

植物細胞における長時間多検体 タイムラプス観察

佐藤良勝*, 杉本 渚

^a 科学技術振興事業団・ERATO・長谷部分化全能性
プロジェクト

キーワード：長時間タイムラプス，蛍光タイムラプス，多検体
タイムラプス

1. はじめに

観察者はゆっくりと連続した変化には鈍く実感しにくい。このような遅い反応は見過ごされがちであるが、遅い反応の中にも重要な生命現象は存在する。そこで遅い運動の検出のためには、数日間にわたる長時間のタイムラプス観察を行い、実際の運動速度よりも高速で再生させることになる。本稿では、植物細胞の運動を例に長時間多検体タイムラプス観察システムを紹介する。

2. 長時間タイムラプス観察

2.1. 透過光観察

長時間観察は植物細胞を観察する場合に限らず、動物の受精卵からの発生過程を追跡するような場合でも有効な方法であろう。実際行うにあたって最も留意すべきことは、温度一定の中で観察することである。温度一定条件で行う理由の1つは、生体試料を通常発生過程の温度下で実験するためであり、もう1つ重要なのが、顕微鏡の焦点制御（Z軸方向）のためである。温度が数度変動してしまうだけで、顕微鏡ステージの熱膨張により焦点はズレてしまうからである。最も安定に温度を制御するためには、顕微鏡システム全体を恒温室に設置すると良い。システム全体の温度制御が難しい時には、温度制御ステージや温度制御フードを併用するとかなりの精度の温度一定条件が期待できる。

温度制御ステージを用いて、敢えて温度を変動させたときの試料の反応を追跡したいというような場合はどうだろうか。このような時には、観察したい試料のフォーカス位置を「オフセット」として設定し、仮にフォーカスがずれたとし

ても撮像直前に赤外レーザーによりカバーガラス面を検出し、設定したオフセット位置に戻りフォーカスを補正する機能を有する顕微鏡を選択すれば可能である。このような設備がない場合には、撮像時に取り込みソフトウェア側でオートフォーカス機能を使用するか、フォーカス面を何枚か撮像した後、任意のフォーカス面を抽出する他ない。オートフォーカス機能に関しては、最もコントラストの強い部分を撮像するので、必ずしもユーザーの欲するフォーカス面に合わない場合が少なくないので注意が必要である。

2.2. 蛍光観察

長時間蛍光タイムラプス観察を行う際には、上記の留意点に加えて光源シャッターが不可欠となる。撮像時のみ必要最小限の励起光をサンプルに照射し、光による細胞毒性や蛍光の褪色を防ぐためである。そして、試料から得られる蛍光はなるべく漏らさずに検出器に届けることが肝心である。具体的には、開口数の高い対物レンズを用いて、目的の蛍光体の蛍光波長を最大限に透過する蛍光フィルターを選択する。さらに、サンプルから検出器までの距離を短くするために、検出器（カメラ）は試料になるべく近いサイドポートに接続したい。些細なことに思えることかもしれないが、長時間の蛍光タイムラプスに確実に影響する重要な留意点である。また、開口数の高いレンズは焦点深度が浅くなるため、前述したZ軸フォーカスのズレ防止については細心の注意が必要となる。

2.3. 多検体観察

定点タイムラプスを長時間行う場合の欠点は、データ取得のために同じ実験の繰り返しが必要になってしまうことである。1つの試料プレート内で複数の視野を自動的に観察できたなら、実験の効率は格段に向上する。多検体タイムラプスには2つの方法がある。1つは時間分解能を優先して定点タイムラプスを行い、1視野のタイムラプス撮像を終えた後、自動的に実験開始時に設定した次の視野にステージを動かして再び定点タイムラプスを繰り返し行うものである。これは、数分から数時間の比較的短時間のタイムラプスを繰り返す場合に有効であると思われる。一方で、1検体の観察時間が数日間と長期化する場合には、タイムラプス間隔の中でステージを移動させて検体数を稼ぐ方法をとるのが有効ではないだろうか。いずれにしても、多検体観察にはxy方向のズレの蓄積の少ない機械精度の電動ステージが必須となる。電動ステージは高価であるが、仮に30検体行う際に3ヶ月かけて1検体ずつ30回行わなければならない実験が、週末にセットして週明けまでの3日間の自動タイムラプス実験1回で終わることを思うと有効な装置であることはご理解頂けるのではないだろうか。

