

ニコン多光子共焦点レーザー顕微鏡システムを用いた 生体深部観察による植物受精過程のライブセルイメージング

花の中で花粉管（オス）が胚珠（メス）へと導かれるしくみは花粉管誘引と呼ばれる化学屈性の一種であるが、花粉管は1本だけ誘引され、2本目以降は拒否される。この多精拒否は植物が確実に受精し、より多くの種子を作るために進化させたしくみと考えられるが、その分子機構の全貌は明らかとなっていない。その原因として、花の内部を生きたまま観察するのが困難であったためである。

名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所の水多陽子先生らは、深部到達性が高く生体への侵襲性が低い二光子励起顕微鏡を用いて、シロイヌナズナのめしべ内部を観察する方法を確立した。植物の生体深部観察に適した長波長励起（980nm〜）と二光子励起に適した蛍光タンパク質を用いることで、世界で初めて花粉管誘引や拒否の瞬間を生体内で捉えることに成功した。画像解析の結果、雌雄配偶体と母体による花粉管挙動の時空間的な制御と、多段階の多精拒否のメカニズムが明らかとなった。本研究により、被子植物が花の中で花粉管動態を精密に制御し、効率よく子孫を残すしくみの一端が明らかとなった。

キーワード：二光子励起、生体深部観察、植物受精

実験の背景・目的

めしべは不透明で強い自家蛍光を発するため、深部観察や解析が困難であった。そのため、これまでは解剖や化学固定によって生命活動を停止させためしべを観察する方法が用いられてきた。しかしこれらの方法では時空間情報が失われるため、多精拒否の詳細な解析は困難である。

そこで、初めに二光子顕微鏡を用いた生体深部イメージングが試みられた。しかし、めしべは光を散乱させる複雑な構造を持つため内部観察は容易ではなく、多精拒否を観察できるほど長時間観察することはできなかった。本研究ではこれらの問題を解決するため、まず、めしべ深部観察に適した蛍光タンパク質と励起波長を明らかにした（図1）。次に、めしべ深部を伸長し誘引される花粉管を生きたまま観察する手法を確立した（図2）。これにより、短時間で終了する花粉管の誘引と拒否の詳細な時空間情報を解析し、多精拒否の分子機構を明らかにすることを目的とした。

