

# Global-Local Live Imaging Microscope (GLIM) による細胞の局所での事象と細胞全体での事象の並行観察

玉置大介<sup>1,2</sup>, 峰雪芳宣<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 兵庫県立大学大学院生命科学研究科 〒671-2280 兵庫県姫路市書写 2167

<sup>2</sup> JST・SENTAN

**要旨:** 細胞分裂時に細胞の特定の場所(局所)における分子の挙動や構造変化をライブイメージングで観察していると、細胞の全体像が同時には観察できない。その為、この局所での変化が、実際に細胞分裂のどの現象と対応しているのか判定できないことがある。そこで、私たちは細胞表層の局所における分子やオルガネラの挙動の観察と並行して、細胞全体がどのような状態か観察できる“局所・大局ライブイメージング顕微鏡システム(Global-Local Live Imaging Microscope System, GLIM System)”を開発した。本総説ではGLIMシステムの概要と、実際に数種の植物細胞についてGLIMシステムを用いた応用例を紹介し、今後のGLIMシステムの展望について考えたい。

## A microscope system for recording the local structural dynamics and the whole cell events in parallel

Daisuke Tamaoki<sup>1,2</sup>, Yoshinobu Mineyuki<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Shosha 2167, Himeji 671-2280, Japan

<sup>2</sup> JST SENTAN, Japan

Author for correspondence: Yoshinobu Mineyuki, Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Shosha 2167, Himeji 671-2280, Japan, mineyuki@sci.u-hyogo.ac.jp

**Summary:** It is not easy to record the local changes of cytoplasmic structure and the global cellular event simultaneously. We have developed a microscope system, Global-Local Live Imaging Microscope (GLIM) System, that can record the local molecular structural dynamics and the whole cell event in parallel without exchanging objectives. Here, we explain the GLIM system, and demonstrate some results in plant cell division and morphogenesis. The possible applications of GLIM system in future will also be discussed.

**Key words:** cell division, live cell imaging, microscope system, parallel observation

### はじめに

近年、顕微鏡技術の発展に伴い多くの生物学的知見が得られてきた。例えば、全反射蛍光(TIRF)顕微鏡を用いれば、エバネッセンス領域での1分子イメージングが可能であり、分子の局在や挙動を追跡することが可能である(Axelrod, 1981, Funatsu et al. 1995)。一方で、植物細胞では試料がカバーガラスに密着していないことが多く、また細胞壁が厚いため、植物細胞のTIRF顕微鏡によるエバネッセンス領域での観察は困難であることが多い。しかし、斜光照明を用いることで、細胞表層の分子の挙動の観察が可能である(Konopuka and Bednarek, 2008)。

この観察方法を用いて、細胞表層の特定の領域(局所)における分子の挙動や構造変化をライブイメージングで観察していると、細胞の全体(大局)像が同時には観

察できない。その為、局所での変化が、実際に細胞のどの現象と対応しているのか判定できない。既存の顕微鏡を用いて局所と大局を並行して観察する場合、局所と大局の観察を切り換える度に、対物レンズおよびそれに適するイマージョンオイルを交換し、顕微鏡のステージの位置やフォーカスをなるべく早く調整して記録する必要がある。しかし、それでは時間がかかりすぎて実用的でない。

そこで、対物レンズの交換なしに、細胞表層の局所における分子の挙動の観察と並行して、細胞全体がどのような状態か観察できる“局所・大局ライブイメージング顕微鏡システム(Global-Local Live Imaging Microscope System, GLIM System)”を開発した。GLIMシステムでは、大局観察で局所観察の像をズームアウトした像よりも広視野が捉えられるように工夫を行っているのが特徴である。