3. 長時間多検体蛍光タイムラプス顕微鏡システムのカスタマイズ

ここまで長時間タイムラプスについて説明してきたが、機能的に上記内容を満たす顕微鏡は市販されている。ところ

Yoshikatsu Sato and Nagisa Sugimoto: Multi-position long time imaging in plant cells

^a 〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38 自然科学研究機構基礎生物学研究所

TEL: 0564-55-7602; FAX: 0564-55-1356

* E-mail: yoshi@nibb.ac.jp

2008年1月10日受付

が、ユーザー各々のかゆいところに手が届くようにするためには、市販のシステムにほんの少しのカスタマイズが必要になる。顕微鏡を使って実験する人間にとってここから先が醍醐味ではないだろうか。ここでは、植物細胞用にカスタマイズした長時間多検体タイムラプス蛍光顕微鏡システムを紹介する。

植物細胞の生育には光が必要であり、多くの反応が光により制御される。実際に、蛍光タイムラプスを暗所で実行すると研究対象の現象が誘導されないということになる。一方で、光環境下で蛍光タイムラプスを行えば、目的の蛍光以外の光が検出器に入り、ノイズが目立ってしまう。そこで、顕微鏡制御用のコンピュータと植物生育用の光源との間に AC

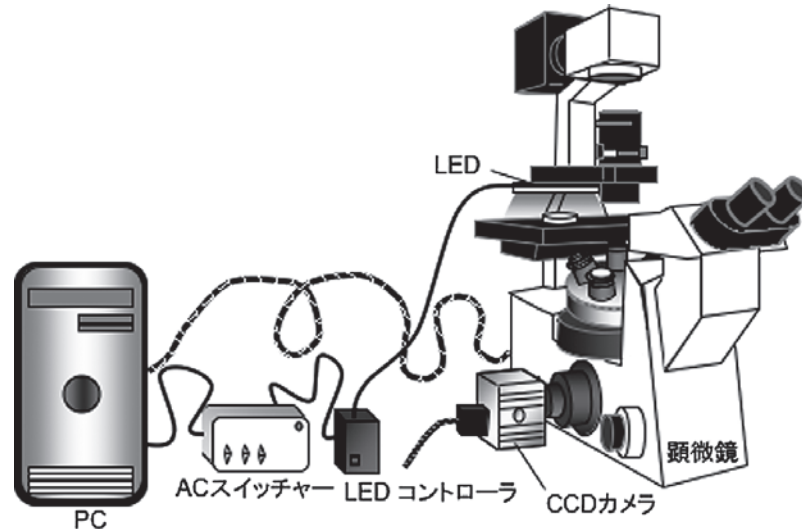


図1 長時間多検体蛍光タイムラプスシステムの概要

システム構成

顕微鏡：オリンパス IX81-ZDC, CCD カメラ：浜松ホトニクス ARCA-AG, 照射装置：キーエンス LED 照明装置, PC : Dell Precision PWS380 Intel Pentium 4 CPU 3.20GHz, 2.00GB RAM, OS : Windows XP Professional, ソフトウェア：Metamorph (日本モレキュラーデバイス)

操作手順

1. 試料を倒立顕微鏡ステージ上に設置する。
2. 明視野もしくは蛍光観察にて、目視で観察座標 (XYZ) を決定し、各座標を登録する。
3. 観察方法 (蛍光フィルター, スタック画像枚数) を設定する。
4. タイムラプス動作条件 (撮像継続時間, 撮像時間間隔) を設定する。
5. 自動撮像を開始する。

