

植物と微生物の攻防を電子顕微鏡で捉えるには？

佐藤繩子, 成川篠崎苗子, 豊岡公徳

国立研究開発法人理化学研究所 環境資源科学研究中心

質量分析・顕微鏡解析ユニット

230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

How to take electron micrographs of fighting plants vs microbe

Mayuko Sato, Naeko Shinozaki-Narikawa, Kiminori Toyooka

RIKEN Center for Sustainable Resource Science

Suehiro-cho 1-7-22, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

Key words: CLEM, Electron microscopy, FE-SEM, GFP, TEM

DOI: 10.24480/bsj-review.8a1.00110

1. はじめに

光学顕微鏡技術の発達により、蛍光タンパク質や蛍光色素を用いて表皮細胞などに感染した細菌や菌、ウイルスを生きた状態で明確に捉えられるようになり、植物体への微生物の侵入経路や、植物と微生物との攻防が可視化できるようになりつつある。さらにより微細なレベルの形態を捉えるためには、電子顕微鏡法(電顕)が最適なツールである。電顕は生命現象を細胞・オルガネラレベルの高分解能で捉えることに長けている一方、器官・組織レベルの広い領域から、植物と微生物の攻防の場を探し出すことは不得手である。当研究室では、植物の細胞内生命現象を器官・組織レベルの広域に渡って高解像度で捉えるために、ミクロからマクロを繋ぐ二つの技術を開発している。この二つの技術、(1)器官・組織レベルの広域に渡る透過電顕像の取得・画像統合を可能とした「広域透過電顕像取得システム」と、(2)GFPなどの蛍光タンパク質で標識した細胞・オルガネラの超微形態を、高分解能走査電顕で可視化する「蛍光タンパク質-走査電子顕微鏡法」について解説し、植物と微生物との攻防を電顕レベルで可視化するための方法を議論したい。

2. 広域透過電顕像取得システム

これまで筆者らが植物の様々な器官・組織・細胞の電顕観察を行ってきたなかで、器官・組織全体をカバーする超微細構造の報告が少ないことが常に問題となつた。そのため、組織ごとに細胞やオルガネラの形態が大きく異なる場合の微細構造比較、野生型と変異型間での微細構造比較、また環境変化に伴うオルガネラ変化などの電顕解析が、難しいことがあつた。そのような経緯から、広域的に器官・組織・細胞の電顕像を撮影するシステムの必要性を感じていた。

近年では電動ステージやデジタルカメラが当たり前の時代になったが、2000年頃までは試料X-Yステージの移動が手動式回転ノブのみであつたり、画像撮影はフィルムカメラのみであつたりと、アナ

ログ制御の透過電子顕微鏡(TEM)が主であった。近年、電顕観察の作業の多くがデジタル制御可能になったことで、TEM像を自動撮影する環境が整った。我々が使用しているTEM(JEOL JEM-1400)は、電動X-Yステージを備え、偏向コイルで電子ビームをコントロールすることで最大縦5枚×横5枚の計25枚を撮影し、像を結合するオートモンタージュ撮影機能を標準装備している。しかし、偏向コイルによる制御のみでは、ごく限られた領域しか撮影できないため、より広い領域を撮影する場合はステージを移動させる必要がある。そこで画像情報解析を専門とする研究者と顕微鏡企業の協力により「広域TEM像自動取得システム」の開発を行った(豊岡2014)。

広域TEM像自動取得システムは、(1)広域TEM像自動撮影システムと、(2)広域TEM像タイリングプログラムで構成されている(図1)。(1)は、外部制御コンピューターによりTEM本体をスクリプト制御し、X-Yステージを動かしながら、電顕像を連続的に「自動撮影」するシステムである(図1左)

