

連載ミニレビュー

作物の形態研究法：マクロからミクロまで 共焦点レーザー走査顕微鏡法の特徴

近藤歩¹⁾・住ノ江真悟²⁾・多和田昌弘²⁾

(¹⁾名城大学農学部, ²⁾名城大学理工学部)

蛍光染色法は、組織や細胞構造の形態学的解析にとどまらず、細胞小器官や生体分子の動態解析も可能にし、細胞機能を明らかにする上で重要な役割を果たしている。さらに、共焦点レーザー走査顕微鏡（以下、共焦点顕微鏡）の登場により、従来の蛍光画像に精細さや立体的な視野が付与された。近年、生物系分野の学術誌の表紙にも蛍光画像図で飾られたものが多く見受けられ、その鮮明な図に思わず目を留めたことのある人も少なくないであろう。このような蛍光画像図の大半は、共焦点顕微鏡によって得られたものである。いまや共焦点顕微鏡は、細胞レベルの研究分野では欠かすことのできない装置のひとつになりつつある。本稿では、共焦点顕微鏡の原理およびその代表的な用途について紹介する。

1. 原 理

ある物質に、特定の波長の光を照射すると、物質中の分子あるいは原子が光エネルギーを吸収し、そこに含まれる電子が基底状態から励起状態へ遷移する。しかし、この励起状態は不安定のため、エネルギーを吸収した電子は、すぐに基底状態へ戻る。この時に放出される光が蛍光である。そして、この最初に照射した光を励起光と言う。

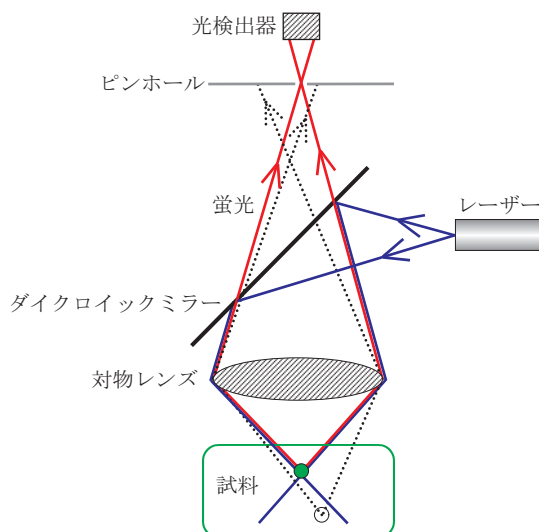
蛍光強度は励起光強度に比べると、極めて微弱（ 10^{-6} 倍程度）であるために、蛍光観察には強い光源が必要となる。通常の蛍光顕微鏡では、その光源として超高圧水銀灯が使われている。一方、共焦点顕微鏡の光源には、高輝度の点光源を得るためにレーザーが使用されている。

蛍光顕微鏡では、試料を均一に照射するために、厚みのある試料を検鏡した場合、焦点面からの蛍光像以外に、上下の非焦点領域に由来する像がボケとして重なりあい、観察される像が不鮮明になる。それに対して、共焦点顕微鏡では、図1に示すように、励起光を試料に対して均一に照射するのではなく、レーザー光源からの光（青線）を対物レンズにより試料上に集光し、微小スポットとして照射する。微小スポットで励起された焦点からの蛍光（赤線）は同じ対物レンズによって集められ、ダイクロイックミラーをそのまま通過した後、試料内の焦点と共焦点の位置にあるピンホールを通して光検出器で検出される。しかし、焦点以外からの光（破線）は共焦点位置にあるピンホールで遮断され、光検出器に届かない。つまり、試料の焦点部位に由来する蛍光情報のみを得ることができる。1点からの光だけでは画像にならないので、これをXY方向に走査すれば、試料を横断する光学断層像が得られ、鮮明な内部構造が観察できる。さらに、試料をZ方向（光軸方向）に少

