

## 植物研究における2光子励起顕微鏡の活用

栗原大輔

名古屋大学大学院理学研究科

JST・ERATO 東山ライブホロニクスプロジェクト

〒464-8602 愛知県名古屋市千種区不老町

Daisuke Kurihara

Utility of two-photon excitation microscopy for plant researcher

Key words: auto-fluorescence, clearing, fluorescent protein, two-photon

Graduate School of Science, Nagoya University

Higashiyama Live-Holonics Project, ERATO, JST

Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8602, Japan

### 1. はじめに

生体のなりたちや生命現象を明らかにする上で、直接細胞や分子を観察、解析できる顕微鏡技術は今日欠かせない技術である。しかしながら、生体の深部で起こっている生命現象を解析するためには、顕微鏡の技術的制限からこれまで機械的に切片を作製するなど、サンプルに傷をつけて観察する必要があった。しかし、立体的な生体の構造を把握するためには、三次元情報が必要になるが、機械的に切断した切片から三次元の立体構造を再構築するのは非常に困難である。また、ダイナミックな生命現象を生きたまま解析するためにも、なるべく傷をつけず、そのまま直接観察できることの重要性は言うまでもない。そのような中、生体の深部を直接観察する「深部イメージング」を達成するために、近年、2光子励起顕微鏡と呼ばれる顕微鏡技術が活用されている。本稿では、2光子励起顕微鏡の特徴を紹介し、植物研究に実際に用いる際の注意点を述べたい。

### 2. 2光子励起顕微鏡を用いた植物組織観察

#### 2-1. 深部イメージングが可能である

2光子励起顕微鏡のよく知られている特徴は、生体の深部イメージングが可能なことであろう。共焦点顕微鏡で用いられる光源が、紫外や可視光レーザーであることに比べて、2光子励起顕微鏡で用いられる光源は、倍近い波長の近赤外光パルスレーザーである。長波長の光源を用いるため、生体内での散乱の影響を受けにくく、光源の深部到達性が高いことより、深部イメージングが可能となる。動物研究分野においては、1,064 nmのレーザーを光源とした2光子励起顕微鏡により、生きたマウスの脳を表面から1,600  $\mu\text{m}$ 、すなわち1.6 mmもの深部まで観察することに成功している (Kawakami et al. 2015)。

それでは、植物組織においてはどうかであろうか。モデル植物であるシロイヌナズナにおいて、最も観察が行いやすい組織としては透明な組織である根が挙げられるであろう。図1左は細胞核をH2B-mCloverで標識したシロイヌナズナの根を共焦点顕微鏡で観察した像である。透明な組織

で観察が行いやすい組織でありながら、維管束の細胞核まではかろうじて観察できているが、対物レンズから遠い側の核は全く観察できていない。観察しているシロイヌナズナの根の直径は 100  $\mu\text{m}$  であるため、共焦点顕微鏡で観察できているのは根表面から 50  $\mu\text{m}$  ほどである。そこで同じ根を 2 光子励起顕微鏡で観察すると、対物レンズから遠い側の細胞核まで全て観察できていることが分かる (図 1 右)。オーキシンマーカである *DR5rev::3xVenus-N7* を同時に観察すると、2 光子励起顕微鏡で観察した方が、どの領域まで *DR5* が発現しているかはっきりと識別することが可能である (図 1)。

## 2-2. 長波長光源を用いることで自家蛍光が軽減する

植物組織において、2 光子励起顕微鏡を用いる利点としては、深部イメージングが行えるだけでなく、植物細胞特有の自家蛍光を軽減できる点が挙げられる。植物細胞の自家蛍光としては、光合成に関わる葉緑体のクロロフィルがまず挙げられるが、それ以外にも細胞壁に存在するリグニンも顕微鏡観察の妨げになる自家蛍光の要因となる。クロロフィルは強い赤色の自家蛍光を発するため、赤色蛍光タンパク質の観察の際に妨げとなる。また葉緑体を持たない根や花粉などを観察する場合でも、細胞壁にリグニンが存在し黄緑色の自家蛍光を発するため、GFP などの緑色蛍光タンパク質を用いて発現量の低い目的タンパク質を観察する際に、自家蛍光との識別が困難となってしまう (Mizuta et al. 2015)。また、緑色あるいは赤色蛍光タンパク質を観察する以外の場合にも、クロロフィルやリグニンなどは蛍光タンパク質の励起光を吸収してしまい、十分に目的の蛍光タンパク質を励起できないため、励起光のパワーを強くする必要があり、細胞にダメージを与えるなどの恐れもある。このように、自家蛍光を抑えて顕微鏡観察を行うことは非常に重要なことである。

