

植物細胞の蛍光イメージング



山田 幸司

1 植物細胞の可視化技術の開発

1.1 植物細胞の蛍光染色の問題点

蛍光顕微鏡を用いた分析法は、その高い感度や空間分解能、非侵襲的に細胞を生きたまま観察できること、波長の異なるプローブを用いることで複数の対象を同時に観察できることなどの利点から、生命科学や医学などの分野で広く用いられている。観測対象の多くは蛍光特性を持たないため、遺伝子工学的に細胞内部で発現させる蛍光タンパク質、外部から導入できる有機分子や量子ドットなどの蛍光物質を用いる必要があるが、波長や応答性の異なる数多い候補の中から最適な蛍光プローブを選択することで動物細胞のさまざまな機能が明らかになってきた。一方、植物細胞の蛍光顕微鏡分析の事例は、動物細胞に比べて少ない。その理由として、(1) クロロフィルなどの植物内の色素が強い自家蛍光を放ち蛍光プローブからのシグナル検出を妨害すること、(2) 厚い細胞壁が蛍光物質の浸透を防ぎ染色ムラが生じることなどが挙げられる。そのため、動物細胞に比べて蛍光タンパク質を用いた研究事例が多いが、依然として(1)の問題が存在する。

1.2 ClearSee を用いた植物細胞の透明化

(1)の問題の具体的な解決法として、名古屋大学の東山哲也教授らの研究グループが開発した植物組織透明化技術「ClearSee (クリアシー)」が挙げられる¹⁾。この技術は、パラホルムアルデヒド溶液を用いて植物サンプルを固定化し、減圧状態でPBSを使ってサンプルを洗浄し、キシリトールとデオキシコロール酸ナトリウムと尿素からなるClearSee溶液を使って植物を傷つけることなくクロロフィルを取り除いて植物全体を透明化する技術である。植物種によっては、酸化反応によって茶色に変色するものもあるが、還元剤として亜硫酸ナトリウムを

添加したClearSeeAlphaによって透明化することができる²⁾。ClearSee処理によって得られた蛍光顕微鏡像は、未処理のものに比べてクロロフィルによるノイズが大幅に低減され、植物細胞の内部まで鮮明な蛍光顕微鏡像が得られるようになった。これらの試薬は、富士フィルムと光純薬(株)から市販されているので我々も分析ツールとして使うことができる。ただし、固定化した時点で、非侵襲的に細胞を生きたまま観察できるという蛍光顕微鏡分析の利点を失うことになる。

2 シロイヌナズナへの応用

2.1 モデル植物としてのシロイヌナズナ

2000年に植物として初めて全ゲノムが解読されたシロイヌナズナは、モデル植物として多くの研究に用いられている。1986年にT-DNAを介した形質転換が報告され、アグロバクテリウムという土壌細菌の感染力を利用して、外来遺伝子である蛍光タンパク質遺伝子配列などを導入することが可能になった。また、世代交代が約6週間と短く、小型で栽培が容易なのでスクリーニング研究には最適な植物種である。特にシロイヌナズナの根は、クロロフィルがほとんど含まれず、細く・無色透明で、ClearSeeで処理しなくても蛍光を深部まで観察できる。また、シロイヌナズナは透明な寒天培地上で育てることができるため生きたまま根を観察することもできる。そのため主に蛍光タンパク質をプローブとして用いた研究が続けられている。

2.2 酸成長説の解明

植物細胞の研究で大きなテーマの一つが細胞伸長である。固い細胞壁を突き破って方向性を持って根や茎が伸びていく機能には関心が寄せられてきた。その機構の有力な仮説が酸成長説である。インドール-3-酢酸(IAA)やフェニル酢酸(PAA)に代表されるオーキシシンと呼ばれる植物ホルモンが、オーキシシン活性因子(ARF)と呼ばれるタンパク質を生成し、細胞膜上のプロトンポンプ(H^+ -ATPase)を活性化し、細胞壁に H^+ を供給することでセルロース間の強固な水素結合が緩み、細胞内の浸透圧によって方向性を持って伸長するという仮説である(図1)。そのため、1-ナフトレン酢酸(NAA)や2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)などの類縁体が人工オーキシシンとして除草剤などに使われている。一方、シロイヌナズナでは、2005年にTIR1と呼ばれるタンパク質がオーキシシンの受容体であることが判明し、オーキシシンシグナル伝達経路が解明された。例えば、DR5::GFPは、オーキシシンに応答して生成された遺伝子によって活性化され(DR5)、末端の緑色蛍光タンパク質(GFP)に生合成によって蛍光として間接的にオーキシシンを可視化する研究ツールである。しかし、蛍光タンパク質はサイズも大きく、遺伝子の発現量は細胞の部位によってまちま