しずつ移動しながら、その都度試料の光学断層像を取得すれば、試料の立体構成も可能となる（小嶋ら 1999）。

2. 用途例

上述の原理からわかるように、共焦点顕微鏡は、高解像度での観察を可能にした。また、その観察像は、1点1点の蛍光情報から構成されるデジタルデータであるため、画像処理や定量化が容易にできる。このような機能は、さまざまな解析に用いられており、以下にその代表的な用途を示した。



第1図 共焦点顕微鏡の原理。共焦点顕微鏡の光路を示す（本文参照）。

(1) 細胞の内部構造の観察

通常の光学顕微鏡で、色素体以外のオルガネラを観察することは、きわめて困難である。電子顕微鏡を利用すれば細胞内の微細構造を明らかにできるが、採取した試料をできるかぎりそのままの状態を観察する場合には適さない。しかし、現在では、各種オルガネラの特異的な構造・成分をもとに染め分けできる蛍光色素が開発されており、細胞組織やオルガネラなどの検出が容易に行えるようになった。そして、共焦点顕微鏡によって試料の厚さの影響を除くことができ、細胞の内部構造を詳細に観察できるようになった。微小管やアクチンなどの細胞骨格系の立体配置の解析では、共焦点顕微鏡の利用例が多数報告されている (Sato ら 2001, Mochida ら 2004)。

(2) 細胞内のタンパク質の局在解析

組織標本中のタンパク質を蛍光標識抗体と結合させ蛍光像を得ることによって、目的とする酵素タンパク質などの局在を明らかにする方法が、蛍光抗体法である。細胞内におけるタンパク質の存在部位を可視化する方法としては、免疫電子顕微鏡法も知られているが、免疫電子顕微鏡法は細胞内部の局所的な解析に威力を発揮するのに対して、蛍光抗体法は細胞全体を観察する場合に有効である。単一の細胞で C_4 光合成を遂行するアカザ科の植物 *Borszczowia aralocaspica* では、光合成関連酵素の局在が一つの細胞の中でも偏って分布していることが、共焦点顕微鏡で観察した蛍光像で明瞭に示されている (Voznesenskaya ら 2001)。

(3) 蛍光タンパク質を用いた細胞内の観察

オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) 由来の green fluorescent protein (GFP) の発見に伴い、生きた細胞内におけるタンパク質の動きや輸送の観察が簡便になった。GFP は、基質を必要とせず、励起光を当てることによりそれ自身が緑色蛍光を発する。また、その蛍光の退色は比較的少ない。遺伝子工学的に GFP 遺伝子と目的のタンパク質の遺伝子を融合させ、GFP の蛍光を共焦点顕微鏡によって経時的に観察すれば細胞内での目的融合タンパク質の動態を容易に解析できる (松田と河田 2004)。

(4) イオンイメージング

Ca^{2+} は、環境応答における植物ホルモンや光情報伝達など多様な反応を担うシグナルとして寄与していると考えられている。Gehring ら (1990) は、トウモロコシの子葉鞘の屈性と細胞内のイオン濃度の関連について明らかにしている。 Ca^{2+} と結びつくことにより蛍光特性が変化する物質 (蛍光プローブ、Fluo-3) をあらかじめ細胞の中に導入しておき、共焦点顕微鏡を使って、遊離 Ca^{2+} 濃度の増減に応じて変化する蛍光強度を画像化して解析した。イオン感受性蛍光プローブには、 Ca^{2+} 以外にも Na^+ 、 Cl^- 、 Zn^{2+} などが開発されている。

(5) 細胞内構造の立体的解析

細胞の内部構造を立体的に調べようとする場合、従来ならば、連続した薄切片を作成し、これらを1枚ずつ検鏡した後に再び立体構築しなければならない。しかし、共焦点顕微鏡は、多数の組織切片を作成することなく一連の光学的断層像をもとに三次元的な解析ができる。筆者らは、このような解析能を利用し、多肉植物の葉肉細胞に出現する葉緑体の集合体を調査した。その結果、その集合体は多数の葉緑体が核を取り囲むように集まって形成されていることを明らかにした (第2図, 近藤ら 2004)。