2-1 で述べたように、共焦点顕微鏡に比べて 2 光子励起顕微鏡により観察する際は 700 nm ~ 1,100 nm あるいはより長波長のレーザーが用いられている。長波長領域はクロロフィルやリグニンの吸収スペクトルからはずれたところになるため、長波長のレーザーを照射した場合でも、植

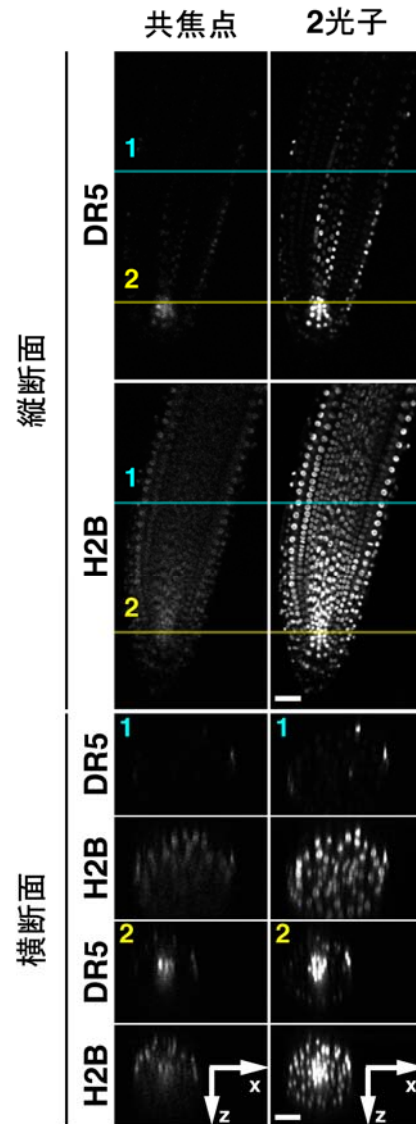


図 1. 共焦点顕微鏡像と 2 光子励起顕微鏡像の比較

細胞核を *RPS5Apro::H2B-tdTomato*, オーキシン応答を *DR5rev::3xVenus-N7* で標識している。上段は縦断面、線で示している部分の横断面を下段に示す。スケールバーは 30  $\mu\text{m}$ 。Kurihara et al. (2015)より改変して転載。

物の自家蛍光は劇的に軽減される。2光子励起顕微鏡の場合でも、800 nm といった比較的短い波長のレーザーを照射した場合、クロロフィル、細胞壁の自家蛍光両方とも検出されるが、1,000 nm といったより長波長のレーザーを照射した場合、自家蛍光は検出されにくくなる (Mizuta et al. 2015)。このため、より弱いレーザーでも蛍光タンパク質が検出できるため、細胞へのダメージも軽減できる。また、これまでクロロフィルの自家蛍光と重なるため避けられてきた赤色蛍光タンパク質も利用できるため、蛍光タンパク質の選択肢の幅も広がる。

### 2-3. 1波長同時励起多色イメージングが可能である

もう一つの2光子励起顕微鏡の特徴として、一つの励起波長で多色の蛍光タンパク質を励起することが可能となることである。蛍光タンパク質の性質として、2光子励起できる波長は1光子励起波長の単純に倍になるわけではなく、励起スペクトルは広がる傾向にある。そのため、1光子励起すなわち共焦点顕微鏡で観察する場合、緑色蛍光タンパク質は488 nm、赤色蛍光タンパク質は561 nm というように、異なる波長のレーザーが必要であり、2色を同時に観察するためには、レーザーを2つ照射しなくてはならない。しかし、2光子励起の場合、900~1,000 nm の波長で緑色、赤色蛍光タンパク質ともに励起できるため、一度のレーザー照射で多色イメージングが可能となるため、細胞へのダメージが軽減できる。図2は mTFP1, sGFP, Venus, mApple といった水色から橙色までの4種類の蛍光タンパク質をそれぞれ発現する花粉を集めて、めしべに受粉した様子である。励起波長990 nm の2光子励起顕微鏡観察により、4色全ての蛍光タンパク質が検出できていることが分かる。