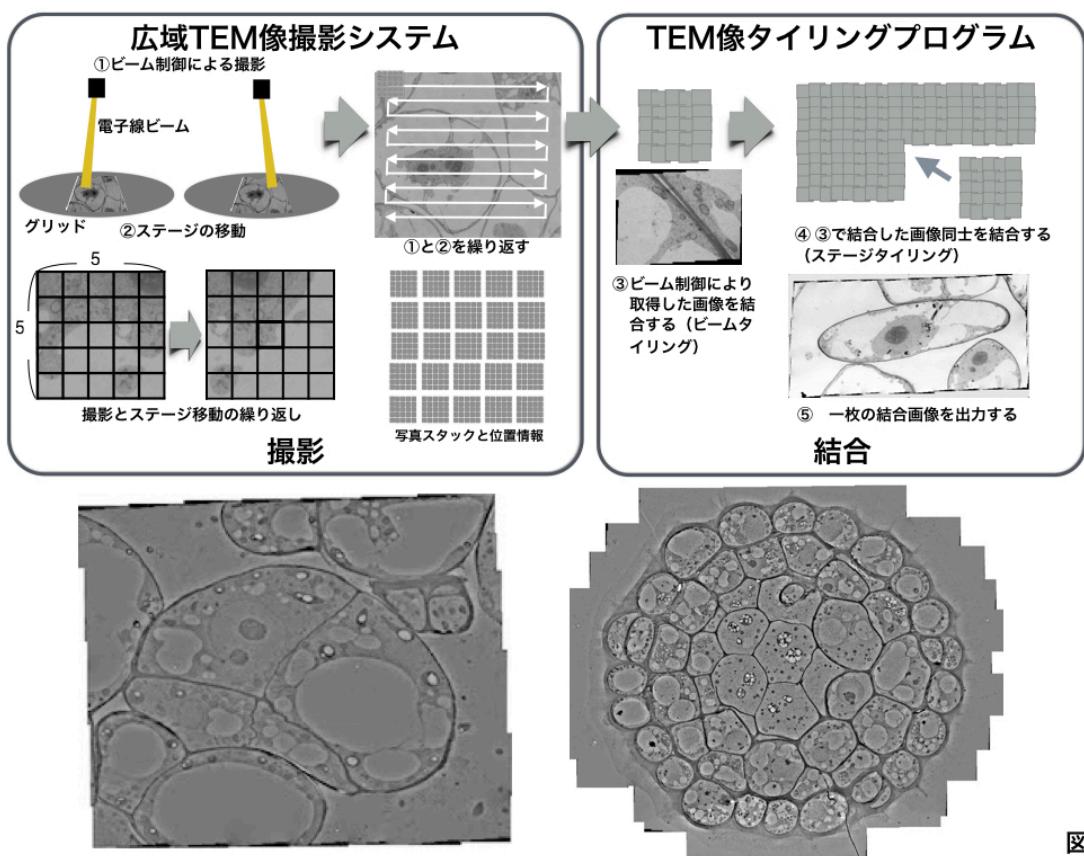


図1

上)。(2)は、撮影したこれら大量の連続画像を、位置情報とのりしろ部分の画像情報を用いて「自動結合」し、連結した1枚の大きな写真を生成するプログラムである(図1右上)。このシステムを用いて、タバコ培養細胞BY-2株やシロイヌナズナの各器官の、ギガピクセルクラスの広域TEM像取得に成功しており、例えば、BY-2株の増殖期および定常状態期におけるオルガネラの超微形態変化を明らかにしている(Toyooka et al. 2014, 2016)。また、シロイヌナズナ培養細胞(図1左下)やシロイヌナズナ根端組織(図1右下)などを広域撮影することで、細胞内オルガネラの分布の違いも分かりつつある。

近年、連続試料切削面を走査電顕で観察することにより、広域かつ3次元の電顕像が得られるようになってきた(Lidke & Lidke 2012)。しかし、非常に高価な機器が必要であり、いかに像のコントラストを上げるか、また、膨大な画像データをどのように扱うかなど問題点も多い。広域TEM像撮影シ

ステムは、CCD カメラと電動ステージを搭載した TEM であれば、我々が開発したスクリプトを実行するだけで広域に渡って TEM 画像を取得できる。また、このような広域撮影システムを搭載した TEM が各顕微鏡メーカーからも販売され始めており、高解像度かつ広域での電顕像撮影は容易になってきている。