3. 留意点

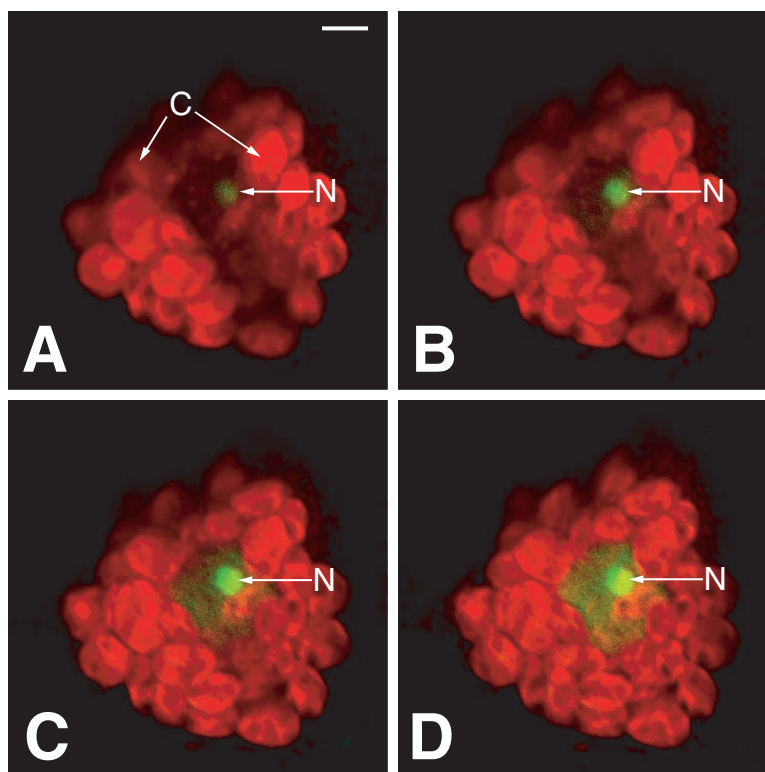
以上のように、共焦点顕微鏡の利用は多岐に及んでいる。新しい蛍光試薬の開発に伴い、今後もさらに解析法は増していくと思われるが、それらを実用するためには、装置や試薬を上手に利用・選択しなければならない。

蛍光観察を行う上で重要なことの一つに、蛍光の分離能がある。例えば、多重染色を行う場合、蛍光波長が近接していれば、蛍光を分離して観察することは難しくなる。また、1つの試料で1種類の蛍光色素を使用する場合でも、自家蛍光を明瞭に分離することが大切となる (若生と福井 2005)。このような蛍光の分離能は、装置に搭載される光源波長や吸収フィルタ、または処理する蛍光色素の特性に関連してくる。

共焦点顕微鏡の光源には、前述したように、レーザーが使用されている。これは、高輝度の点光源を得るためには有効であるが、その一方で、励起光波長が一定の輝線に限定され、蛍光の分離能を制限することになる (村上 2004)。

例えば、共焦点顕微鏡の標準的なタイプに多く用いられているレーザー光源は、Ar (488 nm) と Kr (568 nm) の組合せである。これらのレーザー励起光波長は、それぞれ緑とオレンジ/赤の蛍光検出に対応している。高等植物の場合、葉緑体の自家蛍光の影響を考慮しなければならない。葉肉細胞を観察すると、葉緑体が強い赤色蛍光を発するので、他の蛍光を検出できる領域はおよそ 510~550 nm の緑色領域に限られてくる。仮に、これらの光源に加えて UV レーザーがあれば、青色蛍光領域も利用でき、核の染色によく用いられる DAPI などの蛍光試薬を使うことができる。特に多重染色を行うときは、光源が複数あるとそれだけ蛍光検出領域が増して有利になる。レーザー光源は高額であることや、機種の違いにより、新たに光源を増設することは現実的には難しい。それゆえに、これから共焦点顕微鏡を購入する場合には、実験目的や利用する蛍光物質に合わせてレーザーおよびフィルタ系を選択することが重要になる。また逆に、既存装置の特性にあわせて蛍光標識を考える必要がある (村上 2004)。