多色イメージングをする際の注意点としては、どの蛍光タンパク質を選ぶかという点が挙げられる。何種類同時に観察したいかによるが、2種類の場合は、緑色と橙色あるいは赤色蛍光タンパク質が良い。これらの組み合わせでは、950~1,000 nm といった長波長の励起光を用いることができるため、自家蛍光を抑えながら観察することができる。しかし、橙色、赤色蛍光タンパク質は<1,000 nm の励起光では吸収効率が低いため、2種類の目的タンパク質のうち、発現量の高いタンパク質を橙色、赤色蛍光タンパク質と融合し、発現量の低い目的タンパク質を緑色蛍光タンパク質に融合するという工夫が必要である。また、3種類同時に観察したい場合は、共焦点シアン色蛍光タンパク質がよく用いられているが、950 nm 付近ではほとんど励起されないため、

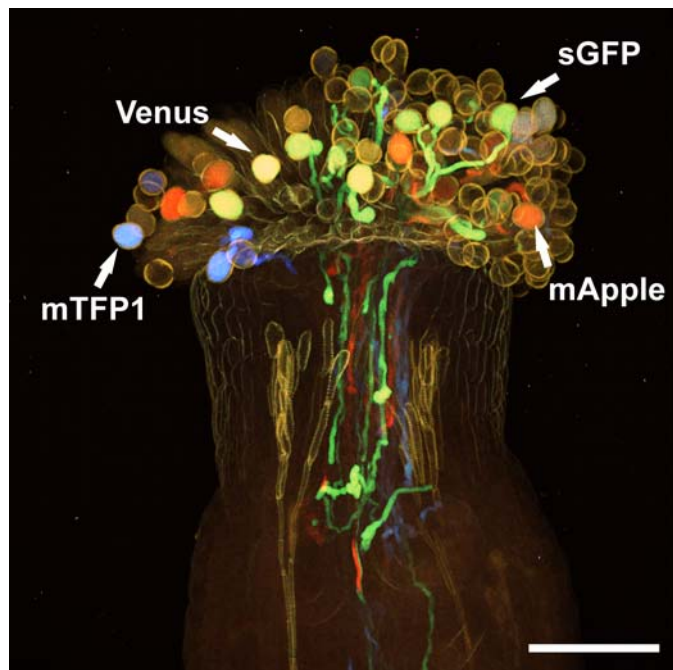


図2. 多色の花粉を受粉しためしべ

*LAT52pro::mTFP1*, *LAT52pro::sGFP*, *LAT52pro::Venus*, *LAT52pro::mApple* でそれぞれ標識した花粉をめしべに受粉し、2光子励起顕微鏡により観察した。スケールバーは100 μm。Kurihara et al. (2015)より改変して転載。

1 波長同時励起は難しい。著者の場合、シアン色蛍光タンパク質と緑色蛍光タンパク質の間の色である TFP をよく用いている (図 2)。

また、多色の蛍光タンパク質を同時に観察する場合、検出側にも気を配る必要がある。TFP, GFP, YFP といった水色, 緑色, 黄色蛍光タンパク質は蛍光スペクトルが近接しているため、蛍光フィルターで区別をつけることが困難である。その場合、プリズムで分光後、多数の検出器でそれぞれの波長のシグナルを検出しイメージングするスペクトルイメージングが有用である。先に示した図 2 はスペクトルイメージングで撮像したものであるが、mTFP1, sGFP, Venus がそれぞれ異なる色として識別できる。

### 3. 透明化によりさらなる深部イメージングへ

2-1 章において 2 光子励起顕微鏡は深部イメージングが可能であることを述べてきたが、2 光子励起顕微鏡を持ってしても、植物組織は深部イメージングが難しい組織である。図 3 はシロイヌナズナの葉の細胞核を、共焦点顕微鏡と 2 光子励起顕微鏡を用いて観察したものである。共焦点顕微鏡では、葉の気孔や表皮細胞といった表面から 1~2 層、深さにして 30~40  $\mu\text{m}$  しかシグナルは検出できていない (図 3, 共焦点)。一方、2 光子励起顕微鏡においても、共焦点顕微鏡と同程度の深さまでしか、細胞核のシグナルは検出できない (図 3, 2 光子)。そのため、2 光子励起顕微鏡を持ってしても、葉の内部にある維管束は観察できない。図 1 で示したように、2 光子励起顕微鏡を用いると、直径 100  $\mu\text{m}$  の根では全細胞核が、まためしべの中にある胚珠の観察では、175  $\mu\text{m}$  の深部にある胚乳核をはっきり観察することができる (水多と栗原 2015)。

