体のミトコンドリア中への浸透の不均一性に起因す

るのではないかと考えられる。すなわち、pre-embedding法においては、抗原抗体反応を行う前に、切削、凍結、融解、風乾等の物理的破壊、固定、その他のなんらかの原因で、ミトコンドリア内、外両膜に抗体(IgG:約8 nm²⁰)が浸透可能な程度に破壊、亀裂が生じたミトコンドリアだけが、アドレノドキシン、および他のP-450関連酵素に対して反応陽性となるのではないかと考えられた。

ミトコンドリア内局在部位

本研究において、アドレノドキシンの局在部位が、ミトコンドリア内のマトリックスとミトコンドリア内膜であることが示された(Fig.2,4,5,11a)。この成績は、生化学的な細胞分画法による結果²⁾と一致している。過去の報告によると、Mitaniら⁸⁾は、pre-embedding法により束状帯と網状帯を調べて、アドレノドキシンはミトコンドリア内膜にのみ存在していると報告している。しかし、束状帯、網状帯のミトコンドリアはクリステが豊富であり、マトリックスの領域は非常に狭い。また、DAB反応産物は障害物が無いと直径約50 nmにもなる粒状を呈する(Fig.12b)。この大きなDAB反応産物が成長する際、ミトコンドリアのクリステの障壁によってクリステ外面に蓄積したために、クリステに沿ってより濃い反応産物として観察されるのではないかと考えられる。著者は、マトリックスの領域が束・網状帯よりも広い球状帯ミトコンドリアにおいて、アドレノドキシンのマトリックスにおける局在を確認した(Fig.4)。また束・網状帯においても、まれに認められるミトコンドリア内のマトリックスの比較的広い部分において、アドレノドキシンのマトリックスにおける局在を観察した(Fig.2)。以上の局在観察の結果、および他の生化学的データ²⁾からすると、アドレノドキシンは通常状態においてはマトリックスに存在しているが、ミトコンドリア内膜酵素であるP-450(SCC)あるいはP-450(11 β)と相互作用する際に、ミトコンドリア内膜表面に接触しているものと考えられる。

アドレノドキシンの局在を示す金粒子は、丸く電子密度の高いミトコンドリア内顆粒上にも認められた(Fig.3,4,11b)。その特異性は、精製アドレノドキシンを用いた吸収実験によって確かめられた(Fig.7)。このミトコンドリア内顆粒は、Kaiら¹⁹⁾が、ウシ副腎皮質球状帯に大量に存在するものとして報告しているが、著者は、球状帯のみでなく束状帯外層部においても、球状帯に比べて頻度が少ないが、多量に存在することを観察した。このミトコンドリア内顆粒は、その外観が脂肪滴に似ていることから、脂質性のものであろうことが推察されていたが、Kaiら¹⁹⁾は、タンパク質分解酵素を作用させることによ

り消失すること、およびアミドブラックにより染色されることから、タンパク質を含むことを報告した。しかし、その分子の実態はcytochrome c oxidase活性を持たない²⁰⁾こと以外には不明のままであった。今回、著者がこのミトコンドリア内顆粒がアドレノドキシンを含むことを示したことにより、この構造物が、ステロイド水酸化反応の新たな場である可能性が考えられる。この仮説を検証するためには、生化学的には細胞分画法により単離したこのミトコンドリア内顆粒²⁰⁾におけるステロイド水酸化活性を測定すること、または細胞化学的アプローチとしては、ステロイド水酸化に必要な他の構成要素、すなわちアドレノドキシンリダクターゼ、P-450(SCC)、P-450(11 β)、更に可能であればNADPHの存在を、免疫電子顕微鏡法により、もしくは酵素細胞化学的に調べることが必要であろう。このミトコンドリア内顆粒は、副腎皮質内で層によって異なった分布をしており、副腎皮質は各層において異なるステロイドホルモンを産生することが知られている²¹⁾ことと考え合わせれば、ある種のステロイド(例えばアルドステロン)のみを合成する場所であることも推測可能である。

