

植物の透明化技術 TOMEI

A Novel Clearing Method “TOMEI”

坂本 勇貴^a, 松永 幸大^{a, b*}

Yuki Sakamoto and Sachihito Matsunaga

^a東京理科大学研究推進機構総合研究院イメージングフロンティアセンター^b東京理科大学理工学部応用生物科学科

要旨 透明化技術は顕微鏡で試料の深部を観察する際になくてはならない技術である。動物の脳を透明化するための技術“Scale”の開発を皮切りに動物組織に対する透明化技術が劇的に進展した。植物においても複数のグループから蛍光タンパク質の蛍光を保持したまま透明化できる方法が報告されてきたが、どの方法も数日から数週間の時間がかかり、ハイスループットな解析には適していなかった。我々が開発した植物の透明化技術“TOMEI (Transparent plant Organ Method for Imaging)”は6時間以内に試料を透明化し、数百マイクロメートルの深部の観察を可能にした。TOMEIを利用することで、シロイヌナズナの葉、蕾、根、根こぶ、イネの葉の深部観察が可能となり、蛍光輝度の定量化も可能であることを示した。

キーワード：透明化技術, TDE, TOMEI, 植物組織

1. はじめに

約350年前、Robert Hookeがコルク片から細胞を発見した時、顕微鏡では試料のごく表層しか観察出来なかった。現在では、顕微鏡本体の改良に加え、色素染色、蛍光染色、蛍光タンパク質ラベリングなどの観察方法が開発されたことから、試料の表層から内部まで観察できるようになった。しかし、試料表面から数百マイクロメートルからミリメートル単位の深部のシグナルは、光の屈折や散乱、細胞内の色素やタンパク質による光の吸収の影響を強く受け、通常の観察方法では検出することができない。この深部観察のための問題点を解決するために試料の透明化法の開発が試みられてきた。従来、エタノールなどの有機溶媒を用いて試料を脱色し、グリセリンなど屈折率の高い溶液を用いて屈折率を均一にすることで光の屈折や散乱を抑え試料の深部まで観察する方法が知られていた。しかし有機溶媒を用いる方法には、蛍光タンパク質が消光するという現代のイメージングにおいては致命的な欠点があった。これを解決した透明化法が理研の濱らのグループによって開発されたScaleである¹⁾。ScaleA2溶液は4M尿素、0.1% (w/v) TritonX-100、10% (w/v) グリセロールから構成されている。パラホルムアルデヒドで固定したマウスの脳をScaleA2に2週間以上つけておくだけでほぼ完全に

透明化でき、透明化後もGFPなどの蛍光タンパク質の蛍光が維持されている。Scaleの発表後、動物組織における透明化方法の開発が爆発的に進み、SeeDB, CLARITY, Scale CUBICなど様々な方法が開発された^{2~4)}。一方、植物組織においても2014年にWarnerらがScaleをベースとした透明化法を発表して以来、様々な透明化方法が開発されてきた。本稿ではこれまでに発表された植物における透明化方法を概説し(表1)、最後に我々が開発した透明化法TOMEIについて紹介する。

2. 植物における透明化手法

2.1 Warnerらの方法について

2014年に蛍光タンパク質を消光させずに植物組織を透明化する方法がWarnerらによって開発された⁵⁾。彼らが用いた透明化液はScaleと同様に尿素、TritonX-100、グリセロールで構成されている。トウモロコシの葉を用いて蛍光染色を行う場合は、グルタルアルデヒドおよびパラホルムアルデヒドを用いて固定処理した後、10% (w/v) KOHにより色素を脱色し、透明化液(6M尿素、0.1% (v/v) TritonX-100、30% (v/v) グリセロール)によって透明化を行う。エンドウの根に形成される根粒の場合はパラホルムアルデヒドによる固定後、透明化液につけることで透明化を行う。一方タバコの葉を用いて蛍光タンパク質を観察する場合も、パラホルムアルデヒドによる固定処理後、透明化液に浸し透明化を行う。Warnerらの方法では、蛍光染色を観察する場合は1週間程度、蛍光タンパク質を観察する場合は1~3週間程度の時間がかかる。

^{a, b} 〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641

TEL: 04-7124-1501 内線 (3442)

* E-mail: sachi@rs.tus.ac.jp

2016年8月8日受付, 2016年9月29日受理

表 1 植物における透明化手法の比較.