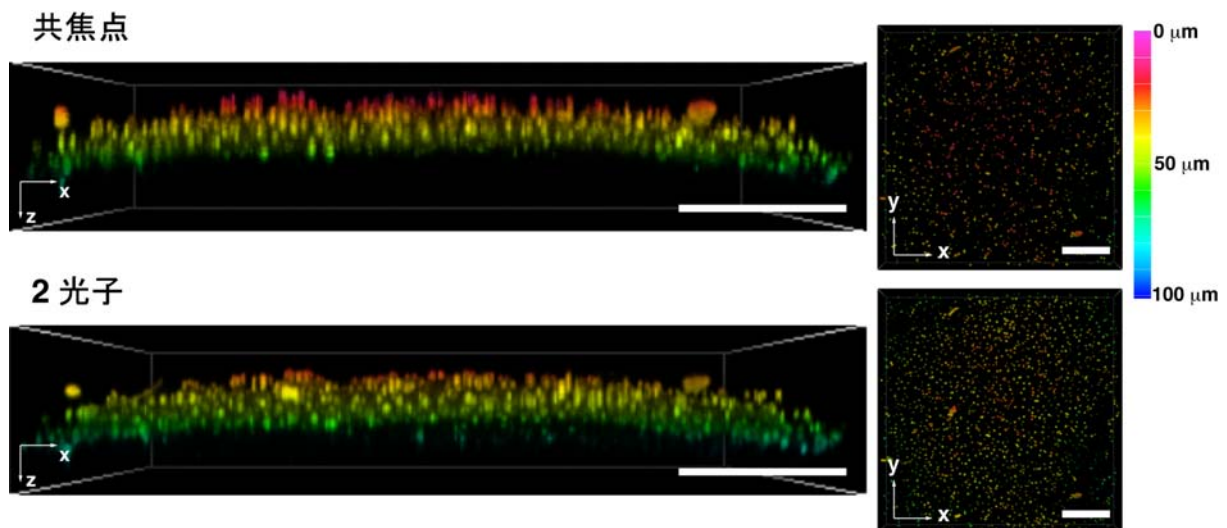


図 3. シロイヌナズナの葉における共焦点顕微鏡像と 2 光子励起顕微鏡像

細胞核を *UBQ10pro::H2B-mClover* で標識している。左図は xz 平面への投影図である。上側が対物レンズが存在する側である。右図は xy 平面への投影図である。カラースケールは対物レンズからの距離を示す。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。Kurihara et al. (2015)より改変して転載。

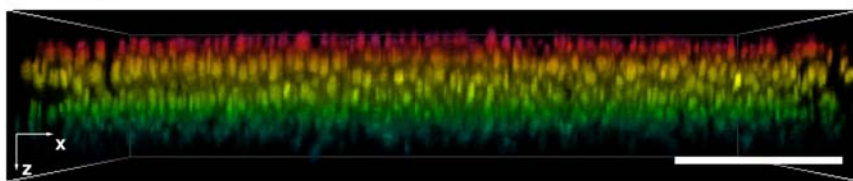
これらの違いは何に起因するのであろうか。その違いは組織の構造にある。そもそも、生体組織の深部が観察しにくいのは、生体組織が均一ではなく、屈折率の異なるさまざまな物質が入り



交じって作られているからである。屈折率が異なる物質の界面では、光が曲がってしまうため、対象領域が深部になるほど、励起光が焦点に合わなかったり、蛍光タンパク質から発せられる蛍光が対物レンズまで届かなかったりするため、深部のシグナルは検出しにくい。1つの細胞でも細胞質（屈折率 1.36）や細胞壁（屈折率 1.42）と屈折率が異なるため、共焦点顕微鏡では透明な根の組織でも深部イメージングが難しいが、特に植物の葉は内部に空気（屈折率 1.00）を多く含んでいるため、より深部イメージングが困難である。元来、葉は光合成を行う器官である。そのため、葉は内部に細胞と屈折率の大きく異なる空気を含み、また形態の異なる細胞から構成されているため、取り込んだ太陽光を各所で屈折させ葉の内部に閉じ込めることによって、効率よく光合成を行っている（Kumar & Silva 1973）。そのような組織構造の特徴から、シロイヌナズナでは葉やめしべが非常に深部イメージングの難しい組織である。

