



APPLICATION NOTE

研究用実体顕微鏡SMZ18
共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX RStefano Buratti^{1,2}, Alex Costa¹¹ Department of Biosciences, University of Milan² Fratelli Confalonieri Foundation

編集者：Anastasia Audrey, Nikon Europe B.V.、株式会社ニコン 名川信吾

植物における小胞体・細胞質カルシウム動態の同時蛍光イメージング

カルシウムイオン (Ca^{2+}) は細胞シグナリングにおいて中心的な役割を担っており、環境刺激や発生シグナルに応答して細胞質や小胞体 (ER) の Ca^{2+} 濃度が特異的に変動することが知られている。細胞質における Ca^{2+} ダイナミクスの制御におけるERの役割を解明するためには、生体内 (*in vivo*) で両コンパートメントの Ca^{2+} 動態を同時に解析することが不可欠である。本研究では、ニコンの2種類のイメージングシステムを活用し、組織・器官レベルと細胞レベルという異なる空間スケールにおける細胞質とERの同時 Ca^{2+} イメージングを実施した。

近年、ER-GCaMP6-210やR-GECO1といった遺伝子コード型蛍光 Ca^{2+} インジケーター (GECI) を用いることで、ERと細胞質の同時イメージングが可能となっている。本稿では、これらのインジケーターを共発現するシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 遺伝子組換え系統を用いて、葉への傷害処理や細胞外ATPなどの刺激に対する Ca^{2+} 応答を可視化した事例を紹介する。まず、蛍光実体顕微鏡SMZ18を用いて成体植物の葉の器官レベルのイメージングを行った。次いで、シリコン浸対物レンズを搭載した共焦点レーザー顕微鏡システムAX Rを用いて、根における細胞レベルの高解像度イメージングを行った。これらの実験を通じて、デュアル蛍光 Ca^{2+} インジケーター系統が、幅広い発生段階を対象としたERの Ca^{2+} シグナリング研究に極めて有用であることが示された。

キーワード：植物生物学、カルシウムイメージング、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、共焦点レーザー顕微鏡、実体顕微鏡

実体顕微鏡SMZ18を用いたロゼット葉における Ca^{2+} 応答の可視化

成体植物において異なる細胞内コンパートメントの Ca^{2+} シグナリングを同時に観察するため、ER-GCaMP6-210とR-GECO1を共発現する播種後4週目のシロイヌナズナを蛍光実体顕微鏡SMZ18を用いて撮像した (図1)。土壌で栽培した植物を、pE300-Ultra LED光源および標準的なGFP/RFPフィルターセットを用いて非侵襲的に観察した。本システム構成では、チャンネル間の迅速な切り替えと均一な広視野励起が可能であり、植物個体および器官レベルのイメージングに適している。

機械的刺激として、Resentini et al. (2021) のプロトコルに従い、ピンセットを用いてロゼット葉に傷害を与えた。傷害部位 (関心領域1: ROI1) および別の葉の非傷害部位 (関心領域2: ROI2) (図2. A) の両方において、両GECIからの蛍光シグナルを4秒間隔で取得し、定量解析を行った。その結果、刺激によって細胞質およびERの Ca^{2+} シグナルが上昇し、ロゼット葉全体に及ぶ大規模な Ca^{2+} シグナリングが可視化された (図2B)。蛍光シグナルはまず維管束組織において上昇し、葉身および葉柄を伝播して、最終的に遠位の葉へと到達した (図2, B-E)。これらの結果から、SMZ18を用いた本実験系が、植物個体レベルでの長距離シグナル伝達の観察に適していることが示された。さらに、ROI内の蛍光強度変化を定量解析した結果、ERの Ca^{2+} シグナルは細胞質の Ca^{2+} シグナルと比較して一貫して遅れて上昇し、その上昇状態がより長く持続することが明らかになった (図2. B, C)。