各層におけるミトコンドリア内局在密度

著者は、本研究においてアドレノドキシンのミトコンドリア内局在密度が、副腎皮質各層において異なっていることを観察し、更にミトコンドリア単位断面積当りの標識された金粒子数を数えることにより、束状帯ミトコンドリアは球状帯ミトコンドリアに比べて、2~3倍高密度でアドレノドキシンを含有していることを見つけた(Fig.6)。一方、束状帯ミトコンドリアと網状帯ミトコンドリアのアドレノドキシン含有密度はほぼ同程度であった(Fig.2,5)。球状帯と束・網状帯のミトコンドリアの形態には、はっきりとした違いが認められ、球状帯ミトコンドリアは楕円形で、クリステは層板状ないし小管状であるが、束・網状帯ミトコンドリアはほぼ球形で、クリステは小胞状ないし小管状である²¹⁾²²⁾。ミトコンドリア内膜(クリステ)の量は、束・網状帯ミトコンドリアにおいて球状帯ミトコンドリアよりも多く、今回示された束・網状帯ミトコンドリアは球状帯ミトコンドリアよりアドレノドキシンの含有密度が高いという結果からすると、ミトコンドリア内膜の量は、ステロイド水酸化酵素の量に対応しているのかもしれない。光学顕微鏡レベルでは、ウシ副腎皮質⁹⁾(Fig.1)およびラット副腎皮質²³⁾において、球状帯は束・網状帯に比べてより弱くアドレノドキシンに対して染色される。この層による染色強度の違いの原因として、1)細胞内ミトコンドリア量の違いと、2)ミトコンドリア内アドレノドキシン存在密度の違いの

2つが考えられるが、今回、2)のミトコンドリア内アドレノドキシン存在密度の違いが証明された。

種々の免疫電子顕微鏡法の比較

著者は、ミトコンドリア内酵素であるアドレノドキシンの局在様式を知るために、現在大きく分けて3種存在する免疫電子顕微鏡法の3種とも試みることになったので、それらの特徴、長所、短所を、著者の考えを交えて比較してみると以下のようになる。

1. 試料の観察可能面積：pre-embedding法は、まず光学顕微鏡用切片(クリオスタット切片、ヴィブラトーム切片)において免疫反応をおこなうために、観察可能面積が最も広く、30 mm²程度、場合によっては100 mm²でも可能である。post-embedding法においては約1 mm²までであるが、光学顕微鏡レベルでの銀増感法(Fig.1)と組み合わせると、10 mm²程度まで観察可能である。non-embedding法においては、最も観察可能面積が狭く、約0.3 mm²程度まで観察可能である。

2. 検出感度：凍結切片を用いる pre-embedding法、non-embedding法の方が、樹脂包埋切片を用いる post-embedding法より感度が高い。これは、1)アルコール脱水、樹脂包埋の過程が抗原性を減少させていること、および、2)凍結切片においては切片内部の抗原もある程度反応可能であることによると考えられる。同じ protein A-gold法で凍結超薄切片(non-embedding法)と Lowicryl K4M切片(post-embedding法)におけるアドレノドキシンの検出感度を比べると、凍結超薄切片の方が約1.5倍弱、標識金粒子数が多かった。

3. 解像度：protein A-gold法の場合、IgGを8 nm、protein Aを5 nm、金粒子を5 nmとすると、抗原から最大18 nm以内の解像度をもつ⁹⁾。これは、ペルオキシダーゼを用いたDAB反応産物が、障壁が無い場合、約50 nmである(Fig.12b)のに比べて、より解像度が高い。小さな金粒子を用いると、大きな金粒子を用いる時よりも解像度は高くなると共に、標識密度も高くなる長所があるが、電子顕微鏡下で高倍率にしないと確認できなくなる欠点がある。

4. 定量化：post-embedding法あるいはnon-embedding法において、検出に金粒子を用いると、単位断面積(μm^2)当り、あるいは単位膜長(μm)当りの金粒子数として定量化が可能である。この場合、全く切片内部へは浸透せず切片表面における抗原のみを検出するpost-embedding法の方が、切片内部へ少しではあるが浸透し、切片内部の抗原をも検出するnon-embedding法よりも正確であると考えられる。