一方、通常の蛍光顕微鏡では、光源はスペクトルの広い超高圧水銀灯なので、励起光波長を幅広く利用でき、頻用



第2図 共焦点顕微鏡による葉緑体集合体の立体構造解析。(A)～(D)は1 μm ずつの連続光学断層像。赤色は葉緑体の自家蛍光像、緑色はYOYO-1による核染色像。C, 葉緑体; N, 核。Bar = 10 μm 。

される蛍光物質に合わせたフィルタキューブがいくつか装備されている。目的によっては特殊なフィルタを組み合わせることもできるので、分光条件を比較的容易に選択できるという点では便利である。さらに、同一の試料を、明視野と蛍光視野で観察できることは、蛍光顕微鏡の大きな利点である。

共焦点顕微鏡は、単に画像を撮ることなら難しくはない。しかし、その観察像を正確に解釈していくうえで、形態学の基礎的な知識と自分の目の観察力が大切になる。共焦点顕微鏡を存分に利用するためにも、蛍光顕微鏡の基本的な原理と解析法を身につけておくことが望ましい。

最近では、蛍光ラベルした生体分子、特異的な構造や分子に結合する蛍光プローブ、細胞の生理的狀態に応じて蛍光の変化するプローブなど、多種多様なプローブが開発されている。そのような蛍光試薬の情報を得るには、試薬メーカーのカタログなど利用するのも便利である。蛍光試薬の原理や使用法が丁寧に述べられている。Molecular Probes社からは、蛍光試薬に関するハンドブックが提供されているし、ホームページ (<http://probes.invitrogen.com/>) から情報も得られる。

引用文献

- Gehring, C.A., D.A. Williams, S.H. Cody and R.W. Parish 1990. Phototropism and geotropism in maize coleoptiles are spatially correlated with increases in cytosolic free calcium. *Nature* 345 : 528–530.
- 近藤歩・柴田敬子・櫻井達也・多和田昌弘・船隈透 2004. 多肉植物の葉緑体集合運動に伴う核およびミトコンドリアの挙動。日作紀73 (別1) : 294–295.
- 小嶋秀夫・多和田昌弘・下山宏・原田匡也・加藤剛 1999. レーザ光を用いた新しい顕微鏡。日レ医誌 20 : 357–366.
- 松田賢一・河田光博 2004. GFP による標識。高田邦昭編集, 実験医学別冊: 初めてでもできる共焦点顕微鏡活用プロトコル。羊土社, 東京。78–95.
- 村上徹 2004. 共焦点顕微鏡のしくみと使い方。高田邦昭編集, 実験医学別冊: 初めてでもできる共焦点顕微鏡活用プロトコル。羊土社, 東京。20–38.
- Mochida, K., H. Tsujimoto and T. Sasakuma 2004. Confocal analysis of chromosome behavior in wheat x maize zygotes. *Genome* 47 : 199–205.
- Sato, Y., M. Wada and A. Kadota 2001. Choice of tracks, microtubules and/or actin filaments for chloroplast photo-movement is differentially controlled by phytochrome and a blue light receptor. *J. Cell Sci.* 114 : 269–279.
- Voznesenskaya, E.V., V.R. Franceschi, O. Kuirats, H. Freitag and G.E. Edwards 2001. Kranz anatomy is not essential for terrestrial C_4 plant photosynthesis. *Nature* 414 : 543–546.
- 若生俊行・福井希一 2005. 現場で役立つバイオ機器の使い方・選び方: 共焦点レーザ走査顕微鏡。バイオニクス。オーム社, 東京。3 : 76–81.