植物における透明化手法	蛍光染色	蛍光タンパク質	時間	試料
Warner らの方法	Calcofluor White, SYTO13, Alexa594, 568	Citrine	1～3週間	トウモロコシとタバコの葉, エンドウの根粒
ClearSee	Calcofluor White, Hoechst33342	GFP, mApple, mCitrine, mClover, mGFP5, mRFP, mTFP1, sGFP, tdTomato, Venus	4日～4週間	シロイヌナズナ個体, ヒメツリガネゴケ
PEA-CLARITY	Calcofluor White, PI	CFP, GFP	5～7週間	シロイヌナズナとタバコの葉
TOMEI	Calcofluor White, DAPI, SYBR-Green I	GFP, tdTomato, YFP	2～6時間	シロイヌナズナ個体と根こぶ, イネの葉

2.2 ClearSee について

Warner らの方法をさらに短時間で高効率にしたのが、2015年に名古屋大の栗原らが開発した ClearSee である⁶⁾。ClearSee は化合物スクリーニングを行い、Scale の組成を植物組織に最適になるよう改良した。まず、透明化効率を評価するためにパラホルムアルデヒドで固定したシロイヌナズナの葉を候補化合物の溶液に入れ、溶液中に溶出したクロロフィルの蛍光をプレートリーダーによって測定した。次に、蛍光タンパク質が候補溶液中でどの程度安定か評価するために、蛍光タンパク質 Venus を候補化合物の溶液に加えその蛍光強度を測定した。これら2つの方法で Scale の基本的組成である尿素系化合物、界面活性剤、多価アルコールの3種類の化合物をそれぞれ1つずつスクリーニングし、最も透明化効率が高く、蛍光タンパク質が安定になるように選ばれた化合物を組み合わせた。その結果、透明化試薬 ClearSee は、25% (w/v) 尿素、15% (w/v) デオキシコール酸ナトリウム、10% (w/v) キシリトールから構成される。パラホルムアルデヒドで固定した試料を ClearSee につけておくだけで透明化でき、シロイヌナズナの葉や根であれば4日、芽生え全体であれば7日で透明化できる。ClearSee により5ヶ月間室温で処理し続けた花粉の蛍光タンパク質 (mTFP1, sGFP, Venus, mApple) は安定に維持されていた。シロイヌナズナの花粉に蛍光タンパク質を発現させ、ClearSee でめしべを透明化することで、花粉管の伸長の様子をめしべの表皮を通して観察することができる。さらに、透明化後に Calcofluor White や Hoechst33342 などで細胞壁や細胞核を蛍光染色することも可能である。また、ヒメツリガネゴケの茎様体も透明化でき、発現させたヒストン H2B-mRFP も消光させずに観察できる。

2.3 PEA-CLARITY について

動物の透明化手法 CLARITY を植物に応用した方法が、2015年に Palmer らによって開発された Plant-Enzyme-Assisted (PEA)-CLARITY である⁷⁾。CLARITY では固定した試料をアクリルアミドゲルに包埋し、電気泳動を行う、もしくは高濃度の界面活性剤で処理することで脂質を除去し試料を透明化する方法である。PEA-CLARITY では植物の葉をパラホルムアルデヒド、アクリルアミド、ビスアクリルアミド

などの混合液に入れ、一晩かけて液を葉に浸透させたのち、37°C でゲルを重合させる。この試料が入ったゲルを界面活性剤である SDS 溶液で1ヶ月ほど処理し、脂質を除去する。SDS をよく洗い流した後、アミラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、キシログルカナーゼなどを含む細胞壁消化酵素で1週間ほど処理することで、非常に高い透明度を実現した。PEA-CLARITY で透明化した後も蛍光タンパク質は消光することなく観察でき、免疫染色も行うことができる。ただし、一つの試料を観察するのに1～2ヶ月ほどの時間がかかるというデメリットがある。