5. 固定：1~4% paraformaldehydeに、glutaraldehyde

を含まない固定液と、種々の濃度(0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%)で含む固定液を検討したが、post-embedding法とnon-embedding法では、アドレノドキシン標識密度に顕著な差は認められなかった。一方pre-embedding法では、わずか0.05%のglutaraldehydeでも著しい反応の減退が認められた。このことから、glutaraldehydeによってアドレノドキシンの抗原性そのものは低下しないが、二価のアルデヒドであるglutaraldehydeによって細胞内分子が架橋され、抗体の切片(ミトコンドリア)中への浸透が著しく阻害されるために、pre-embedding法において反応の消失が認められたと考えられた。post-embedding法とnon-embedding法では、切削により切片表面に抗原が露出されるため、反応の減退は認められなかったと考えられる。

6. 抗体の浸透性：post-embedding法とnon-embedding法では、切片(厚さ約0.1 μm)の表面だけ抗原抗体反応可能であればよい。ため、ミトコンドリアを含めすべての細胞内小器官において抗体の浸透性の問題は無いが、pre-embedding法の場合は、切片(厚さ6~20 μm)の内部へ抗体が浸透することが要求されるため、抗体が単位膜(脂質二重層)を通過する際、おそらくどこか膜の破れた(亀裂の入った)部分から進入せざるを得ないために、ミトコンドリアのように二重の単位膜に囲まれた細胞内小器官は、その局在観察が最も困難なものとなる。

7. protein A-goldの浸透性：小さな金粒子(3~5 nm)であっても、protein A-goldの組織への浸透性は、抗体(IgG)、ペルオキシダーゼ標識IgG、FITC標識IgG等と比べて極めて低い。このことは、光学顕微鏡用標本(凍結切片、ヴィブラトーム切片)においてprotein A-gold法の後、銀増感をおこなってみると、切片表面しか反応していないこと、および凍結断面(凍結超薄切片を作成した後のブロック)を用いてprotein A-gold法でアドレノドキシンを検出した際、切削表面にしか金粒子が検出されなかったことからわかる(未発表データ)。protein A(分子量42,000)の大きさは最大で5 nmと推定され⁹⁾、金粒子を3~5 nmとすると、protein A-goldの大きさは8~10 nmとなり、抗体(IgG：分子量150,000)の大きさ(約8 nm⁹⁾)とあまり変わらないので、抗体(IgG)はタンパク質であり分子の形態が可塑的であることが、組織内への浸透性を高めていると思われる。金粒子はその性質上、剛性が高く硬い粒子であることが組織内への浸透性を低くしていると思われる。この金粒子の浸透性の悪さは、最近1 nmの金粒子が利用可能となっており、これによって克服されるかもしれない。

結 論

光学および電子顕微鏡レベルでの種々の免疫組織細胞化学的手法を用いて、ウシ副腎皮質におけるアドレノドキシンの局在および分布を検討したところ以下の結果が得られた。

1) 免疫組織化学的には、球状帯、束状帯、網状帯の実質細胞細胞質にアドレノドキシンの陽性反応が認められ、球状帯細胞質における反応は、束状帯、網状帯に比べてより弱かった。

2) ミトコンドリア間の染色性：① post-embedding 法により、実質細胞のすべてのミトコンドリアがアドレノドキシンを含んでおり、その含有密度はミトコンドリア間で統計的に均一であった。② non-embedding 法 (immuno-cryoultramicrotomy) においても実質細胞のすべてのミトコンドリアがアドレノドキシンを含んでおり、その含有密度は同一細胞内ミトコンドリア間で均一であった。③ pre-embedding 法においては、同一細胞内ミトコンドリア間で濃く染色されるものからまったく染色されないものまで、アドレノドキシンの染色強度が不均一性に富んでいた。しかし、クリオスタット切片の切片表面に接したミトコンドリアは切片内部のミトコンドリアに比べて約2倍、染まるミトコンドリアの割合が高く、このミトコンドリア間の不均一性は、pre-embedding 法における抗体の浸透の不良に起因することが明らかになった。これらの結果は、同一細胞内ミトコンドリア間で P-450 関連酵素の含有量は均一であることを支持していた。

3) ミトコンドリア内局在部位：アドレノドキシンは副腎皮質実質細胞ミトコンドリアのマトリックスおよびミトコンドリア内膜に局在していた。また、球状帯、束状帯の外層部のミトコンドリア内に頻りに認められる丸く一様に電子密度の高い顆粒中にも、アドレノドキシンは局在していた。