植物と微生物の相互作用の“場”は領域が限られる。例えば、炭疽病菌の吸器が表皮細胞に侵入しているところを TEM 像として見たい場合は、通常の TEM 観察ではその“場”を探し出すことは容易ではないが、高解像度かつ広域で撮影することで、吸器と細胞が接しているその場を捉えられる可能性が高くなると期待される。また、広域で撮影することで、侵入・感染した微生物周辺の植物細胞や組織の状態を、全体的に把握することが容易となるであろう。

3. 蛍光タンパク質-走査電子顕微鏡法

近年、網羅的な解析や遺伝学による機能解析などにより様々な遺伝子が見出され、それら遺伝子産物を蛍光タンパク質で標識することで、容易にタンパク質の細胞内局在や動態を観察できるようになった。そして、既知のオルガネラ局在タンパク質との共発現解析や阻害剤等の解析により、標的タンパク質が局在するオルガネラを推定することが可能になってきている。我々は、標的タンパク質-蛍光タンパク質の融合タンパク質の細胞内局在を電顕レベルで解析したい場合、抗 GFP 抗体など蛍光タンパク質に対する抗体を用いた免疫電顕法により推定している。しかし、免疫電顕法で反応のあつた構造物が、本当に蛍光を発するものと同じ構造体であるか断定することは難しく、推定することしかできないのが実状である。“推定”から“特定”にステップアップするためには、GFP などの蛍光を観察したのと全く同じ試料を電顕観察すべきである。それを可能とする技術が、光顕像と電顕像で相關を取る光電子相関顕微鏡法(Correlative light and electron microscopy: CLEM 法)である(de Boer et al. 2015)。

これまでに CLEM 法のプロトコルや手法をまとめた多くの本が出版されている(Muller-Reichert & Verkade 2014)が、以下の手順で行われることが一般的である。まずアドレス付き格子模様のあるカバーガラス上に細胞を接着させ、蛍光顕微鏡により GFP または蛍光二次抗体の蛍光像を撮影しておく。ガラス接着したまま、細胞を固定・脱水し、エポキシ樹脂で倒立包埋する。アドレスを参考に、蛍光観察したのと同一箇所で超薄切片を作製し、TEM 撮影する方法である(Liss & Hensel 2015)。近年、CLEM 解析機器の技術革新も進み、蛍光顕微鏡ユニットが搭載された TEM や、光顕と電顕で試料ホルダーを共通化することでシームレスに相關像を得られる CLEM 機器などが、各メーカーから発売され、以前に比べ容易に CLEM 解析ができるようになってきている。しかし、これらのアプリケーションや機器の多くは、ガラスに接着しない植物組織や植物培養細胞の解析には適さないものが多い。例えば、シロイヌナズナの葉を蛍光観察したのち、観察した同じ場所を TEM で観察するためには、サンプルをスライドガラスなど何か基準となるものに対して動かないよう固定し、樹脂包埋した後に切削する必要があるが、それは困難である。

TEM は薄く切った樹脂切片を通過してくる電子線の影を観察するのに対し、走査電子顕微鏡(SEM)は、絞った電子線で試料表面上を走査し、試料から放出される電子線を検出する顕微鏡である。これまで SEM は、試料表面の微細構造観察に用いられることがほとんどで、植物研究においては、葉や茎頂など器官の形態観察に用いられることが多かった。SEM の中でも、電界放出形走査電顕(Field

emission SEM:FE-SEM)は、電界放出形(FE)電子銃を用いることにより、高分解能で数十万倍の倍率での観察が可能である。最近の FE-SEM は、20-30kV の高加速電圧で高分解能像を得られることは今までと変わらないが、0.1-1kV といった極低加速電圧条件下でも大きなプローブ電流が得られ、明るく SN に優れた画像観察が可能になった。また弱いシグナルでも検出可能な検出器も搭載され、通常の2次電子検出器・反射電子検出器の他、YAG 結晶を用いた高感度の反射電子検出器なども搭載できるようになっている。観察条件と試料調製法を工夫することで、様々な観察が可能となっている。以上のような技術革新により、生物試料の樹脂切片観察にも、SEM を応用できるようになってきた。