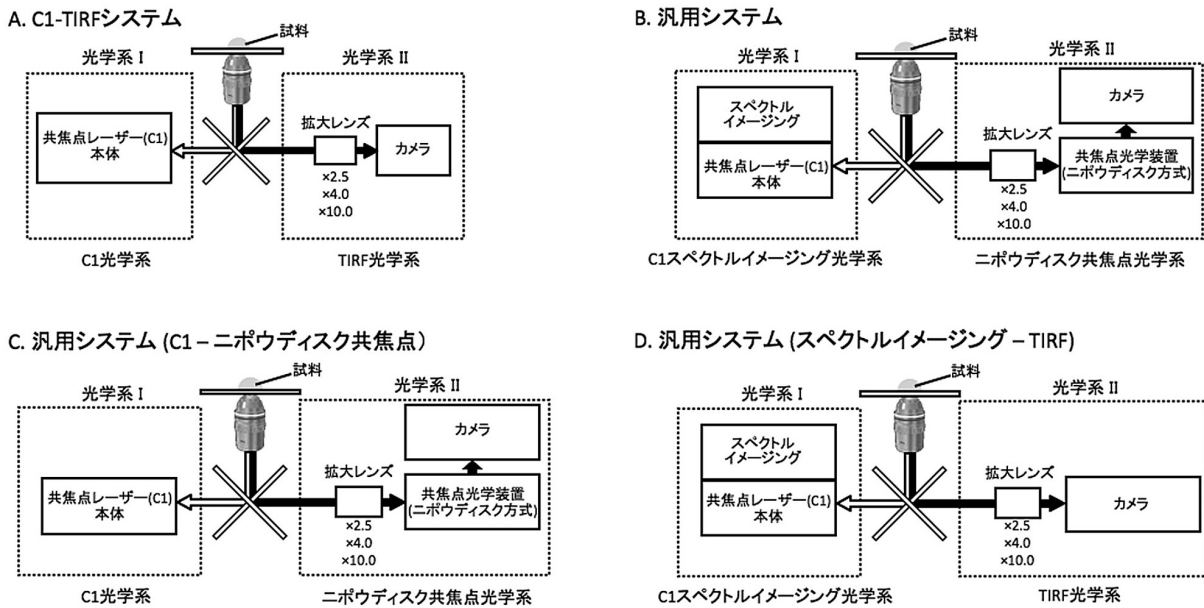


図1 GLIMシステムの概要。GLIMシステムは2つの光学系を装備しており、顕微鏡内部の切り換えスイッチにより切り換えることができる。光学系Iでは大局（細胞全体）像を、光学系IIでは局所（細胞の特定領域）像を記録することができる。光学系IIにはx2.5～x10の拡大レンズやズームレンズを挿入することができる。AはGLIMシステムの基本型であり、光学系Iはガルバノ式の共焦点レーザー光学系、光学系IIはTIRF光学系となっている。B-Dは汎用型であり、スペクトルイメージングシステムやニポウディスク式共焦点レーザーシステムを組み合わせた構成である。私たちはCとDの構成を現在使用している。

### GLIMシステムの概要

図1で示すように、GLIMシステムは1台の顕微鏡に、細胞全体を記録（大局観察）するためのガルバノ式の共焦点レーザー光学系（光学系I）と、細胞表面の特定部位の記録（局所観察）のためのEM-CCD光学系（光学系II）の二つの光学系を装備したシステムである（図1）。光学系IIには拡大レンズを挿入することが可能であり、光路を切り換えることで、対物レンズの交換無しに、局所観察と大局観察を並行して行うことができる。光路やフィルタの切り換え、光源のON/OFFをスムーズに行うため、制御用ソフトウェアを開発し、それをインストールしたコンピュータでGLIMシステムを制御した。局所観察用のEM-CCD光学系にはEM-CCDカメラを使用して観察できる光学系である全反射蛍光（TIRF）システム（図1A, D）またはニポウディスク式共焦点レーザーシステム（図1B, C）を採用し、1分子レベルでの解析も可能な局所画像を取得することを可能にした。大局観察では、広領域をレーザー走査することで、EM-CCD光学系において透過光観察を行った場合に得られる像の17倍の広視野の画像を取得することが可能である（図2A, B, E, F）。蛍光観察の場合は実用性から考えると、カメラの前に装着する拡大レンズはx4が限界で、大局観察で局所観察の6.8倍（図2C, D）