3 新たな植物透明化手法 “TOMEI”

3.1 TOMEI-I：蛍光染色を行う場合

透明化にかかる時間を最も短縮した方法が、2016年に我々が開発した Transparent plant Organ MEthod for Imaging (TOMEI) である⁸⁾。この方法は Scale などの尿素、界面活性剤、多価アルコールを用いる方法とは異なり、2,2'-チオジエタノール (TDE) のみを用いて透明化を行う。蛍光タンパク質はほとんどの有機溶媒によって消光してしまうが、TDE 中では安定に存在できる。蛍光染色を行う場合は、ファーマー (カルノア) 液 (酢酸:エタノール=1:3) を用いて固定することで色素を完全に脱色した後、97% TDE により透明化を行う (TOMEI-I)。固定前、固定後、透明化後のシロイヌナズナの芽生えを並べると、明らかに透明化した芽生えが透き通っているのがわかる (図1)。我々はシロイヌナズナの葉に対してファーマー液による固定のみを行った場合と TDE による透明化まで行った場合で、DAPI 染色の蛍光シグナルを検出できる深さを比較した。その結果、固定のみを行った場合では、葉の表の表皮から葉の中央の維管束付近までの約 50 μm までしか明確な DAPI 染色の蛍光シグナルを検出できなかった。一方、TDE 処理を行うと約 80 μm の厚さの葉の表の表皮から裏の表皮までの蛍光シグナルをすべて検出でき、405 nm で励起したときの細胞壁や維管束構造の自家蛍光も完璧に観察できた。シロイヌナズナの蕾を TOMEI-I により、萼片を剥がすことなく、内部のめしべやおしべの細胞核や細胞形態を観察することができた。特に、萼片を剥がして走査型電子顕微鏡により解析していた変異体

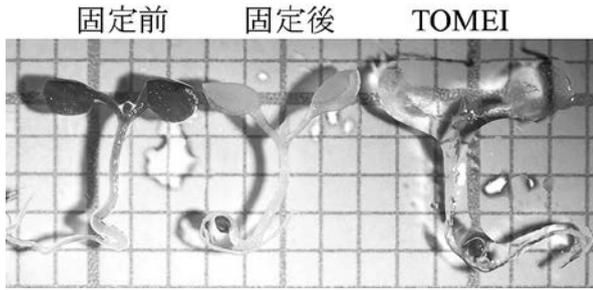


図1 播種後1週間のシロイヌナズナ芽生えをTOMEI-Iによって透明化した。固定によって脱色され、TOMEI-I処理後の試料は透明になっている。グリッドの目盛りは1 mm。

のめしべの微細な形態異常も明確に解析できた。また、葉肉細胞の細胞体積と細胞核・DNA量の関係を初めて明らかにし、発生・分化の制御因子により、その関係が変化することを見いだした⁹⁾。シロイヌナズナの細胞では、DNA複製のみを行い細胞分裂をスキップすることで、細胞1つあたりのDNA量を増やす核内倍加という現象が起こることが知られていた。核内倍加が起こった葉の表皮細胞は起こっていない表皮細胞よりも細胞体積が大きくなるため、シロイヌナズナの細胞体積は核あたりのDNA量に比例すると信じられてきた。しかしTOMEI-Iを用いた深部イメージングにより、葉肉細胞ではDNA量が増加してもそれほど細胞体積が増加せず、体積がDNA量に比例しないことを明らかにすることができた。これは、TOMEIによる深部イメージングが、組