そこで我々は、蛍光を発する構造体の超微形態を FE-SEM で捉え相関をとる CLEM 技術「蛍光タンパク質-走査電子顕微鏡法」を考案した(図2上, 豊岡2016)。はじめに蛍光タンパク質 GFP を発現した植物試料をアルデヒド固定し、脱水・包埋後、厚さ 1μm 程度の準超薄切片を作製する。その切片をアドレス付きの格子模様が印刷されたカバーガラスに載せ、共焦点レーザー顕微鏡により蛍光像を撮影する。その後、切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色する。同じ切片の蛍光像撮影箇所を FE-SEM により撮影し、蛍光像と電顕像を重ね合わせることで、蛍光を放つ細胞・オルガネラを特定する。今までの CLEM 法と大きく異なる点は、樹脂切片から蛍光タンパク質の蛍光を検出する点、TEM ではなく FE-SEM を用いる点である。TEM では、観察可能な切片サイズが制限される(最大で 1 x 2mm 程度)が、SEM ではより大きな試料でも観察可能である。また、電子線を透過させる TEM 観察法と異なり、超薄切片(厚さ 60-80nm)より厚い樹脂切片でも、容易に観察できる。これにより、

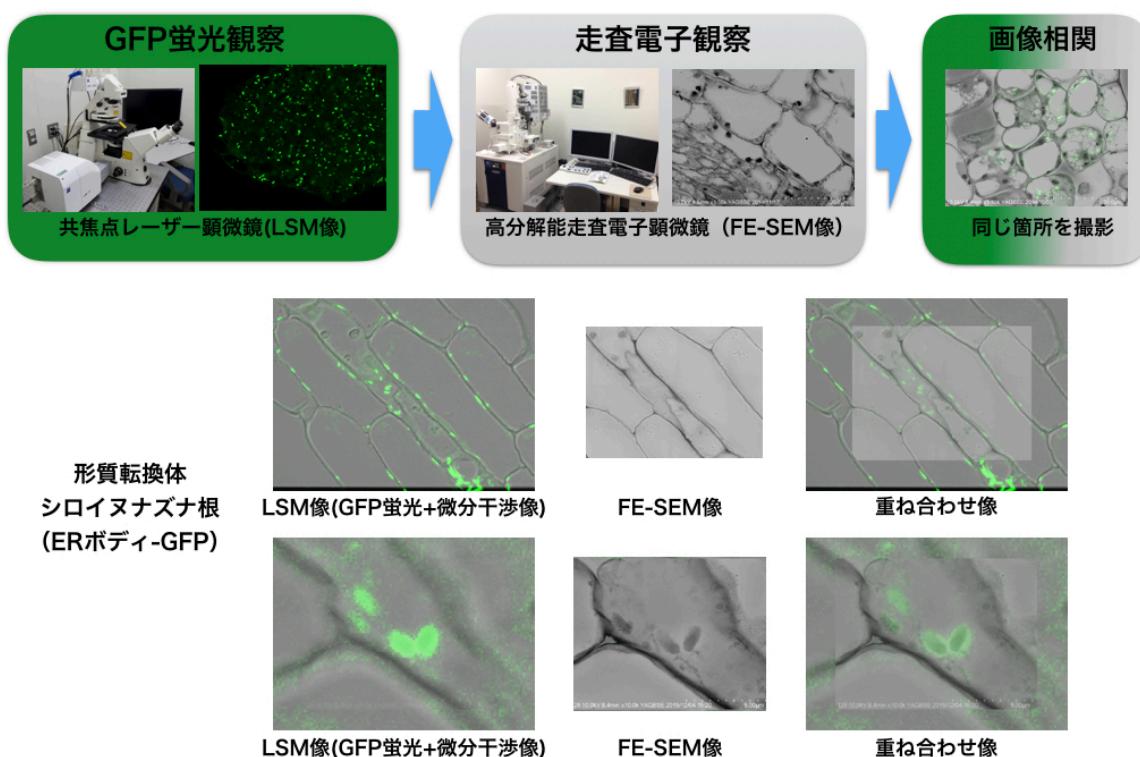


図2

十分な強度の蛍光を検出できる厚さ 1μm 以上の切片での解析が可能となっている。

これまでに我々は、広域 TEM 像自動取得システムで、野生型シロイヌナズナ側部根冠に多数の小

さな ER ボディ様の構造体があることを見出していた。しかし、それが本当に ER ボディであるかは、形態から推定するしかなかった。一方、小胞体残留シグナル HDEL 配列を C 末端に結合させた GFP を用いて、ER ボディを可視化したシロイヌナズナ株(Yamada et al. 2008)においても、小さな蛍光ドットが側部根冠に多数観察された(Toyooka et al. 2015)。この GFP 蛍光で可視化された ER ボディを CLEM 解析することで、広域 TEM 像で見られた ER ボディ様構造が本当に ER ボディであるか、特定できるのではないかと考えた。GFP-HDEL を発現するシロイヌナズナの根を固定・脱水後にアクリル系樹脂に包埋し、準超薄切片(厚さ 1 μm)を作製した。オスミウムコートしたカバーガラス(格子付き)に切片を載せ、共焦点レーザー顕微鏡 Zeiss LSM700 で蛍光像(LSM 像)を撮影した。電子染色後、同じ切片の GFP 蛍光のあった箇所を FE-SEM(Hitachi SU8220)で撮影した。その結果、側部根冠の蛍光ドットは、紡錘形の ER ボディ様構造と一致することが実証できた(図 2 下)。