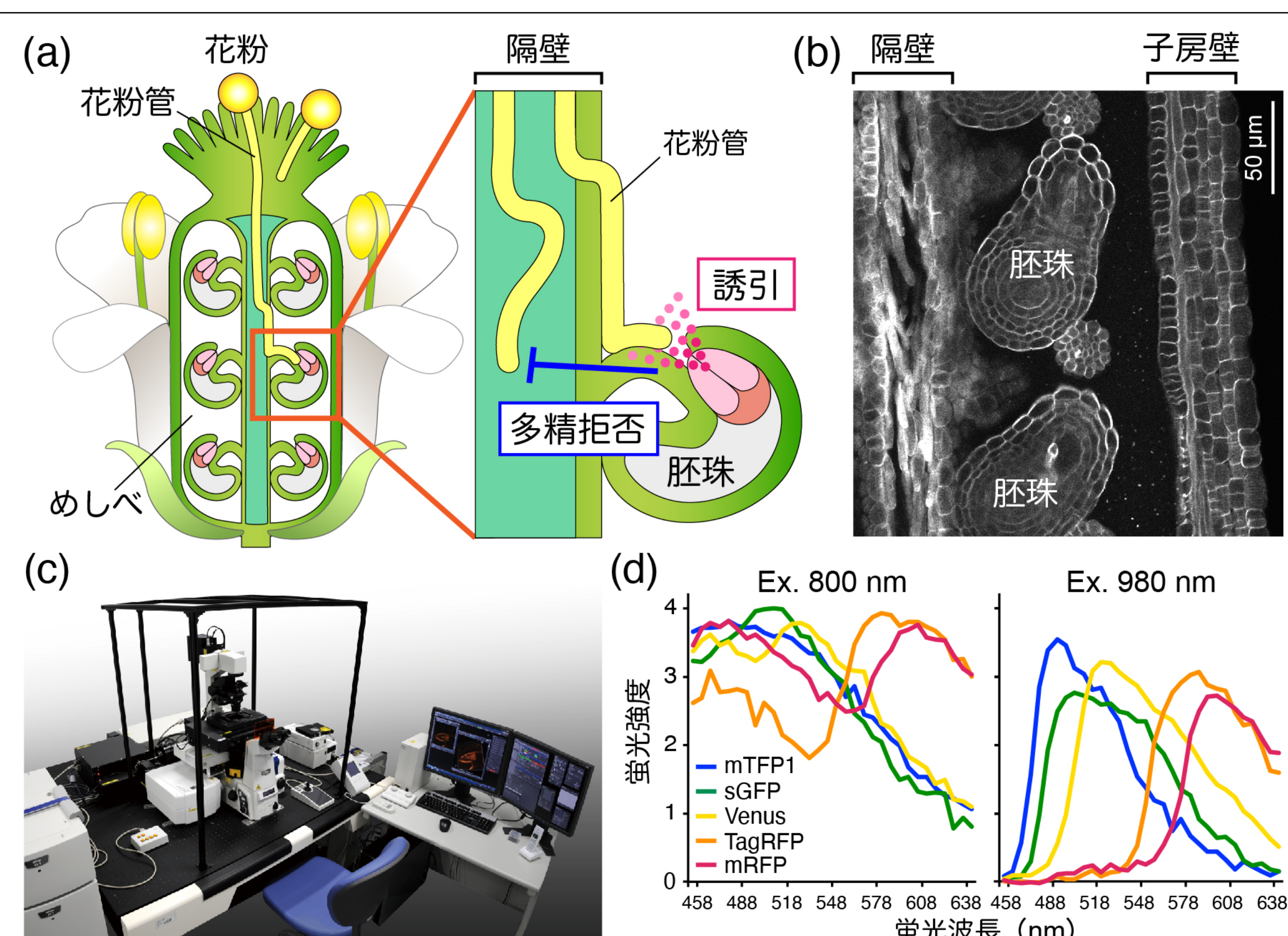


図1. 本研究の背景情報

- (a) 受粉しためしべの模式図。花粉管伸長は誘引シグナルと多精拒否シグナルの両方の影響を受けていると考えられる。
- (b) めしべ内部の組織構造。
- (c) 観察に用いた顕微鏡システム（A1 R MP; 現行機種はAX R MP）
- (d) 蛍光タンパク質の2光子励起スペクトルの比較