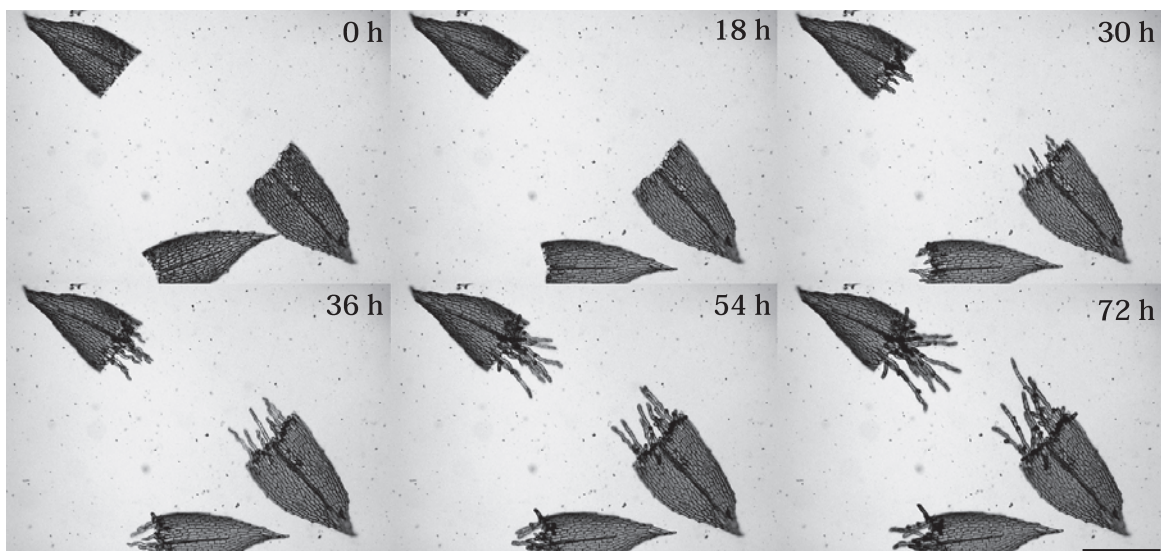


図2 ヒメツリガネゴケの葉細胞からの幹細胞化の様子。多検体タイムラプスを行った際の1視野を経時的に並べて表している。72時間経過しても焦点のズレはみられない。スケールは0.5mm.

スイッチャーを挿み、光源の ON/OFF をコンピュータから制御できるようにした。その結果、植物生育用の光は撮影時にのみ消え、インターバル時には点いたままの状態を維持するモジュールができあがった (図 1)。AC スwitchャーとは、コンピュータからの TTL 信号を受けると ON と OFF が切り替わる装置である。TTL 信号はプリンタにデータを出したり、スキャナーからデータを入力したりする際に用いられる信号である。したがって、AC スwitchャーの後ろに置く装置は、植物生育光源のコントローラ電源に限らず、通常のコンセント電源で動かす装置であれば何でも良い。例えば、阻害剤液をある流量で流し込むようなペリスタティックポンプの制御であったり、ステージの温度条件を敢えて変更させる場合の電圧の ON/OFF 制御であったり、用途は研究の対象によって広がりをもつと思われる。

4. 今後の展望—タイムラプス イン タイムラプス—

前述した多検体観察の方法では、反応の全体像を捉えるのにはとても有効である一方で、検体数を増やすことにより 1 検体におけるタイムラプス間隔が長くなるため時間分解能が犠牲になる。実際、植物細胞の運動はすべてが遅いわけではなく、遅いのは外見的な変化であり、微小管やアクチン繊維の一本一本の動態などといった真核細胞共通の細胞内分子の

振る舞いの追跡には、秒またはミリ秒単位の時間分解能を要する。これらの動態を数日間観察し続けることは、細胞へのダメージを考えると現時点では実現困難である。しかし、動態比較が出来ないかと言ったらそうでもなさそうである。短い間隔のタイムラプスを長いタイムラプスの中に入れる、例えば 1 秒おきのタイムラプスを 1 分間行い、これを 20 分おきに繰り返すというタイムラプス イン タイムラプス撮像を行えば可能である。インターバル時間を充分にとれば、これも多検体で行うということも望める。今後はそのようなタイムラプス観察も行っていきたい。

今回ご紹介したタイムラプス技術は必ずしも汎用性のあるものではないだろう。しかし、個々の研究テーマに完璧に合った顕微鏡システムはまず開発されない。だからこそ、そこに少しだけスパイスを加えてみるとひと味違った面白いことができるかもしれない。読者の方々には、現在使用している顕微鏡システムを今よりもう少し使いやすくするためのちょっとしたヒントとして頂けたら幸いである。

謝 辞

本研究は、基礎生物学研究所・生物進化研究部門および科学技術振興事業団・ERATO・長谷部分化全能性プロジェクトの長谷部光泰教授との共同研究である。