著者らは最近、透明化の技術を用いて、この困難な植物深部イメージングを可能にする手法を開発した（Kurihara et al. 2015）。植物の透明化でよく用いられているのは、抱水クロラールを含んだ透明化液であろう。古くから用いられている透明化液であるが、抱水クロラールは蛍光タンパク質を失活させてしまうため、蛍光観察を行うことはできなかった。そのため、動物研究分野で近年開発されていた透明化技術（Hama et al. 2011, Susaki et al. 2014）を応用して、植物組織に最適化した透明化試薬 ClearSee を開発した（Kurihara et al. 2015）。ClearSee で組織や細胞の中を置換し、また満たすことで空気を取り除くことができるため、組織の中を均一化することができる。また、ClearSee は植物細胞からクロロフィルを取り除くことにより、自家蛍光

#### 共焦点



#### 2光子

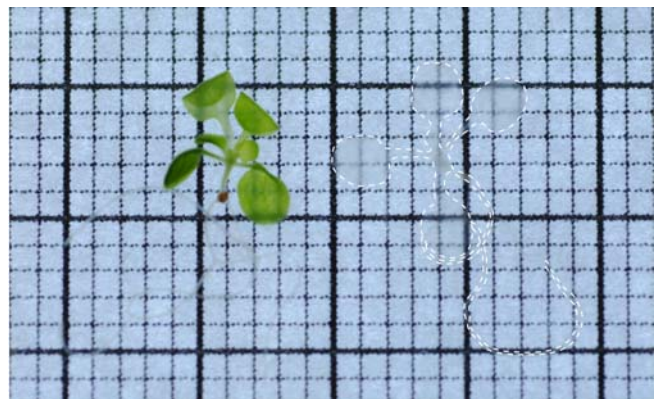
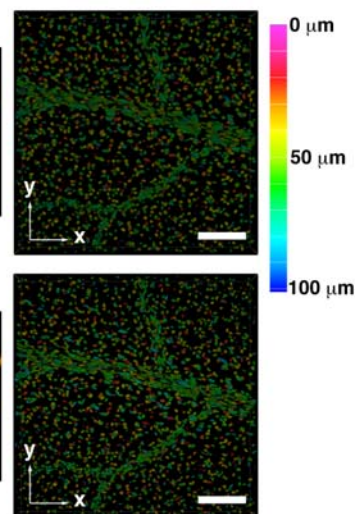
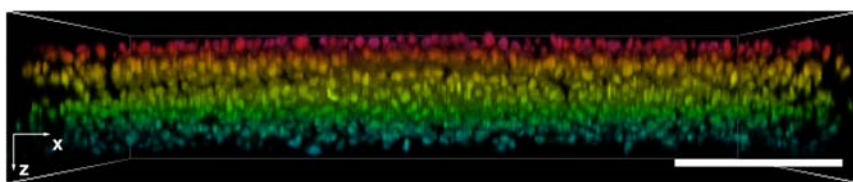


図4. 透明化したシロイヌナズナ実生

左は PBS, 右は ClearSee で処理している。マス目は 1 mm。Kurihara et al. (2015)より改変して転載。

図5. 透明化したシロイヌナズナの葉における共焦点顕微鏡像と2光子励起顕微鏡像

細胞核を *UBQ10pro::H2B-mClover* で標識している。図の構成は図3と同じである。スケールバーは 100 μm。Kurihara et al. (2015)より改変して転載。

を軽減し、透明度も増す (図 4)。このように ClearSee で透明化したシロイヌナズナでは、厚さ 100  $\mu\text{m}$  の葉の表面から裏面まで全ての細胞核を観察することができる (図 5, 二光子)。そのため、透明化処理をしない葉では観察できなかった維管束の細胞核まで観察することが可能である。また、2 光子励起顕微鏡だけではなく、共焦点顕微鏡においても葉全体の細胞核を観察することができる (図 5, 共焦点)。しかしながら、2 光子励起顕微鏡を用いると、S/N 比の高いイメージングが可能であるし、400  $\mu\text{m}$  を超えるめしべのような器官でも丸ごとの観察が可能である (Kurihara et al. 2015)。