4) 各層におけるミトコンドリア内局在密度：ミトコンドリア単位断面積当りのアドレノドキシンの含有密度は球状帯において、束・網状帯よりも低く、定量免疫電子顕微鏡法によると、球状帯ミトコンドリアにおいて束状帯ミトコンドリアの2~3分の1であった。

本研究の要旨は、第92回日本解剖学会総会(1987年4月)および第44回日本電子顕微鏡学会学術講演会(1988年6月)において発表した。

本研究は、文部省科学研究費補助金・重点領域研究・チトクロームP-450の分子生物学(no.63635505, no.016355

09)によって補助を受けた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました高橋彰教授に深謝を捧げると共に、御校閲、御助言を賜りました生化学教室神谷知彌教授、第2解剖学教室山本浩司教授に深謝致します。またアドレノドキシンの抗血清および精製アドレノドキシンを御供与くださった九州大学大村恒雄教授、相良康弘博士に深謝致します。

文 献

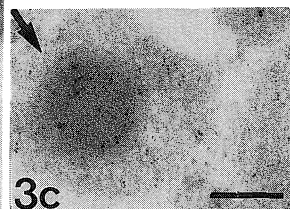
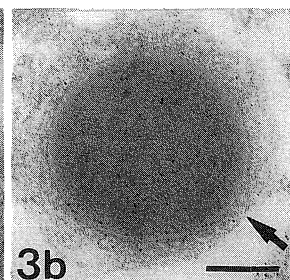
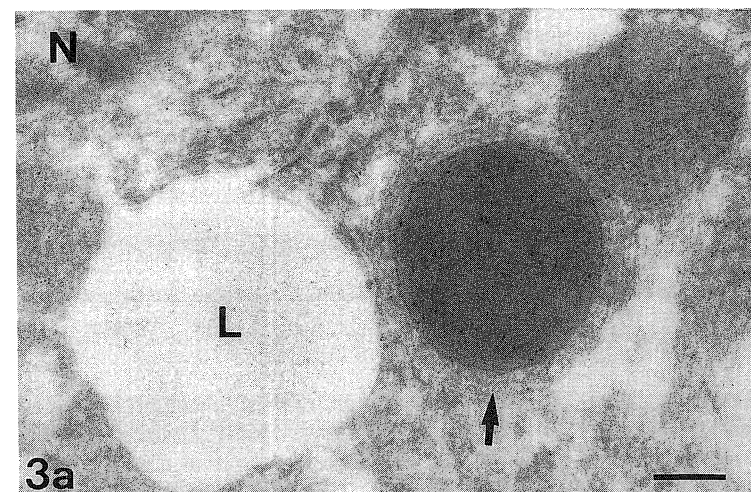
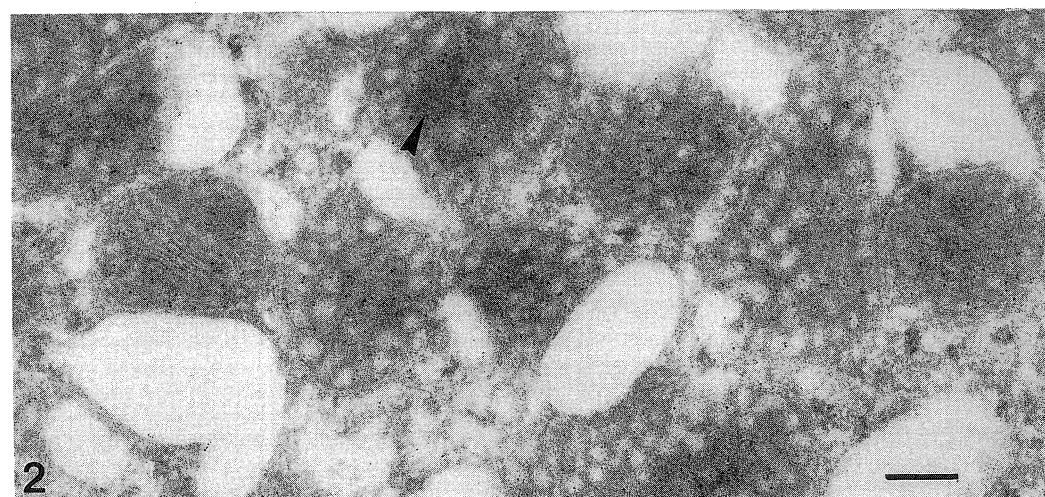
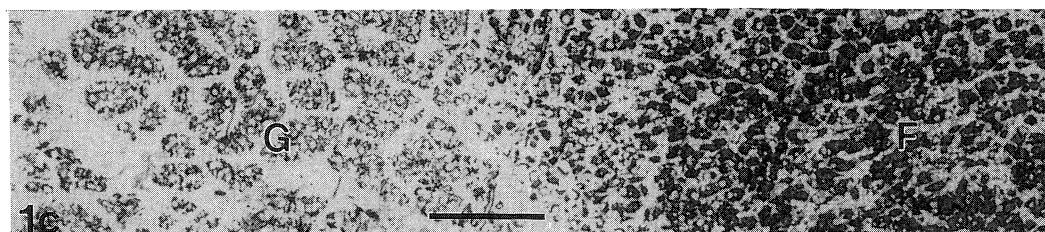
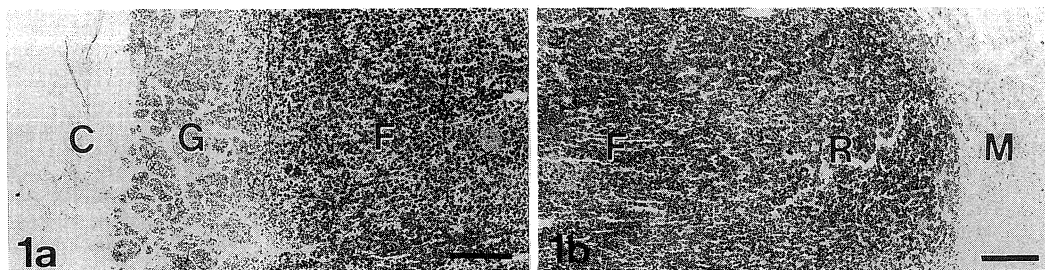
- 1) Sato, R. and Omura, T.: Cytochrome P-450. Kodansha, Tokyo, 1978.
- 2) Omura, T., Sanders, E., Estrabrook, R.W., Cooper, D.Y. and Rosenthal, O.: Isolation from adrenal cortex of a nonheme iron protein and flavoprotein functional as a reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome P-450 reductase. Arch. Biochem. Biophys. 117: 660, 1966.
- 3) Nabi, N. and Omura, T.: In vitro synthesis of adrenodoxin and adrenodoxin reductase: Existence of a putative large precursor form of adrenodoxin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 97: 680, 1980.
- 4) 渡辺慶一, 中根一穂, 編: 酵素抗体法. 学際企画, 東京, p137-167, 1985.
- 5) Roth, J.: The protein A-gold (pAg) technique—A qualitative and quantitative approach for antigen localization on thin section. *in* Techniques in immunocytochemistry (Bullock, G.R. and Petrusz, P., eds.). vol 1, Academic Press, New York, p108-133, 1982.
- 6) Roth, J., Bendayan, M. and Orci, L.: Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A-gold complex. J. Histochem. Cytochem. 26: 1074, 1978.
- 7) Tokuyasu, K.T.: Immuno-cryoultramicrotomy. *in* Immunolabeling for electron microscopy (Poak, J.M. and Varndell, I.M., eds.). Elsevier, Amsterdam, p71-82, 1984.
- 8) Mitani, F., Ishimura, Y., Izumi, S. and Watanabe, K.: Immunohistochemical localization of adrenodoxin and adrenodoxin reductase