織や器官の内部にある細胞を解析して新たな発見をもたらした例と言える。

3.2 TOMEI-II：蛍光タンパク質を観察する場合

蛍光タンパク質をTOMEIにより観察するときは植物試料をパラホルムアルデヒドによって固定し、TDEによって透明化を行う(TOMEI-II)。蛍光タンパク質に与える影響を最小限にするため、TDEは20%ごとに段階的に濃度を上げて置換する。TOMEI-IIを用いた場合、葉緑体に含まれる色素を完全に脱色することができないが、組織の光透過率は大きく上昇する。核タンパク質であるヒストンH2B-tdTomatoを発現するシロイヌナズナを用いてTOMEI-IIにより透明化を行うと、約120 μm の厚さの葉の表側の表皮から裏側の表皮までH2B-tdTomatoの蛍光を観察することができた。シロイヌナズナの根に線虫が感染して形成される根こぶをまるごと透明化することが可能である。さらに、ヒストンH2B-GFPと細胞膜マーカーであるLTI6b-tdTomatoを共発現する植物体を用いることで、根こぶの巨大細胞の輪郭と細胞核を明確に可視化できた。巨大細胞は線虫の感染により本来は起こらない異常な核内倍加および多核化が進行し形成される。大きくなった巨大細胞は最終的に線虫の餌になる。このように他生物によって異所的に誘導された核内倍加による核相の増大とそれに伴う細胞体積の増加をTOMEI-IIを用いることで定量的に評価でき、細胞体積の増加が核相の増加に比例していることが明らかとなった。また、ヒストンH2B-GFPを発現するシロイヌナズナの根を用いて、単に固定した試料と透明化

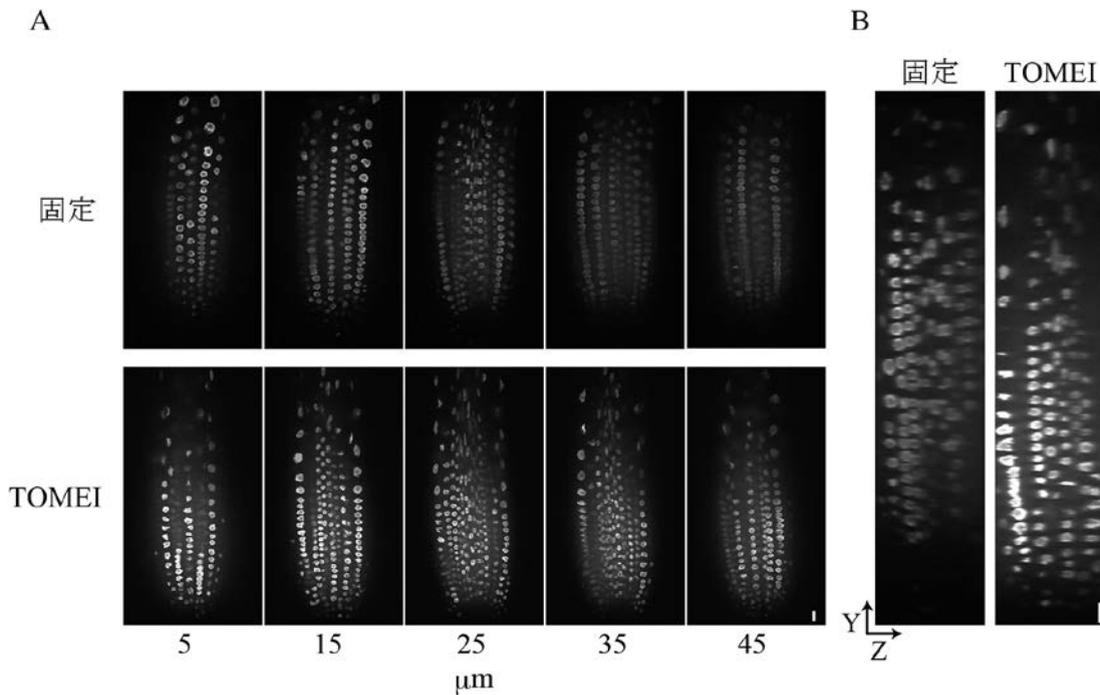


図2 (A) ヒストンH2B-GFPを発現するシロイヌナズナの根をパラホルムアルデヒド固定した試料とTOMEI-IIにより透明化した試料を比較した。根の表面から5 μm の深さからZ軸方向に45 μm の深さまで10 μm おきに撮影した画像を並べた。どの深さの画像を比較してもTOMEI-II処理した試料の方が固定した試料に比べて蛍光輝度が高い。これはTDEによって細胞内外の屈折率が一定になり、光の散乱が抑制されたことが原因と思われる。スケールバーは10 μm 。(B) (A)で撮影した画像をY-Z方向に再構築した画像。Z軸インターバルは1 μm 。Z方向の表層から深部までTOMEI処理した試料の方が蛍光輝度が高いことがわかる。スケールバーは10 μm 。