#### 4. 展望

本稿では、植物組織を深部イメージングするための 2 光子励起顕微鏡の特徴および注意点について紹介してきたが、2 光子励起顕微鏡は観察するだけではない活用法もある。2 光子励起顕微鏡では、1 つの蛍光分子が 2 つの光子を同時に吸収し 2 光子励起状態へ遷移するために、光源として光子密度を高めることができるフェムト秒パルスレーザーを用いている。フェムト秒パルスレーザーは瞬間的なピークパワーが非常に高いため、細胞に局所的ダメージを与えることが可能である。この特性を利用して、タバコ培養細胞内のアクチン繊維の一部を損傷させたり、受精卵が不等分裂して生じる 2 つの細胞のうち 1 つの細胞だけにダメージを与えたりすることも可能となっている (Hasegawa et al. 2014, Gooh et al. 2015)。このように、細胞を観察しながら時空間特異的にフェムト秒パルスレーザーで損傷を与え、その影響をリアルタイムに観察する「ライブセル解析」は、植物の発生研究において非常に重要な解析法になっていくであろう (Kurihara et al. 2013)。2 光子励起顕微鏡により深部イメージングが可能であるため、ライブセル解析が植物の深部で起こっている生命現象にも適用可能である。また植物研究者には 2 光子励起顕微鏡は普及していないため、本稿が 2 光子励起顕微鏡を使ってみようというきっかけになれば幸いである。名古屋大学には植物科学最先端研究拠点ネットワークにより整備された二光子顕微鏡が導入されており、植物科学研究者への支援を行っている。常駐のチーフコーディネーターが、利用者の研究目的に合わせた顕微鏡選定および解析方法などの相談にのり、顕微鏡操作についても技術支援を行っているので、ぜひ名古屋大学ライブイメージングセンターのウェブサイト (<http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/liveimagingcenter/index.html>) をご覧頂き、利用して頂きたい。

#### 5. 謝辞

本研究の一部は文部科学省最先端研究基盤事業植物科学最先端研究拠点ネットワークの支援により名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所(WPI-ITbM)にて実施された。

#### 6. 引用文献

- Gooh, K., Ueda, M., Aruga, K., Park, J., Arata, H., Higashiyama, T., & Kurihara, D. 2015. Live-cell imaging and optical manipulation of *Arabidopsis* early embryogenesis. *Dev. Cell* 34: 242-251.
- Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A., & Miyawaki, A. 2011. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat. Neurosci.* 14: 1481-1488.

- Hasegawa, J., Higaki, T., Hamamura, Y., Kurihara, D., Kutsuna, N., Higashiyama, T., Hasezawa, S., & Matsunaga, S. 2014. Vacuole subdivision in plant cell growth by the genotoxic stress inducing DNA double strand breaks. *Cytologia* 79: 467-474.
- Kawakami, R., Sawada, K., Kusama, Y., Fang, Y. C., Kanazawa, S., Kozawa, Y., Sato, S., Yokoyama, H., & Nemoto, T. 2015. *In vivo* two-photon imaging of mouse hippocampal neurons in dentate gyrus using a light source based on a high-peak power gain-switched laser diode. *Biomed. Opt. Express*. 6: 891-901.
- Kumar, R. & Silva, L. 1973. Light ray tracing through a leaf cross section. *Appl. Optics* 12: 2950-2954.
- Kurihara, D., Hamamura, Y., & Higashiyama, T. 2013. Live-cell analysis of plant reproduction: live-cell imaging, optical manipulation, and advanced microscopy technologies. *Dev. Growth Differ.* 55: 462-473.
- Kurihara, D., Mizuta, Y., Sato, Y., & Higashiyama, T. 2015. ClearSee: a rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. *Development* 142: 4168-4179.
- 水多陽子, 栗原大輔 2014. 2 光子励起顕微鏡を用いた生体深部イメージングと光顕微操作. 植物の生長調節 49: 96-103.
- Mizuta, Y., Kurihara, D., & Higashiyama, T. 2015. Two-photon imaging with longer wavelength excitation in intact *Arabidopsis* tissues. *Protoplasma* 252: 1231-1240.
- Susaki, E. A., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T. M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., Abe, T., Kiyonari, H., Shimizu, Y., Miyawaki, A., Yokota, H., & Ueda, H. R. 2014. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 157: 726-739.