- in bovine adrenal cortex. *Acta Endocrinol.* **90**: 317, 1979.
- 9) **Mitani, F., Shimizu, T., Ueno, R., Ishimura, Y., Izumi, S., Komatsu, N. and Watanabe, K.**: Cytochrome P-450_{11 β} and P-450_{scc} in adrenal cortex: Zonal distribution and intramitochondrial localization by the horseradish peroxidase-labeled antibody method. *J. Histochem. Cytochem.* **30**: 1066, 1982.
 - 10) **Mitani, F., Iizuka, T., Ueno, R., Ishimura, Y., Kimura, T., Izumi, S., Komatsu, N. and Watanabe, K.**: Regulation of cytochrome P-450 activities in adrenocortical mitochondria from normal rats and human neoplastic tissues. *Adv. Enzyme Regul.* **20**: 213, 1982
 - 11) **Ishimura, K., Yoshinaga, T., Fujita, H., Sugano, S., Okamoto, M. and Yamano, T.**: Light and electron microscopic immunocytochemistry on the localization of cytochrome P-450 of the side chain cleavage system and of cytochrome P-450 of 11 β -hydroxylase in the bovine adrenal cortical cells. *Arch. Histol. Jpn.* **48**: 541, 1985.
 - 12) **Beesley, J.E.**: Recent advances of microbiological immunocytochemistry. *in* Immunolabelling for electron microscopy (Polak, J. M. and Varndell, I.M., eds.). Elsevier, Amsterdam, p289-303, 1984.
 - 13) **Hatano, O., Karasawa, R., Matsumoto, H., Tohno, S., Tohno, Y. and Takakusu, A.**: Application of post-embedding immunostaining method to electron microscopic demonstration of phenobital-inducible cytochrome P-450 in guinea pig liver. *J. Nara Med. Ass.* **36**: 687, 1985.
 - 14) **Suhara, K., Takemori, S. and Katagiri, K.**: Improved purification of bovine adrenal iron-sulfur protein. *Biochem. Biophys. Acta* **263**: 272, 1972.
 - 15) **Ohashi, M. and Omura, T.**: Presence of the NADPH-cytochrome P-450 reductase system in liver and kidney mitochondria. *J. Biochem.* **83**: 249, 1978.
 - 16) **Slot, J.W. and Geuze, H.J.**: A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *Eur. J. Cell Biol.* **38**: 87, 1985.
 - 17) **Geuze, H.J., Slot, J.W., Yanagibashi, K., McCracken, J.A., Schwartz, A.L. and Hall, P. F.**: Immunogold cytochemistry of cytochromes P-450 in porcine adrenal cortex. Two enzymes (side-chain cleavage and 11 beta-hydroxylase) are co-localized in the same mitochondria. *Histochemistry* **86**: 551, 1987.
 - 18) **Kai, O., Fujioka, T. and Yasuda, M.**: Intramitochondrial bodies in bovine adrenocortical cells. *Cell Tissue Res.* **185**: 69, 1977.
 - 19) **Kai, O., Fujioka, T. and Yasuda, M.**: Light and electron microscopic studies of intramitochondrial bodies in bovine adrenocortical cells by proteolytic digestion. *Histochemistry* **56**: 217-221, 1978.
 - 20) **Kai, T., Fujioka, T. and Yasuda, M.**: Isolation of intramitochondrial bodies in bovine adrenocortical cells by density gradient centrifugation. *Histochemistry* **59**: 305, 1979.
 - 21) **Nussdorfer, G.G.**: Cytophysiology of the adrenal cortex. *Int. Rev. Cytol.* **98**: 1-394, 1986.
 - 22) **Fujita, H.**: Adrenal cortex. *in* Functional morphology of endocrine glands (Kurosumi, K. and Fujita, H., eds.). Igaku-Shoin, Tokyo, p299-342, 1974.
 - 23) **Baron, J., Redick, J.A., Kapke, G.F. and Van Orden, L.III**: Immunocytochemical localization of adrenal ferredoxin and distribution of adrenal ferredoxin and cytochrome P-450 in the rat adrenal. *Biochem. Biophys. Acta* **540**: 443, 1978.

Explanations of figures.

