

APPLICATION NOTE

高速多光子共焦点レーザー顕微鏡システムA1R MP+

花のなかの秘密～植物透明化試薬ClearSeeを用いた植物内部のイメージング

生物の成り立ちや仕組みを理解する上で、構造の観察は非常に重要であるが、多くの生物、特に植物のからだは不透明であり、内部を奥深くまで観察することは困難であった。名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所の栗原大輔先生と水多陽子先生らのグループは、蛍光タンパク質を消失することなく植物を丸ごと透明化する試薬ClearSeeを開発した。この試薬は、さまざまな植物のからだを透明化することが可能であり、構造と蛍光を保持したまま植物の深部観察を実現した。

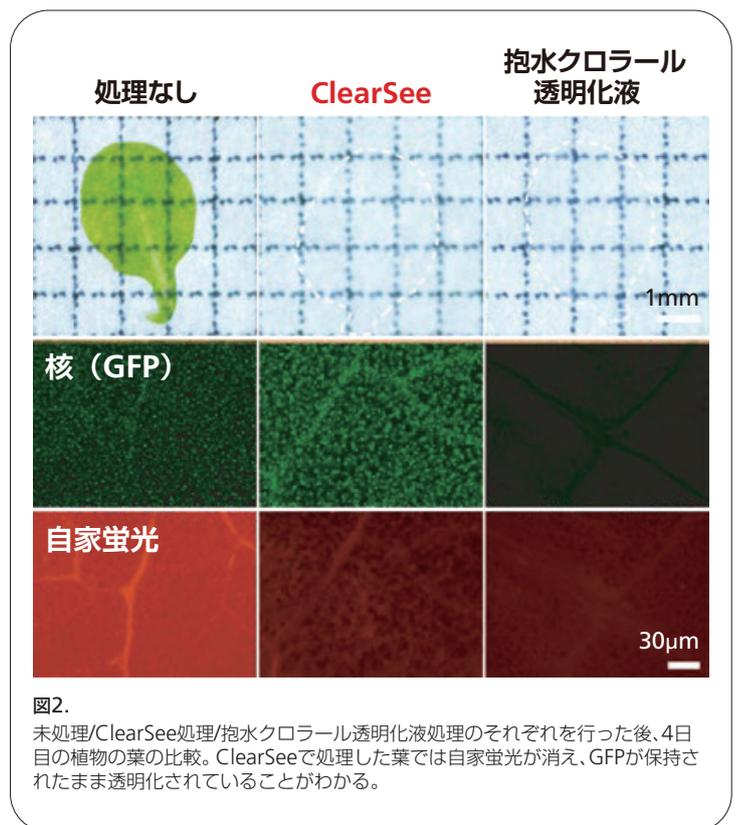
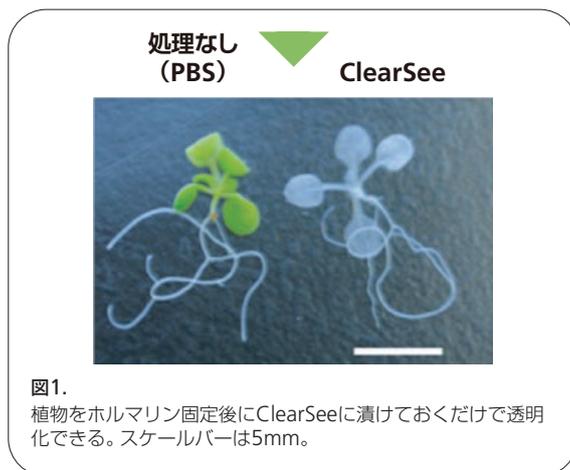
本アプリケーションノートでは、シロイヌナズナの花をClearSeeで透明化し、さらに、生物の深部観察に適した多光子励起共焦点レーザー顕微鏡A1R MP+で観察した例を紹介する。花粉管を色分けすることにより、それぞれの花粉管がどのように伸びて受精し、種子をつくるのかを詳細に可視化できている。

植物の組織と自家蛍光

花粉管の伸長場所は花の一番奥であるが、植物は屈折率の異なる細胞からできているため、切片の作成や解剖を行わずに内部を観察することは困難である。しかし、切片の作成や解剖によってでは組織の構造が失われる上、蛍光タンパク質による解析は困難である。また、葉緑体クロロフィルには、強い自家蛍光があるため、観察の妨げとなる。

植物透明化試薬ClearSee

名古屋大学の栗原大輔先生と水多陽子先生らのグループは、クロロフィルを植物から除去し、しかも蛍光タンパク質を消してしまうことのない植物透明化試薬を探索した結果、尿素、界面活性剤、キシリトールから成るClearSeeの開発に成功した。植物をホルマリン固定後にClearSeeに浸けておくだけで透明になり（図1）、4日後には、自家蛍光が消え、GFP（蛍光タンパク質）を保持したまま透明化することができた（図2）。



処理なし



ClearSee



図3.

ClearSee不処理/処理後の花粉管の多光子励起共焦点レーザー顕微鏡画像

サンプル：シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の花のめしべの花粉管を、蛍光タンパク質 (mApple, Venus, mTFP1) で標識後、ClearSeeにより透明化

対物レンズ：CFI75 アポクロマート 25XC W 1300、NA: 1.10、W.D.: 2.00、mm

画像ご提供：名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所 栗原大輔先生、水多陽子先生



NIKON JOICO AWARD
ウェブサイト

多光子励起共焦点レーザー顕微鏡で見る花の中

シロイヌナズナの花を、青、緑、赤の3色の蛍光タンパク質で標識された花粉で受粉させ、ホルマリン固定した後にClearSeeを使用して組織を透明化し、多光子励起共焦点レーザー顕微鏡A1R MP+を用いて990 nmの励起波長で観察した(図3)。

これにより、解剖を行うことなくめしべを丸ごと観察することができた。また、組織の形態を保ったまま、めしべの中での花粉管の伸長の様子やその位置について空間的に研究することが可能となった。

参考文献

Daisuke Kurihara, Yoko Mizuta, Yoshikatsu Sato, Tetsuya Higashiyama (2015)

ClearSee: a rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging.

Development. 142(23): 4168-4179.

Yoko Mizuta, Daisuke Kurihara and Tetsuya Higashiyama (2016)

Visualization of plant sexual reproduction in the whole-mount pistil by ClearSee.

Cytologia 81(1): 1-2.

製品情報

高速多光子共焦点レーザー顕微鏡システム A1R MP+

レゾナント及びガルバノスキャナーを搭載しており、画像の高速取得と高解像度取得を両立している。1300 nmレーザーによる2波長IR同時励起にも対応可能である。正立・倒立いずれの顕微鏡にも搭載できる上、1光子共焦点顕微鏡としても使用可能なシステムである。

・高速：最速毎秒720フレーム (512x16画素)

・高解像度：最大4096 x 4096画素