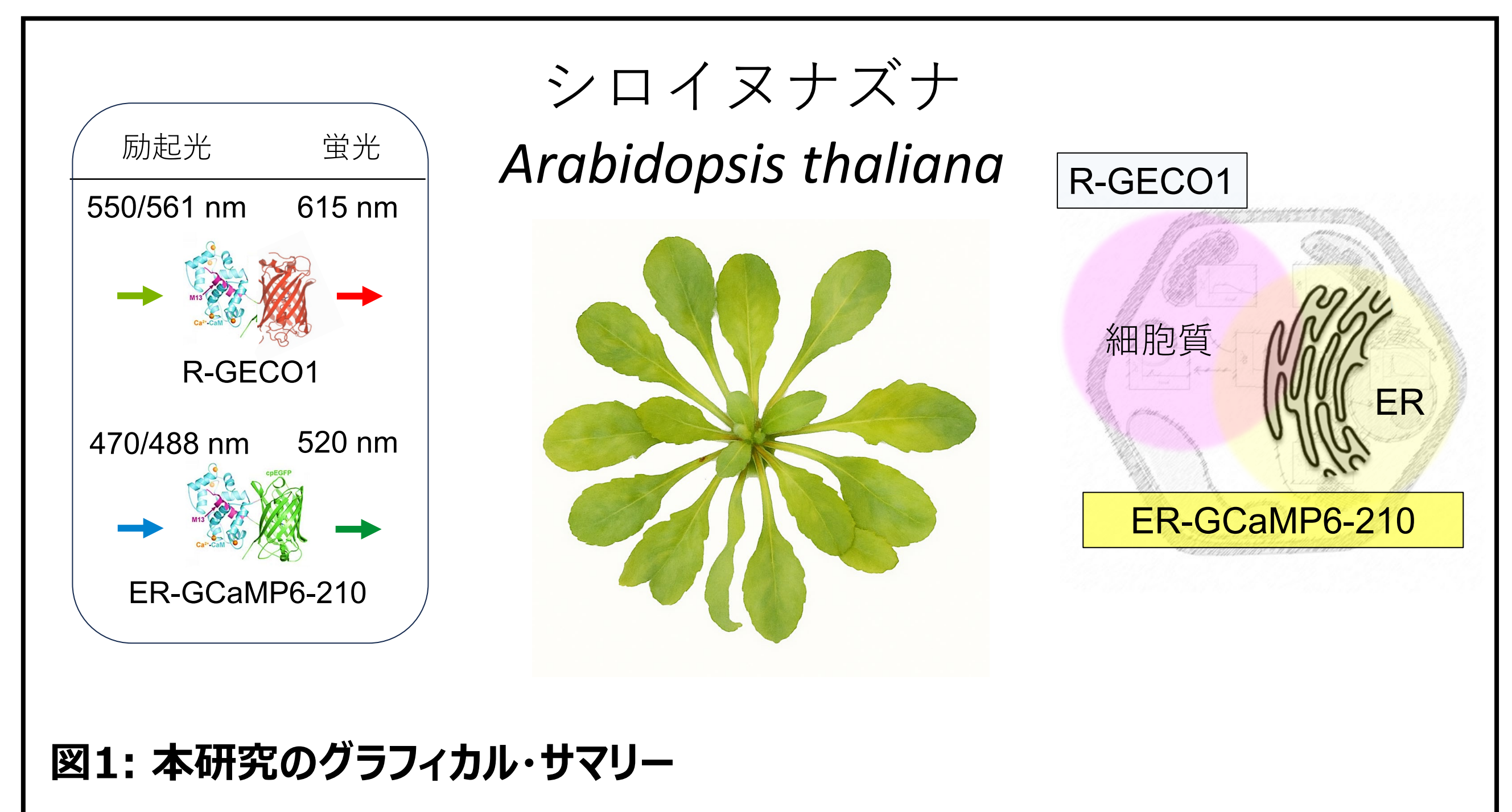


図1：本研究のグラフィカル・サマリー