- Fig. 1. Light-microscopic immunocytochemistry of adrenodoxin in bovine adrenal cortex. Semithin sections of Lowicryl K4M-embedded specimens were stained for adrenodoxin using protein A-gold technique followed by silver enhancement.
- a,b. The parenchymal cells in zona glomerulosa(G), zona fasciculata(F), and zona reticularis(R) are stained for adrenodoxin. The capsules(C) of the glands and the cells of the medulla(M) are unstained. x40. Bar=0.2 mm.
- c. A higher magnification of Fig.1a. The cytoplasm of the parenchymal cells is stained for adrenodoxin. Non-parenchymal cells are not stained. x150. Bar=0.1 mm.
- Fig.2~5 and 7. Electron-microscopical localization of adrenodoxin in bovine adrenal cortex by the post-embedding method in combination with the protein A-gold technique.
- Fig. 2. Parenchymal cells of the zona fasciculata. All the mitochondria are labeled for adrenodoxin. In the mitochondria, matrix (arrowhead) and inner mitochondrial membrane are labeled. x48000. Bar=200 nm.
- Fig.3a~c. Parenchymal cells of the zona fasciculata. Round and electron-dense intramitochondrial bodies (arrows) are labeled for adrenodoxin. Nuclei(N), Lipid droplet(L), and rough endoplasmic reticulum are not labeled. x48000. Bar=200 nm.
- Fig.4a,b. Parenchymal cells of the zona glomerulosa. The matrix of the mitochondria (arrowheads), inner mitochondrial membrane, and electron-dense intramitochondrial bodies (arrows) are labeled for adrenodoxin. Nuclei(N).
- a. x36000. Bar=200 nm. b. x48000. Bar=200 nm.
- Fig. 5. Parenchymal cells of the zona reticularis. All the mitochondria are labeled for adrenodoxin. In the mitochondria, matrix and inner mitochondrial membrane are labeled. Nuclei(N). x48000. Bar=200 nm.
- Fig. 6. Histogram of densities (μm^{-2}) of gold particles on each mitochondrion of parenchymal cells in the zona fasciculata and the zona glomerulosa. Mean \pm S.D. of densities: zona fasciculata, 422.8 ± 59.3 (N=10); zona glomerulosa, 173.5 ± 42.8 (N=12). $P<0.001$. Gold particles are homogeneously distributed among the mitochondria in each zone. Density of gold particles on the mitochondria in the zona fasciculata is two to three fold higher than that in the zona glomerulosa.
- Fig.7a,b. Cytochemical control. Parenchymal cells of the zona fasciculata were treated with pre-adsorbed anti-adrenodoxin serum followed by protein A-gold. Gold particles are not seen on the typical mitochondria, the mitochondria with electron-dense intramitochondrial bodies, and the intramitochondrial bodies themselves. x48000. Bar=200 nm.
- Fig. 8. Intramitochondrial bodies of osmium tetroxide post-fixed and epoxy resin-embedded specimens.
- a. Zona fasciculata. Mitochondrial cristae as well as outer and inner mitochondrial membrane are clearly seen in the mitochondria that have intramitochondrial bodies. x40000. Bar=200 nm.
- b. Zona glomerulosa. Large intramitochondrial bodies (arrow) fill almost all the internal space of the mitochondria. The outer and inner mitochondrial membranes are clearly seen (arrowheads). x40000. Bar=200 nm.
- Fig. 9. Parenchymal cells of the zona fasciculata stained for adrenodoxin by the pre-embedding method.

- a. Stained and unstained mitochondria are intermingled within a single parenchymal cell. x18000. Bar=500 nm.
- b. Transverse ultrathin sections were prepared from cryostat sections. The arrows show the mitochondria in contact with the surface of the cryostat section. x10800. Bar=1 μ m.
- Fig.10,11. Parenchymal cells of the zona fasciculata stained for adrenodoxin by immunocytochemistry in combination with the protein A-gold technique.
- Fig. 10. a. All of the mitochondria are stained. The smooth endoplasmic reticulum is unstained. x27000. Bar=300 nm.
- b. The Golgi apparatus (arrowheads) are unstained. x36000. Bar=300 nm.
- Fig. 11. a. The matrix and the inner mitochondrial membrane are labeled with gold particles. x54000. Bar=200 nm.
- b. Intamitochondrial bodies are labeled. x48000. Bar=200 nm.
- Fig. 12. Parenchymal cells of the zona fasciculata stained for adrenodoxin by immunocytochemistry in combination with peroxidase-labeled streptavidin-biotin method.
- a. All of the mitochondria are stained. x7200. Bar=1 μ m.
- b. 3,3'-diaminobenzidine reaction products are seen as electron-dense particles with a mean diameter of 50 nm. x24000. Bar=500 nm.