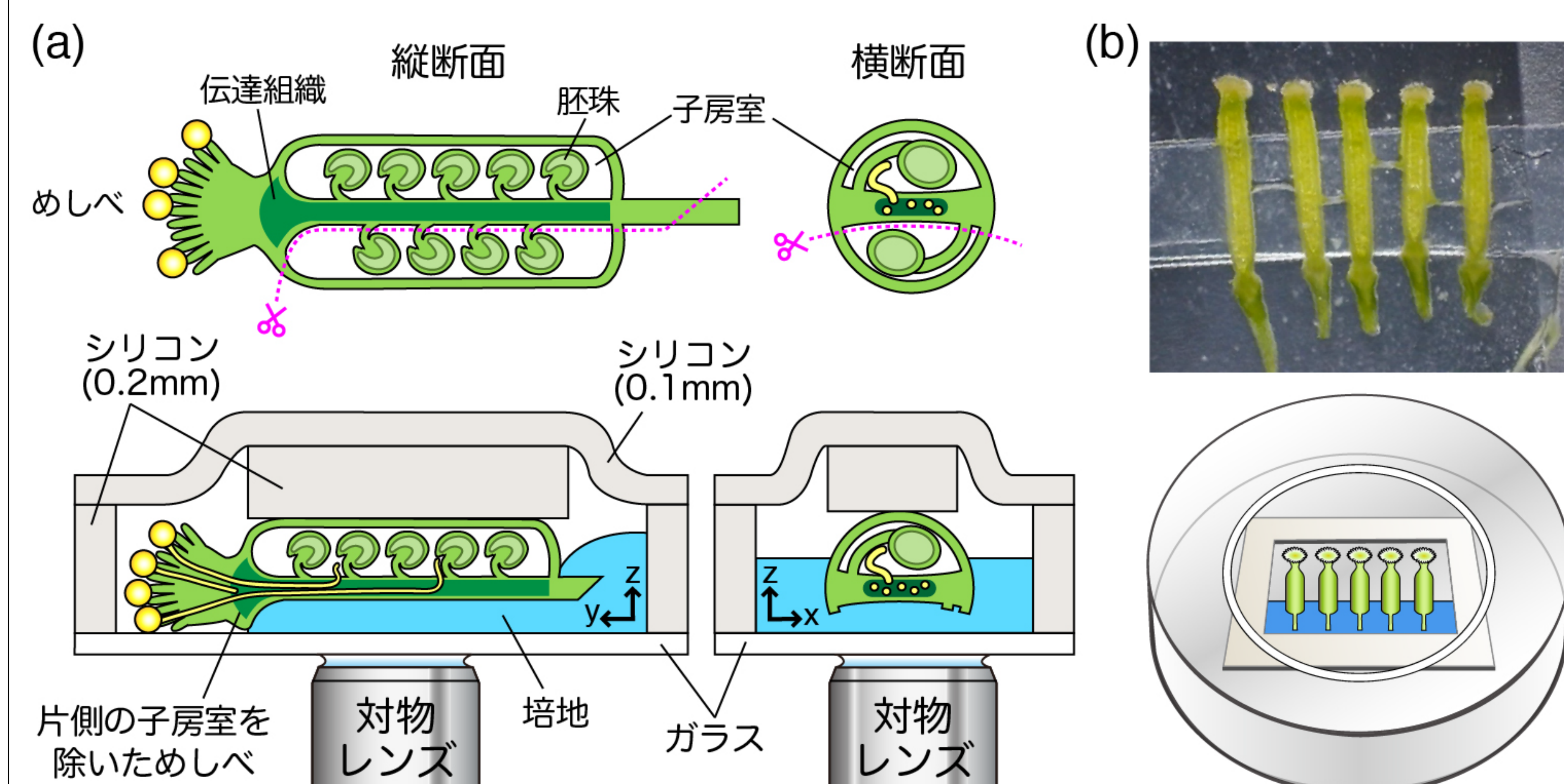