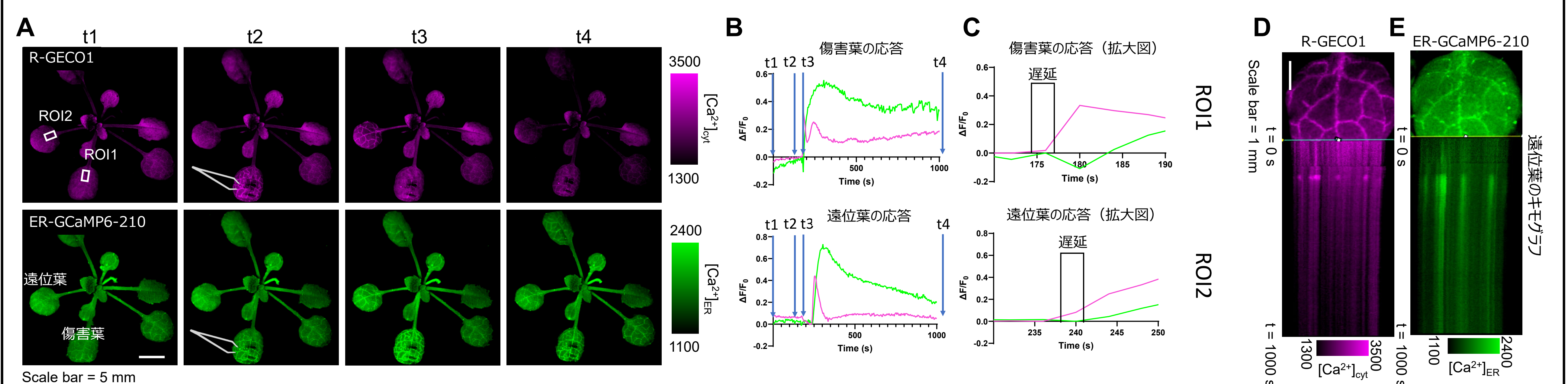
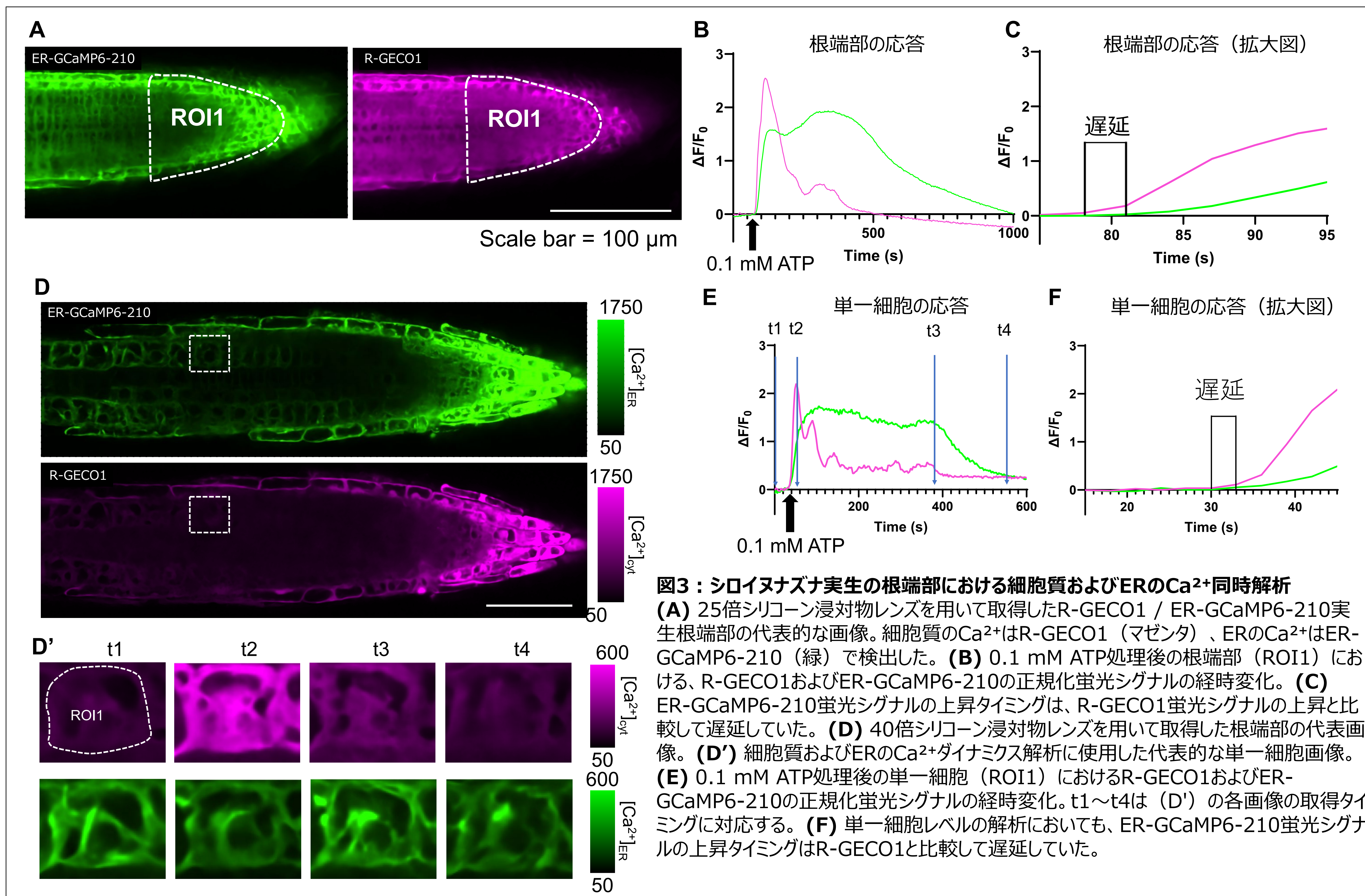