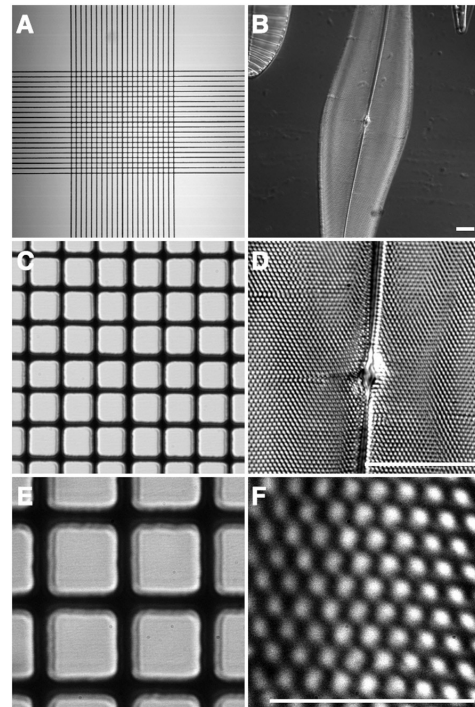


図2 GLIMシステムによるマイクロメータ（A, C, E）とケイ藻（B, D, F）を使用した局所像と大局像の視野の比較像。図は各条件での最大視野を示している。（A, B）光学系Iで撮影した大局像。（C-F）光学系IIで撮影した局所像。マイクロメータはx20、ケイ藻はx100の対物レンズを用いて撮影した。拡大レンズはC, Dではx4.0、E, Fではx10を使用している。x4.0の拡大レンズを用いた場合には大局像に比べ6.8倍、x10を用いた場合は17倍の局所像が得られた。Bar = 5  $\mu$ m。

の視野が最大であった。また、ステージのZ軸をコントロールすることができるので、焦点面の異なる領域を交互に観察することも可能である。大局観察と局所観察の並行観察は、それぞれ1コマの撮影であれば最速で1サイクル30秒で繰り返すことが可能であり、大局観察ではZ-stackでの撮影、局所観察ではリアルタイムレートでの連続撮影も可能となっている。

## GLIMシステムを用いた植物細胞の観察

### 1. オオムラサキツユクサ (*Tradescantia virginiana*) の雄しべの毛の細胞の観察

GLIMシステムは大局および局所撮影において微分干渉による透過像の観察、蛍光観察を自由に組み合わせることができる。オオムラサキツユクサの雄しべの毛の細胞の観察においては、対物レンズはx60の水浸レンズを用い、光学系I、光学系II共に微分干渉光学系とし、光学系Iでは細胞の全体像を、光学系IIでは細胞表面領域の観察を行った。光学系Iでは6つの異なる焦点面において撮影を行い、光学系IIでは10秒間リアルタイム撮影を1分間隔で2時間以上並行して行っ

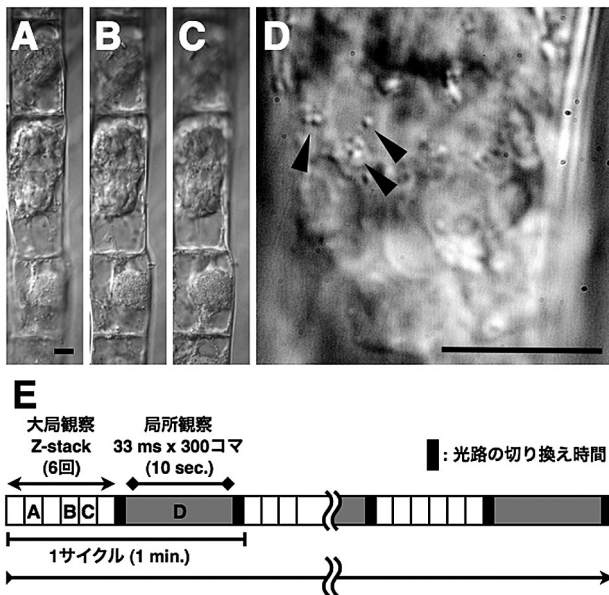


図3 GLIMシステムによるオオムラサキツユクサの雄しべの毛の細胞の観察像。GLIMシステムで2時間以上1分間隔で記録したもののうち、1サイクルで得られるイメージを示している。(A-C) 光学系Iで撮影した大局像。6つの異なる焦点面で撮影した像のうち3つの像を示している。(D) 光学系IIで撮影した局所像。対物レンズはx60、拡大レンズはx4.0を使用した。矢尻：細胞表面に存在する顆粒。(E) A-Dの撮影のタイムスケール。Bar = 10  $\mu$ m。