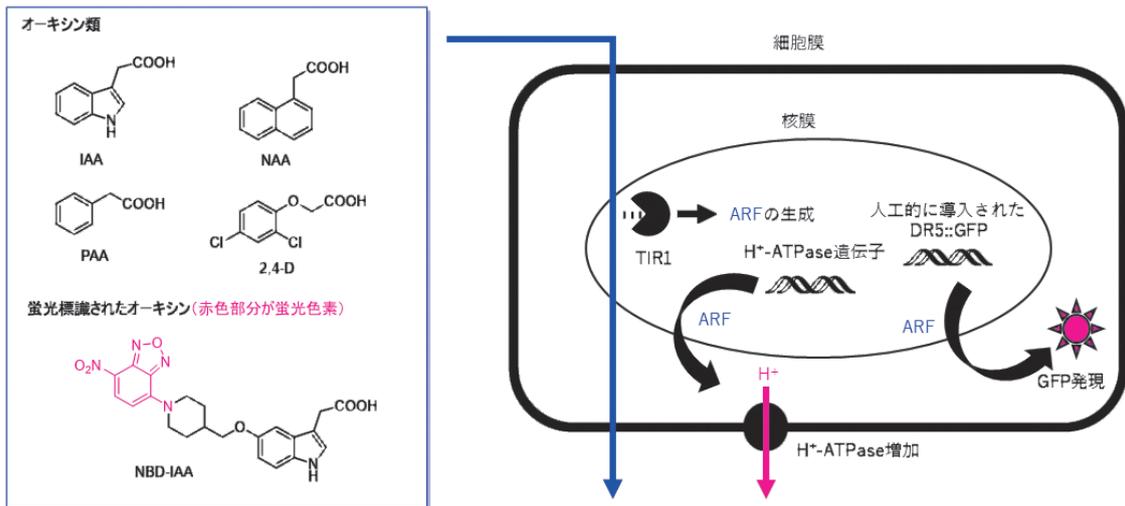


図1 オーキシンの化学構造と植物細胞内での機構

ちなので、定量性に乏しいという難点があった。そこで、オーキシン自体に蛍光有機分子をラベル化し、オーキシンを直接定量したり、オーキシン輸送のプロセスを観察したりする研究も行われている。

その蛍光プローブとして、オーキシンの活性を阻害しない位置に、分子サイズの小さい蛍光色素であるニトロベンゾオキサジアゾール (NBD) をラベル化したオーキシン類縁体 NBD-IAA が設計・合成された³⁾。NBD-IAA は、細胞壁を透過し、オーキシン活性は弱いものの蛍光ラベルされていない IAA と同様に輸送されると考えられる。この蛍光プローブを用いることで、オーキシンの取り込みと輸送の観察やオーキシン輸送阻害剤の効果の検証ができるようになった⁴⁾。興味深いことに、蛍光色素の種類やオーキシンと蛍光色素の間のリンカーの構造の違いによって蛍光染色される部位が異なる。また、一部の色素はオーキシン活性が強く出たが、細胞内でオーキシンと蛍光色素の間のリンカーが分解された可能性も高い。最近では、小分子の割に蛍光性能の高いボロンジピロメテン (BODIPY) を用いたプローブも開発されている⁵⁾。

オーキシンによって細胞壁に放出された H^+ は、実際に 8-ヒドロキシピレン-3,6,8-三スルホン酸三ナトリウム塩 (HPTS) などの pH 応答性蛍光色素を用いることによって、細胞伸長部分の細胞壁の pH が 5~6 とやや酸性になっているのが確認されている。

3 今後求められる分析法

動物細胞よりも制約の多い植物細胞でも、蛍光プローブを工夫することでその機能が徐々に明らかになってきた。シロイヌナズナで得られた知見は、同じ被子植物であるイネ・トウモロコシなどと共通する代謝経路を持っていると考えられるため、作物研究に応用できる可能性

が高い。一方、形質転換が難しい植物種では、そのまま蛍光タンパクをプローブとして用いることは難しい。外部から導入する蛍光色素を長波長化して、自家蛍光のノイズの少ない領域で観測すればより鮮明なイメージを得られる可能性がある。また、現在のプローブでは、オーキシンまたはその受容体の存在位置がわかるのみで、両者間の相互作用を直接観測することはできない。複数のプローブを用いて共鳴エネルギー移動を制御したり、周辺の環境にตอบสนองしたりして発光波長が変化するよりインテリジェントな蛍光プローブが望まれる。

文 献

- 1) D. Kurihara, Y. Mizuta, Y. Sato, T. Higashiyama : *Development*, **142**, 4168 (2015).
- 2) D. Kurihara, Y. Mizuta, S. Nagahara, T. Higashiyama : *Plant Cell Physiol.*, **62**, 1302 (2021).
- 3) K. Hayashi, S. Nakamura, S. Fukunaga, T. Nishimura, M. K. Jenness, A. S. Murphy, H. Motose, H. Nozaki, M. Furutani, T. Aoyama : *PNAS*, **111**, 11557 (2014)
- 4) X. Huang, J. Maisch, K. Hayashi, P. Nick : *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 8593 (2022).
- 5) T. Aoyama, M. Nambo, J. X. Yap, A. Nakagawa, M. Hayashi, Y. Ukai, M. Ohtsuka, K. Hayashi, Y. Sato, Y. Tsuchiya : *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2024.09.11.612572> (2024).



山田 幸司 (YAMADA Koji)

北海道大学大学院地球環境科学研究院物質機能科学部門、北海道大学大学院環境科学院環境物質科学・環境起学(兼任)専攻(〒060-0810 北海道札幌市北区北10条西5丁目)。大阪大学大学院工学研究科分子化学専攻博士後期課程修了。博士(工学)。《現在の研究テーマ》環境によって蛍光色が変わる色素の開発とセンサーデバイス応用。《主な著書》“環境修復の科学と技術”。(北海道大学出版会)。《趣味》名所・旧跡巡り。

E-mail : yamada@ees.hokudai.ac.jp