図2：傷害刺激を受けた成体シロイヌナズナ葉における細胞質およびERの Ca^{2+} シグナリング同時解析

(A) 局所的な葉の傷害処理後におけるR-GECO1 / ER-GCaMP6-210共発現植物体の代表画像。細胞質の Ca^{2+} はR-GECO1 (マゼンタ)、ERの Ca^{2+} はER-GCaMP6-210 (緑) で検出した。傷害部位をt2 画像上のピンセットのイラストで示す。(B) 傷害処理後の傷害葉 (ROI1、上段) および遠位葉 (ROI2、下段) におけるR-GECO1およびER-GCaMP6-210の正規化蛍光シグナルの経時変化。(A) に示す各画像は、t1、t2、t3、t4の各時点で取得した。(C) (B)の一部を拡大したグラフ。R-GECO1蛍光シグナルはER-GCaMP6-210蛍光シグナルに先んじて上昇した。(D) 遠位葉におけるR-GECO1蛍光シグナル (上段) の1,000秒間タイムラプス撮影データのキモグラフ (下段)。(E) 位葉におけるER-GCaMP6-210蛍光シグナル (上段) の1,000秒間タイムラプス撮影データのキモグラフ (下段)。

根の細胞における複数細胞内コンパートメントの高解像度 Ca^{2+} イメージング

蛍光実体顕微鏡を用いた観察により、器官全体にわたる Ca^{2+} 応答が可視化され、広範囲に及ぶシグナル伝達パターンに関する知見が得られた。続いて、これを補完する解析として、細胞質とERにおける Ca^{2+} 動態変化のタイミングを精密に明らかにするため、単一細胞レベルの高解像度 Ca^{2+} イメージングを行った。倒立顕微鏡Ti2-Eおよび共焦点レーザー顕微鏡AX Rを組み合わせたシステムを用いて、シロイヌナズナ実生の根端を観察した。AX Rに搭載された2基のGaAsP分光検出器を用いて、ER-GCaMP6-210とR-GECO1のシグナルを同時に取得し、逐次取得時に生じるタイムラグを排除した。 Ca^{2+} ダイナミクスの解析に十分な時間分解能を確保するため、画像は3秒間隔で取得した。既報のマイクロ流体送液システム (Resentini et al., 2021) を用いて0.1 mM ATPを3分間灌流することにより、細胞質の Ca^{2+} シグナルを誘導した。