た(図3)。観察の結果、オオムラサキツユクサのおしべの毛の細胞の分裂の様子と、そのときの細胞表面での小さい顆粒の動きを捉えることができた。得られた局所観察のデータから細胞表面における4-5個の顆粒の動きを200 msおきに各時点でトレースした。トレースしたXY座標上の位置の変化から平均二乗変異を求めグラフを作成し、その平均二乗変異のグラフから拡散係数を10分間隔で求めた。その結果、分裂前期では拡散係数は大きい値を示したが、分裂中期にさしかかると拡散係数の値は小さくなり、中期以降はやや増加したものの前期のときほどには回復しなかった。この結果は細胞表面における顆粒の運動が分裂中期になると低下したことを示している。GLIMシステムを用いることで、顆粒の運動変化がどの時期に生じたか、約1分の分解能で同定することが可能となった。

### 2. タバコ (*Nicotiana tabacum*) BY2培養細胞の観察

次に私たちはGLIMシステムを用いて、GFP-クラスリン軽鎖(CLC)を発現するタバコBY2培養細胞の細胞分裂過程の細胞全体の様子と、分裂面挿入予定領域の細胞表面でのGFP-CLCシグナルの動態変化について、並行タイムラプス観察を行った。植物の細胞分裂における分裂面挿入位置へのメモリー蓄積にはクラスリン依存のエンドサイトーシスが関与することが、電子線トモグラフィーを使った研究からわかっている(Karahara et al. 2009)。ライブイメージングで植物細胞の分裂過程におけるクラスリン動態を詳細に解析できれば、分裂面決定機構解明の一助となると考えられる。BY2細胞の観察には、対物レンズはx100の油浸レンズを用い、光学系Iは微分干渉光学系とし細胞の全体像を、光学系IIではニポウディスク式共焦点レーザーキャニングシステムにより細胞表面領域のGFP-CLCシグナルについて1分間隔で2時間以上並行して撮影を行った(図1C, 図4)。私たちはGLIMシステム制御ソフトウェアの他に、得られたデータを解析するソフトウェアも開発した。この解析ソフトを用いてGLIM観察から得られた局所/大局タイムラプス像からキモグラフ(Mineyuki and Gunning 1988)を作成し、比較すると同時に解析を行った。その結果、分裂前中期に核膜が崩壊すると同時に細胞表面のGFP-CLCシグナルは減少し、その後、細胞板が細胞の中央部分に出現した直後から、細胞表面の分裂面挿入予定位置にGFP-CLCシグナルは密

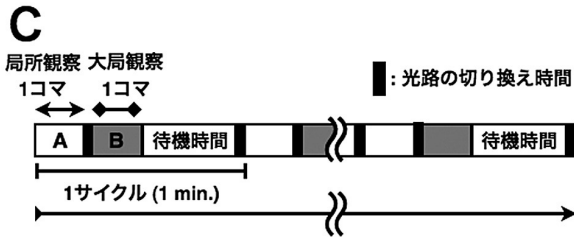
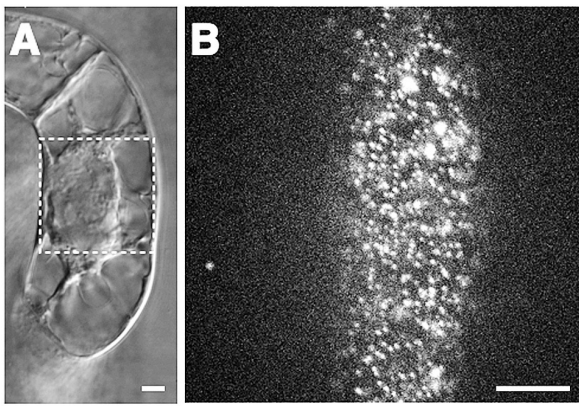


図4 GLIMシステムによるGFP-CLCを発現するタバコ細胞の観察像。GLIMシステムを用いて2時間以上1分間隔で記録したもののうち、1サイクルで得られたイメージを示している。(A) 光学系Iで撮影した細胞の全体像。(B) 光学系IIで撮影したAの破線で囲まれた部分の細胞表面におけるGFP-CLCシグナル。ニポウディスク式共焦点レーザーシステムで撮影した。対物レンズはx100、拡大レンズはx2.5を使用した。(C) A、Bの撮影のタイムスケール。Bar = 5  $\mu$ m。

集した。その一方で、分裂面挿入予定位置の周辺部ではGFP-CLCシグナルの密度は減少した。この結果は、分裂前中期の核膜が破れる段階でエンドサイトーシスの活性が低下し、その後、細胞板の形成が細胞中央部で始まるころに細胞表面の分裂面挿入予定位置においてエンドサイトーシスの活性が急激に高まる可能性が示唆している。GLIMシステムを用いた観察により、タバコBY2細胞において細胞分裂の間の細胞表面におけるクラスリン動態の変化について、細胞分裂の各段階と正確に照らし合わせて解析することが可能となった。