した試料のGFP蛍光輝度を比較すると、透明化した試料の方が表層から深部まで蛍光輝度が高いまま観察される(図2)。これはTDEによって細胞内、カバーガラス、イメージンオイルの屈折率が一定となり細胞から発せられた蛍光が散乱することなく対物レンズに集光されるからである。すなわち、TOMEI-IIは深部だけでなく表層付近を観察する際も、蛍光タンパク質の蛍光をより明るく観察できるという利点がある。また、TOMEI-II処理後少なくとも72時間はtdTomatoの蛍光強度が減少しないことを確認している。さらに、TOMEI-IIでは蛍光タンパク質の観察と蛍光染色も同時に行うことができる。核染色用のDAPI、SYBR-GreenIおよび細胞壁染色用のCalcofluor Whiteと蛍光タンパク質の同時観察が可能である。特に大きな利点は、TOMEI-I、-IIの全行程が2~6時間で完結するため、ハイスループットなスクリーニング解析などサンプル数が多い場合にも短時間で実験を終了できる点である。さらに、イネやエンドウなどの作物の透明化も可能であることから、作物の深部構造に基づいた品種選抜や品種改良、作物内部に寄生している害虫の非破壊的検出など、農作物の解析・評価・定量に貢献することが期待されている。

4. 今後の展望

TOMEI-IIではクロロフィルを完全に脱色できないため、クロロフィルを脱色でき且つ蛍光タンパク質の蛍光を安定に保持できる改良版TOMEI-IIの開発を目指している。

謝 辞

TOMEIは、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)戦

略的創造研究推進事業チーム型研究(CREST)「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化と生産物活用のための基盤技術の創出」および文部科学省・新学術領域「植物の成長可塑性を支える環境認識と記憶の自律分散型統御システム」の科学研究費の助成を受けて実施した研究成果である。

文 献

- 1) Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A. and Miyawaki, A.: *Nat Neurosci.*, **14**, 1481–1488 (2011)
- 2) Ke, M.T., Fujimoto, S. and Imai, T.: *Nat Neurosci.*, **16**, 1154–1161 (2013)
- 3) Chung, K., Wallace, J., Kim, S.Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A.S., Davidson, T.J., Mirzabekov, J.J., Zalocusky, K.A., Mattis, J., Denisin, A.K., Pak, S., Bernstein, H., Ramakrishnan, C., Grosenick, L., Gradinaru, V. and Deisseroth, K.: *Nature*, **497**, 332–337 (2013)
- 4) 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. and Ueda, H.R.: *Cell*, **157**, 726–739 (2014)
- 5) Warner, C.A., Biedrzycki, M.L., Jacobs, S.S., Wisser, R.J., Caplan, J.L. and Sherrier, D.J.: *Plant Physiol.*, **166**, 1684–1687 (2014)
- 6) Kurihara, D., Mizuta, Y., Sato, Y. and Higashiyama, T.: *Development*, **142**, 4168–4179 (2015)
- 7) Palmer, W.M., Martin, A.P., Flynn, J.R., Reed, S.L., White, R.G., Furbank, R.T. and Grof, C.P.: *Sci Rep.*, **5**, 13492 (2015)
- 8) Hasegawa, J., Sakamoto, Y., Nakagami, S., Aida, M., Sawa, S. and Matsunaga, S.: *Plant Cell Physiol.*, **57**, 462–472 (2016)
- 9) Katagiri, Y., Hasegawa, J., Fujikura, U., Hoshino, R., Matsunaga, S. and Tsukaya, H.: *Development*, **143**, 1120–1125 (2016)