このように蛍光タンパク質が局在するオルガネラの超微形態を、直接可視化できるようになってきた。本稿で紹介した CLEM 法は、免疫電顕法と比べて高度な技術を要する作業が含まれないため、比較的短時間で簡便かつ正確に GFP が局在する細胞内微細構造を特定できる。最近では、YFP や RFP など、GFP 以外の蛍光タンパク質でも CLEM 解析が可能であることが確認できている。蛍光タンパク質で微生物やウイルス、または感染に応答している植物細胞をラベルすることで、侵入しつつある微生物または防御している細胞を広大な器官・組織から探し出すことができる。さらに蛍光の見られた箇所を直接、電顕で観察することで、今までより容易に微生物と植物の攻防を捉えられるであろう。

4. 今後の展望

広域 TEM 像自動取得システムにより、難しかった広域 TEM 像を簡便かつ短時間で取得できるようになった。取得した広域 TEM 像は、器官や組織におけるオルガネラの分布解析だけでなく、微生物の感染部位のような局所的な観察にも有用であろう。そして、蛍光タンパク質-走査電顕相関顕微鏡法により、GFP 等の蛍光タンパク質でラベルした微生物や細胞を用いることで、植物の器官・組織における微生物と植物細胞の相互作用を、高分解能かつ広域に渡って捉えられるようになることが期待される。さらに、多様なバイオ画像を分類することのできるプログラム CARTA: Clustering-Aided Rapid Training Agent (Kutsuna et al. 2012) を広域 TEM 像に応用し、ミトコンドリアやゴルジ体など特定のオルガネラを半自動的に検出することも可能となってきている(Higaki et al. 2015)。近い将来、このようなプログラムを用いて、広域 TEM 像や CLEM 像から、微生物や感染部位などを自動抽出することが可能となるかもしれない。

筆者らは日立ハイテク社と共同で、光電子相関顕微鏡システム“*MicroCLEM*”を開発した。これは、FE-SEM の電動ステージに載せた試料の電顕像を観察しながら、事前に撮影済みの光顕もしくは蛍光像と、容易に位置合わせ、像の重ね合わせができる機能をもつ。今後さらなる改良を加えることで、今まで以上に簡便かつ正確な相関像を得られるようになると考えている。さらに、試料を瞬時に凍らせて固定する高压凍結技法(Toyooka et al. 2009)を、本 CLEM 技術や広域 TEM 像取得法と組み合わせることで、生きている状態により近く、蛍光標識オルガネラの広域かつ高解像度の可視化ができるようになしたいと考えている。