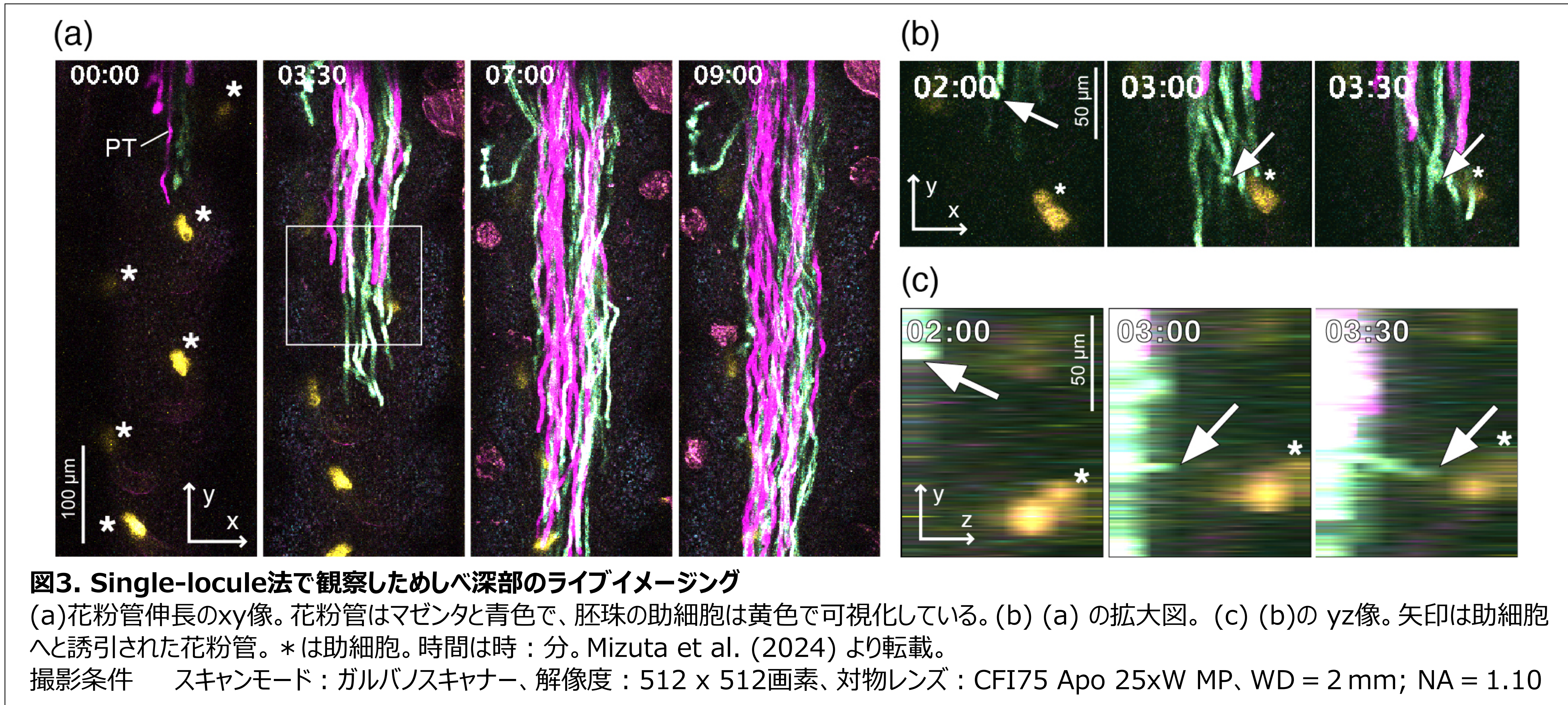


