

根の透明化と蛍光染色の試み

森 加奈恵

佐賀大学総合分析実験センター

1. はじめに

中学校の理科の授業で、タマネギの根を用いた細胞分裂中の染色体の観察を行った思い出があるのではないだろうか。この実験では、「植物の根端などの観察を行い、細胞の分裂によって成長が起こることを理解させる」ことを目的としている¹⁾。しかし、プレパラート作成時に根を押しつぶし、細胞が重ならない状態で観察するため、細胞の連なりや細胞分裂によって根が成長していることを観察することは困難である。

そこで、透明化処理した植物の根をサンプルとし、核と細胞壁を蛍光染色することで、本来の構造を保ったまま細胞分裂の様子を観察することを目指した。

2. 透明化処理の比較

今回検討した透明化技術は、TOMEIとClearSeeである。TOMEIは、酢酸ファーミン液（酢酸：エタノール＝1：3）で固定し、核と細胞壁を蛍光染色した後、透明化処理を行った。ClearSeeは、4%パラホルムアルデヒドで固定し、透明化処理した後で、核と細胞壁を蛍光染色した。

サンプルは、収穫したタマネギの根及び万能小ネギの種から発根した短い根を用いた。収穫したタマネギの根は非常に太く、どちらの透明化試薬でも透明にはならなかった。万能小ネギの根は、TOMEIによる処理後、透過した（図1）。なお、青色の部分は、蛍光染色した試薬の色である。一方、ClearSeeでは透明度が低い結果だった。

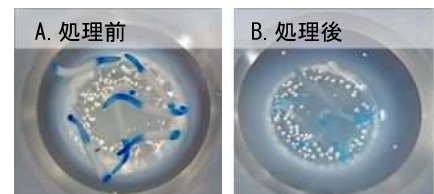


図 1. TOMEI 処理前後の万能小ネギの根

3. 核と細胞壁の蛍光染色の検討

核の染色は、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)、PI (Propidium Iodide)、TO-PRO 3を検討した。いずれも核の蛍光染色試薬として一般的な試薬である。DAPIは核を特異的に染色できており、数週間にわたって安定した蛍光を検出できた（図2）。PIは核だけでなく細胞壁も染色されてしまい、核だけを特異的に染色することはできなかった。TO-PRO 3は核を特異的に染色できたものの、顕微鏡観察中に数秒～数分で褪色してしまったため、安定した観察を行うことができなかった。透明化せずに観察する場合は、非常に安定性が高い蛍光物質であるが、透明化試薬との相性が悪く、非常に速く褪色したものと考えられる²⁾。以上より、核の染色にはDAPIを用いることにした。

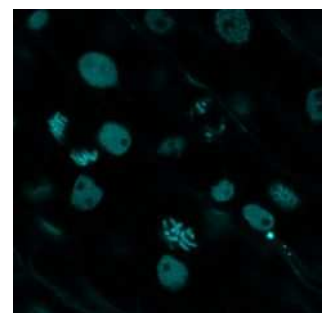


図 2. DAPI で染色した核

細胞壁の染色は、PI、CW (Calcofluor White)、ダイレクトファストスカーレット4BSを検討した。PIは上述の通り、核も染色されてしまったため不適であるが、細胞壁が短時間で中心付近まで染色された。CWは10分間の染色時間では表層しか染色されなかった。また、DAPIに近接した励起・

検出波長のため、二重染色に不適であった。現在、ダイレクトファストスカーレット4BSでの染色を試しているところである。

4. 顕微鏡撮影

現在は、共用研究設備として私が管理している共焦点レーザー顕微鏡 LSM880（カルツァイス）を用いて撮影を行っている。しかし、本設備で細胞分裂中の染色体の様子を観察するための分解能を有する対物レンズで観察可能な厚みは、100～500umである。最終サンプルとしているタマネギの根は数mmの厚みがあるため、透明化したとしても、本学の設備で観察できない。

そこで、イメージング施設連携で縁ができた他機関の設備や技術職員を頼って、撮影を行うことを検討している。まずは、九州大学農学部の補正環付水浸レンズが利用できる共焦点レーザー顕微鏡を借りたい。また、より厚く大きなサンプルを観察できるライトシート顕微鏡や多光子顕微鏡を用いた観察にも挑戦したいと考えている。

4. おわりに

核の染色は動物細胞で行った経験があり、植物の根もPIで細胞壁を染色した経験があったので、簡単にできると考えていたが、透明化試薬には一般的な封入剤とは違う相性があり、最適な条件を探すのに苦労した。また、研究で用いられるシロイヌナズナは根が細く、短時間で染色できるが、今回サンプルとしたタマネギや万能小ネギを染色しようとすると、染色時間の検討も必要だとわかった。

透明化技術を用いたサンプルの観察の相談が増えてきているので、自分でもサンプル作製から観察、解析までの一連の経験を積むことで、利用者にも技術提供できる機会を増やすことができるはずである。また、他機関と事前に連携し、技術職員同士の信頼関係を構築しておくことで、利用者が他機関を利用したい場合にも、橋渡ししやすくなるのではないかと考えている。

5. 参考文献

- 1) 文部科学省, 中学校学習指導要領(平成29年告示)解説 理科編, 平成29年7月, 令和3年8月一部改訂, p.100
- 2) Rachele Tofanelli, Athul Vijayan, Sebastian Scholz, and Kay Schneitzl. "Protocol for rapid clearing and staining of fixed Arabidopsis ovules for improved imaging by confocal laser scanning microscopy." *Plant Methods*, (2019) 15:120

謝辞

本研究は、JSPS 科研費 JP26H00139を受け実施した。また、快くタマネギの根や種を提供いただいた、佐賀大学生物資源教育研究支援センター 於保伸子 技術専門職員、嘉村茂宏 技術専門職員に深く感謝する。