### GLIMシステムの応用

GLIMシステムは低倍率の対物レンズを用いることで、1個の細胞の事象と多細胞からなる組織(あるいは個体)全体の発達過程を追跡することができる。私たちは実際に緑藻コレオケーテの藻体の全体像と藻体を構成するひとつの周辺細胞の様子を並行して記録することができた。x40の対物レンズを用い、光学系Iは微分干渉光学系とし藻体の全体像を、光学系IIも微分干渉光

学系とし、ひとつの周辺細胞を1分間隔で3時間以上並行して撮影を行った。その結果、大局観察では藻体全体の成長の様子を、局所観察ではひとつの周辺細胞内の葉緑体の移動や膜の運動を捉えることができた(図5A, B)。また、GLIMシステムはニコン社製のスペクトルイメージングシステムと組み合わせて撮影することができた(図1D, 図5C-F)。FM4-64で細胞膜を染色したコレオケーテの藻体について、x60の対物レンズを

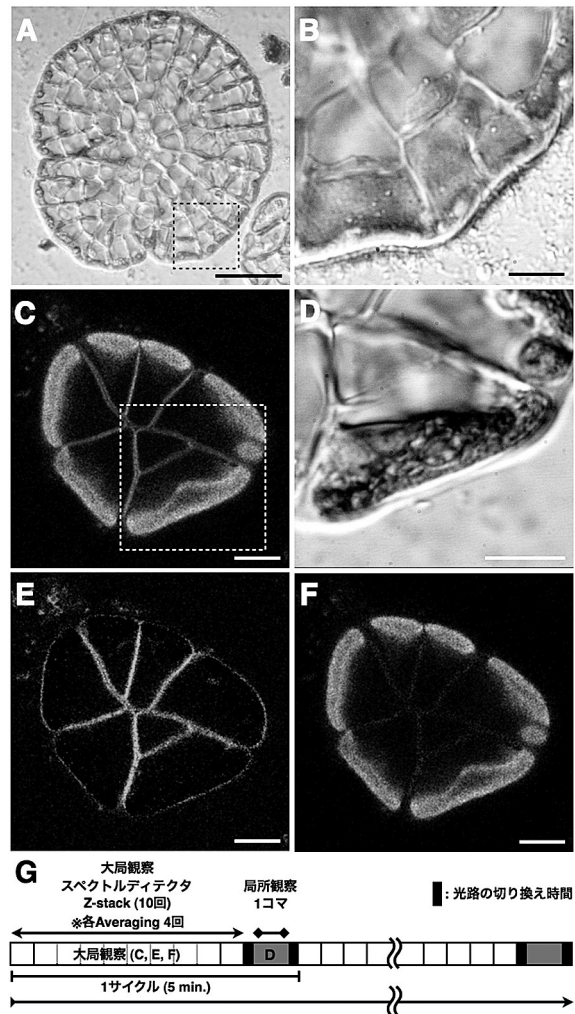


図5 GLIMシステムによるコレオケーテの葉状藻体の観察像。(A) 光学系1で撮影した藻体全体像。(B) 光学系2で撮影したAの破線で囲まれた部分の底面部分の局所像。(C) FM4-64で細胞膜を染色した藻体を通常のディテクタを用いて共焦点レーザー顕微鏡で撮影した像。FM4-64の蛍光と葉緑体の自家蛍光の区別がつかない。(D) 光学系2で撮影したCの破線で囲まれた部分の微分干渉像。(E) スペクトルディテクタを用いてCの藻体を撮影後、分離したFM4-64で染色した細胞膜の蛍光像。(F) Eと同様に分離された葉緑体の自家蛍光像。A, Bはx40、C-Fはx60の対物レンズを用いて撮影した。拡大レンズは共にx4.0を使用している。(G) C-Dの撮影のタイムスケール。Bar = (A) 50  $\mu$ m, (B-F) 10  $\mu$ m。