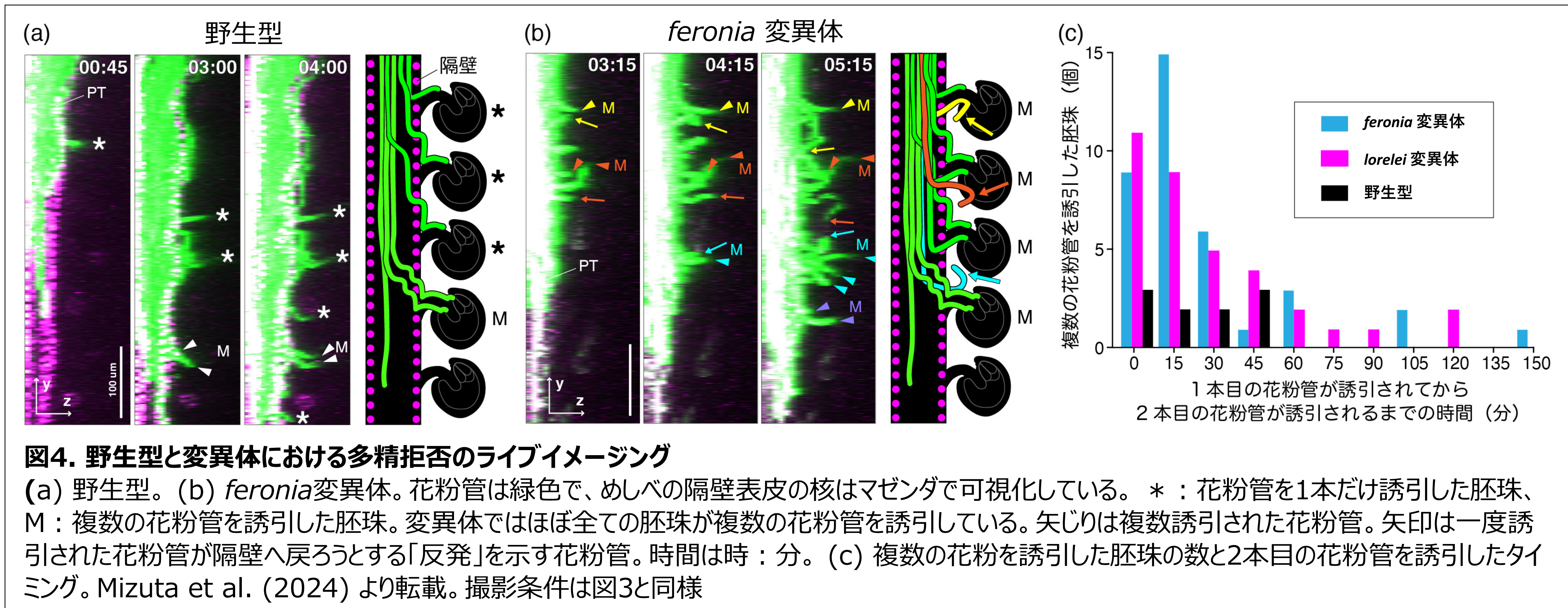
図2. Single-locule法の概要

- (a) めしべ中央の伝達組織内を伸長する花粉管を観察するため、片側の子房室をメスで取り除き、切断面を下にして培地を滴下したガラスボトムディッシュに置床した。乾燥と成長による湾曲を防ぐため、めしべはシリコンシートで作成したミニチャンバー内に設置している。
- (b) 設置後の様子。めしべを5本並べたものをガラス底面から観察。



めしべ深部観察法の確立と得られた知見

シロイヌナズナめしべの生体深部観察では980~1000 nmの超波長励起と橙色の蛍光タンパク質が適していることが明らかとなった。また、めしべの片側の子房室を取り除き、ガラスボトムディッシュ上に設置したシリコンチャンバー内に置床するSingle-locule法と名付けた方法（図2）を用いることで、花粉管誘引や多精拒否の瞬間を生体内で捉えることに成功した（図3）。花粉管の伸長速度は1.3 $\mu\text{m}/\text{min}$ であり、胚珠への誘引時にはめしべの伝達組織内で速度が減速することがわかった。変異体の解析から、この減速にはめしべの外珠皮と呼ばれる母体の体細胞組織由来の長距離シグナルが関与することが示唆された。また、多精拒否のタイミングは従来分かっていた時期よりも早く、1本目の花粉管が珠柄を登り始めた時点から働き、45分後にさらに強固になるという2段階の仕組みがあることがわかった。この2段階の多精拒否には母体組織の細胞膜に局在するレセプター様キナーゼのFERONIAと、胚珠の助細胞で発現するGPIアンカー型タンパク質のLORELEIが関わっていることがわかった（図4）。また、*feronia*変異体では一度誘引された花粉管が伸長方向を180°転換し、隔壁へと戻ろうとする「反発（repulsion）」と思われる新たな現象も観察された。



まとめ

本研究では、二光子顕微鏡を用いて、厚みがあり自家蛍光が強い植物組織内での花粉管誘導の動態とシグナル伝達を明らかにした。二光子顕微鏡ならではの特性により、細胞へのダメージを抑えつつ深部観察が可能となり、花粉管と胚珠の1対1の誘導過程を鮮明に捉えた。また、長作動距離の25倍水浸レンズは、組織の厚みやz軸方向の移動にも対応し、安定した深部観察を実現した。さらに、高感度GaAsP検出器は、深部からの微弱なシグナルも捉え、高精細な画像取得を可能にした。本研究は、二光子顕微鏡、長作動距離水浸レンズ、そして高感度検出器の組み合わせが、深部イメージングに極めて有効であることを示した。

参考文献

Mizuta Y, Sakakibara D, Nagahara S, Kaneshiro I, Nagae TT, Kurihara D, Higashiyama T. Deep imaging reveals dynamics and signaling in one-to-one pollen tube guidance. *EMBO Rep.* 2024 Jun;25(6):2529-2549. doi:10.1038/s44319-024-00151-4.

謝辞

本アプリケーションノートの作成にあたり、画像のご提供ならびに研究内容のご教示を賜りました名古屋大学トランスフォーメティブ生命分子研究所の水多陽子先生に深謝致します。

編集：株式会社ニコン 名川信吾

製品情報

高速多光子共焦点レーザー顕微鏡システム AX R MP

AX R MPのレゾナントスキャナーは、視野数22の広視野を維持したまま、超高速イメージングを実現。近接ディテクターユニット（NDD）は、対物レンズ近傍に配置しているため、微弱な蛍光シグナルも最大限に取得できます。高S/N比のマルチアルカリPMTと高感度GaAsP PMTを自由に選択して搭載できます。



製品情報は[こちら](#)