まず25倍シリコン浸対物レンズを使用して、高いS/N比を保ちつつ光毒性を抑えた条件で根端部全体を可視化した（図3. A）。根端分裂領域の解析から、葉で観察された結果と同様に、ERのCa²⁺シグナルの上昇は細胞質Ca²⁺シグナルの上昇に遅れて生じ、ピーク到達タイミングの遅延およびピークからの減衰がより緩慢であることが確認された（図3. B、C）。さらに単一細胞レベルでの詳細な解析を行うため、40倍シリコン浸対物レンズとデジタルズームを併用し、より高精細な画像を取得した（図3. D、D'）。この条件では、高感度を維持したまま空間分解能が向上し、細胞内コンパートメント間のCa²⁺動態の精密な経時的計測が可能となった。2チャンネル同時イメージングにより細胞質におけるCa²⁺増加の開始と、ERへのCa²⁺取り込みのタイミングを厳密に捉えることに成功した（図3. E、F）。

これらの結果は、蛍光実体顕微鏡を用いた植物個体レベルの解析から、高速共焦点イメージングによる単一細胞内コンパートメントレベルの解析に至るまで、空間スケールを横断したCa²⁺動態の解明にニコンのイメージングシステムが強力に寄与することを示している。今回用いた実験手法は、生理学的条件下におけるERのCa²⁺蓄積機構やER局在型Ca²⁺トランスポーターの活性を*in vivo*で解析するための重要な基盤となりうる。実際に、葉緑体や細胞質といった他の細胞内コンパートメントへの応用可能性が、最新の研究成果（Kuang et al., 2025）として発表されている。

結論

本アプリケーションノートは、シロイヌナズナのデュアルセンサー系統の開発について報告した論文（Resentini et al., 2021）を基に作成された。本研究では、このデュアルセンサー系統をニコンの2つの相補的なイメージング装置を用いて観察した。器官全体の広視野観察には電動蛍光実体顕微鏡SMZ18を、高解像度かつ高速なデュアルチャンネルイメージングには共焦点レーザー顕微鏡AX Rを使用した。分光検出器を搭載したAX Rを用いることで検出波長域を精密に設定し、ER-GCaMP6-210とR-GECO1間の蛍光クロストークを最小限に抑えつつ、両チャンネルの完全な同時取得を実現した。さらに、今回使用した25倍および40倍のシリコン浸対物レンズは、生体環境の屈折率に適合しているため球面収差が低減され、深部においても高い画質を維持できる。そのため、実生の根細胞といった*in vivo*サンプルの高解像度イメージングに極めて適している。

参考文献

- Resentini, F., Grenzi, M., Ancora, D., Cademartori, M., Luoni, L., Franco, M., Bassi, A., Bonza, M. C., & Costa, A. (2021). Simultaneous imaging of ER and cytosolic Ca²⁺ dynamics reveals long-distance ER Ca²⁺ waves in plants. *PLANT PHYSIOLOGY*, 187(2), 603–617. Kuang
- D, Romand S, Zvereva AS, Orlando Marchesano BM, Grenzi M, Buratti S, Yang Q, Zheng K, Valadorou D, Mylle E, Benedikty Z, Trtílek M, Tenje M, Spetea C, Van Damme D, Wurzinger B, Schwarzländer M, Teige M, Costa A, Stael S. (2025). The burning glass effect of water droplets triggers a high light-induced calcium response in the chloroplast stroma. *Curr Biol*. 2025 Jun 9;35(11):2642-2658.e7.

製品情報

研究用実体顕微鏡SMZ18

優れた明るさと高解像度を両立した研究用実体顕微鏡。

- ズーム比18:1 を実現し、マクロからミクロまでシームレスな観察を可能にします。
- 色再現性に優れ、高解像力を実現した高性能対物レンズ「SHR プランアポクロマートシリーズ」を搭載。
- 光学系を改善し、S/N比に優れた蛍光像取得を実現。



製品情報は [こちら](#)



共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R

AXは、従来機比4倍の8K x 8K画素の高解像度画像を実現。対角25 mmの広視野でサンプルの広範囲を一度に取得でき、光毒性を低減します。AX Rのレゾナントスキャナーは、2K x 2K 高解像度を実現。毎秒720フレーム（2048 x 16画素）の高速取得により、生きたサンプルの動態も逃さずとらえます。



製品情報は [こちら](#)