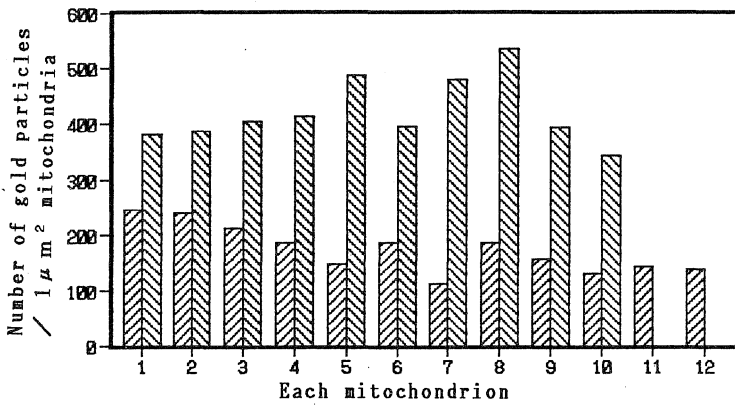
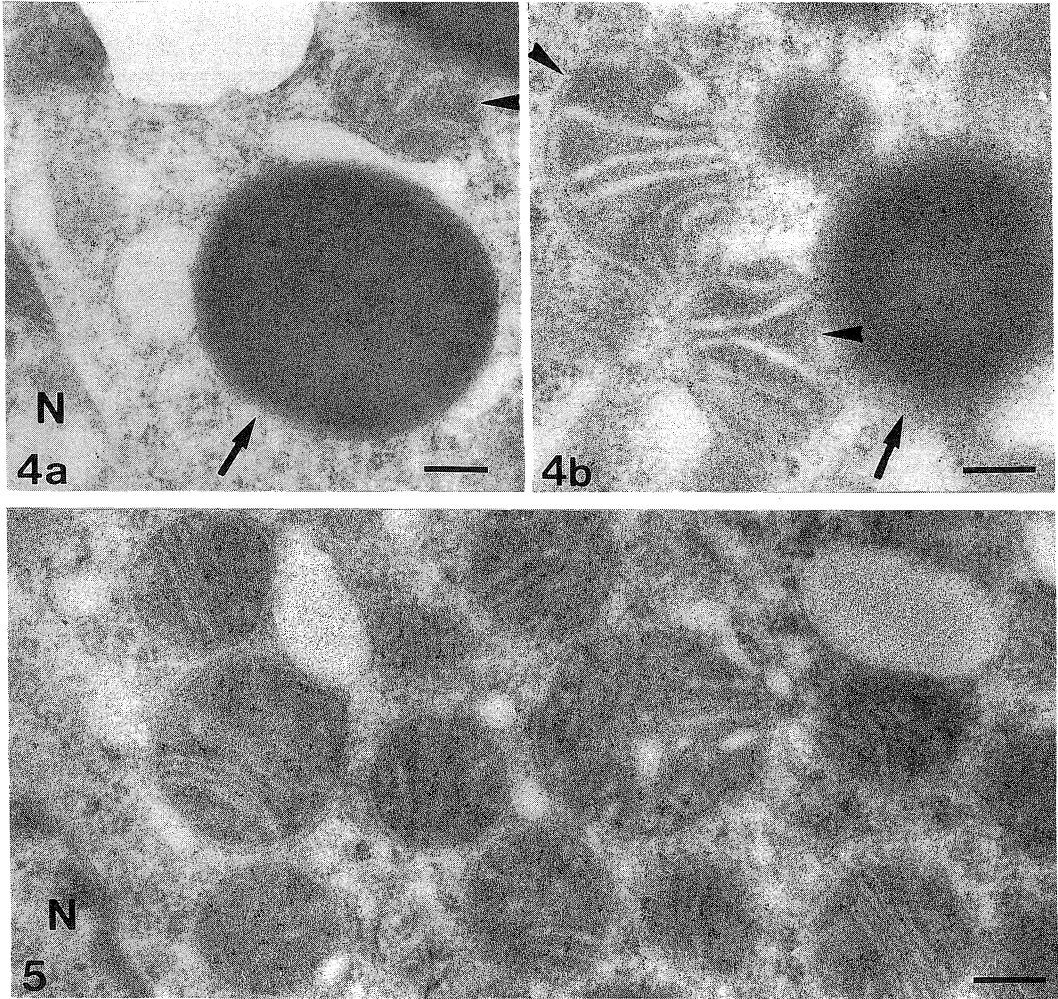


Fig.6. Histogram of densities of gold particles on each mitochondrion in zona glomerulosa (▨) and zona fasciculata (▧).