用い、光学系Iは藻体の全体像についてスペクトルイメージングシステムにより取得し、光学系IIは微分干渉光学系とし、ひとつの周縁細胞を5分間隔で並行して撮影を行った。FM4-64は葉緑体の葉緑素と近い波長の蛍光を発するため肉眼や通常のディテクタでは見つけることはできないが(図5C)、スペクトルディテクタを用いることで、FM4-64と葉緑素の蛍光を分離して表示することができる(図5E, F)。GLIMシステムにスペクトルディテクタを組み合わせることで、大局撮影では藻体を構成する細胞の輪郭と各細胞内の葉緑体の運動を追跡しながら、局所観察で細胞表面の膜や細胞内構造の運動を記録することができた。

### おわりに

私たちは細胞の特定領域と細胞全体を平行観察できる顕微鏡システムを開発してきたが、実際に植物細胞を観察し、新たな知見を得ることができたことから、GLIMシステムが実用に足るということが本研究で示された。植物細胞では、細胞表層が形態形成の場として重要な働きを行っている。例えば、間期の細胞では、細胞膜直下を走る微小管がセルロース繊維の沈着方向を制御し(Baskin 2005)、分裂前期には分裂準備帯が形成され、分裂面の挿入位置制御を行っている(Mineyuki 1999)。この細胞表層での分子レベルでの形態形成の観察は、GLIMシステムの光学系IIのような光学系を用いて広く行われている。しかし、その時の細胞全体の様子を捉えることができないため、局所の事象と細胞全体を比べることが難しかった。GLIMシステムで光学系IとIIを素早く切り換えることで、局所の分子レベルでの動態変化と、細胞全体の様子とほぼ同時に捉えられるようになったことは、今後植物の細胞レベルでの研究に大いに役立つことが期待できる。

またコレオケータの観察でも示されたように、GLIMシステムは低倍率の対物レンズを用いることで細胞だけでなく多細胞から成る組織や個体と、それを構成する特定の細胞の挙動についても並行して観察することが可能であり、発生生物学の研究においても有用であると考えられる。本研究では植物細胞についてGLIMシステムを用いた観察を行ってきたが、動物細胞でも十分に利用可能である。むしろ動物の培養細胞であれば、カバーガラスとより密着して観察を行えるので、植物細胞に加えデータ取得がしやすい可能性も考えられ

る。またステージ上での培養装置とXY軸方向にコントロールできる電動ステージを組み合わせれば、たくさんの細胞集団全体とそこに含まれるいくつかの細胞の挙動を並行して記録することも可能となり、細胞のスクリーニング等にも応用が可能で、創薬や医学の分野でも利用できると考えられる。

### 謝辞

本研究を進めるにあたり、様々なご指摘、ご協力を頂きました三谷商事株式会社の馬野且元氏、株式会社ニコインステックの石渡一之氏、岡村正晴氏に感謝申し上げます。またタバコBY2培養細胞の形質転換体の作成においてご協力いただいた兵庫県立大学大学院の山内大輔博士、中井朋則博士、猿渡徹氏に深く御礼申し上げます。GLMシステムの開発は科学技術振興機構(JST)先端計測分析・機器開発事業の一環として三谷商事株式会社と株式会社ニコインステックと共同で行われました。

### 引用文献

- Axelrod, D. (1981) Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *J. Cell Biol.*, 89: 141-145.
- Baskin, T. I., (2005) Anisotropic expansion of the plant cell wall. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21: 203-222.
- Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K., and Yanagida, T. (1995) Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature*, 374: 555-559.
- Karahara, I., Suda, J., Tahara, H., Yokota, E., Shimmen, T., Misaki, K., Yonemura, S., Staehelin, A., and Mineyuki, Y. (2009) The preprophase band is a localized center of clathrin-mediated endocytosis in late prophase cells of the onion cotyledon epidermis. *Plant J.*, 57: 819-831.
- Konopka, C. A., and Bednarek, S. Y. (2008) Variable-angle epifluorescence microscopy: a new way to look at protein dynamics in the plant cell cortex. *Plant J.*, 53: 186-196.
- Mineyuki, Y., and Gunning, B. E. S. (1988) Streak time-lapse video microscopy: analysis of protoplasmic motility and cell division in *Tradescantia* stamen hair cells. *J. Microscopy*, 150 (1): 41-55.
- Mineyuki, Y. (1999) The preprophase band of microtubules: Its function as a cytokinetic apparatus in higher plants. *Int. Rev. Cytol.*, 187: 1-49.

Received: 1 February 2012