本稿で述べた広域 TEM 像自動取得法と蛍光タンパク質-走査電顕相関顕微鏡法、その他の様々な技

法を組み合わせて多角的な視点からの超微形態観察を行うことで、微生物と植物の攻防を捉えられるだけでなく、様々な生命現象の理解に大きく貢献できると期待される。

謝辞

広域 TEM 像取得システムの開発にあたり、東京大学大学院新領域創成科学研究科の朽名夏麿 博士、桧垣匠博士、秋田佳恵博士、馳澤盛一郎博士、日本女子大学の澤木史江氏、小林恵氏、永田典子博士、理研 CSRS の持田恵一博士、吉田拓広氏、若崎眞由美氏、橋本恵博士に多大なるご協力を頂きました。CLEM システムの開発にあたり、日立ハイテクノロジーズ社科学システム設計開発本部の皆様、理研 CSRS の浜村有希博士に多大なるご協力を頂きました。また、甲南大学の西村いくこ博士、上田晴子博士に GFP 形質転換シロイヌナズナを分与頂きました。本研究は、科学研究助成金若手研究(A)24687007(代表：豊岡)、挑戦的萌芽研究23657051(代表：豊岡)による支援を受けました。

引用文献

- de Boer P., Hoogenboom J.P. & Giepmans B.N. 2015. Correlative light and electron microscopy: ultrastructure lights up!. *Nat. Methods.* 12:503-513.
- Higaki, T., Kutsuna, N., Akita, K., Sato, M., Sawaki, F., Kobayashi, M., Nagata, N., Toyooka, K. & Hasezawa, S. 2014. Semi-automatic organelle detection on transmission electron microscopic images. *Scientific Reports* 5, 7794.
- Liss, V., & Hensel M. 2015. Sample preparation for correlative light and electron microscopy (CLEM) analyses in cellular microbiology. *BioProtoc.* 5:e1612
- Kutsuna, N., Higaki, T., Matsunaga, S., Otsuki, T., Yamaguchi, M., Fujii, H. & Hasezawa, S. 2012. Active learning framework with iterative clustering for bioimage classification. *Nat Commun* 3: 1032.
- Lidke, D.S. & Lidke, K.A. 2012. Advances in high-resolution imaging—techniques for three-dimensional imaging of cellular structures. *J Cell Sci* 125: 2571-2580.
- Muller-Reichert, T. & Verkade, P. 2014. Preface. Correlative light and electron microscopy II. *Methods Cell Biol* 124: xvii-xviii.
- Toyooka, K., Goto, Y., Asatsuma, S., Koizumi, M., Mitsui, T. & Matsuoka, K. 2009. A mobile secretory vesicle cluster involved in mass transport from the Golgi to the plant cell exterior. *Plant Cell* 21: 1212-1229.
- Toyooka, K., Sato, M., Kutsuna, N., Higaki, T., Sawaki, F., Wakazaki, M., Goto, Y., Hasezawa, S., Nagata, N. & Matsuoka, K. 2014. Wide-range high-resolution transmission electron microscopy reveals morphological and distributional changes of endomembrane compartments during log to stationary transition of growth phase in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* 55: 1544-1555.
- Toyooka, K., Hashimoto, K., Narikawa, N., Wakazaki, M., Sato, M., Nagata, N. & Okamoto, T. 2015. The ER body in the lateral root cap is involved in mass transport of (K/H)DEL proteins to the vacuole: Using Gigapixel TEM images. *Microscopy* 64: i123.
- Toyooka, K., Sato, M., Wakazaki, M. & Matsuoka, K. 2016. Morphological and quantitative changes in mitochondria, plastids, and peroxisomes during the log-to-stationary transition of the growth phase in cultured tobacco BY-2 cells. *Plant Signaling & Behavior*. 11:e1149669
- 豊岡公徳, 佐藤繩子, 朽名夏麿, 永田典子. 2014. 高圧凍結技法を取り入れた広域透過電顕像自動取得システムの開発とその応用. *Plant Morphol* 26:3-8.

豊岡公徳.2016.光-電子相関顕微鏡法：蛍光タンパク質標識した細胞小器官を走査電子顕微鏡で捉える.*Plant Morphology* 28: 15-21.

Yamada,K., Nagano,A.J., Nishina,M., Hara-Nishimura,I. & Nishimura,M. 2008. NAI2 Is an Endoplasmic Reticulum Body Component That Enables ER Body Formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20: 2529-2540.