二次イオン質量分析法による同位体イメージング：樹脂切片を用いたラン共生プロトコーム細胞における生体元素輸送解析

久我 ゆかり

広島大学大学院総合科学研究科 ☎ 739-8521 広島県東広島市鏡山 1 丁目 7-1

(2016 年 7 月 17 日受付 ; 2016 年 9 月 6 日掲載決定)

Isotope Imaging of Secondary Ion Mass Spectrometry : Transport Analysis of Biological Elements Using Resin Sections of Symbiotic Orchid Protocorm Cells

Yukari KUGA

Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University, 1-7-1 Kagamiyama,
Higashihiroshima, Hiroshima 739-8521

(Received July 17, 2016 ; Accepted September 6, 2016)

The high sensitivity of secondary ion mass spectrometry (SIMS) allows isotope imaging and the high spatial precision has a potential for the localization of isotopes corresponding to the ultrastructure of cell components. This paper reviews a study in which transfers of carbon and nitrogen from the fungus in a symbiotic orchid protocorm were analyzed, combining an isotope tracer experiment, sample preparation for transmission electron microscopy, and SIMS cellular imaging. The results showed that, ^{13}C and ^{15}N transferred from young and senescent hyphae, and in the plant cells, they were localized differently in individual cells and organelles, depending on the colonization status (the presence or absence of fungal structures and the early or late developmental stage of the fungal structure). Stable isotope imaging at the cellular level provides new insights into cellular functions of the endosymbiosis.

KEYWORDS : orchid symbiosis, stable isotopes, C and N transport, secondary ion mass spectrometry, subcellular imaging

1. は じ め に

生体は酸素 (O), 水素 (H), 炭素 (C), 窒素 (N), リン (P), 硫黄 (S), カルシウム (Ca), カリウム (K), マグネシウム (Mg) などから構成される。生物圏では、これらが無機質あるいは有機的な物質として生物と環境、あるいは生物間で循環している。1879 年, Anton de Bary は異なる生物が同所に存在する現象を“Symbiosis (共生)”と定義した¹⁾。原意の共生は相利共生 (二者の利益 : +, +) ~ 寄生 (+, -) まで, 二者間に存在するすべての関係性を意味するが, これらは生物間に存在する, 直接的あるいは間接的にでも, なんらかの栄養交換あるいは獲得の戦略と考えることができ

る。生体は, 組織, 細胞, 細胞小器官, そして共生組織など区画化し, 細胞膜で制御することで機能していることから, 元素を構造・位置情報として検出することは重要である。

生体元素・化合物の細胞小器官レベル (nm~ μm) のイメージング法としては, 高空間分解能を有する電子線を用いた特性 X 線分光²⁾・電子エネルギー損失分光²⁾・オートラジオグラフ³⁾, X 線励起による蛍光 X 線分光⁴⁾, 様々な検出系と組み合わせた分子特異的染色⁵⁾などがある。生体試料は主に軽元素からなり, かつ低濃度, 多種元素が共存するなどの特徴から, 検出条件が限られる場合が多い。また, 主要生体元素の移動・輸送は, トランスポーターなど移動を制御する膜タンパク質の遺伝子やその発現⁶⁾など間接的なアプローチか, 放射性同位元素を用いた組織・個体レベルでのトレース⁷⁾等

の方法が用いられてきた。近年、同位体を検出できる二次イオン質量分析法 (SIMS) の高分解能イメージング機能を用い、安定同位体でラベルした生体分子をトレーサーとしてその局在を細胞レベルで解析することにより元素そのものの動きを研究する手法が注目されている^{8,9)}。

陸上植物は真菌類と共生器官である菌根を形成し、植物側は菌 (菌根菌) を通じて土壤環境からの元素の獲得を効率化し、一方菌根菌は植物が固定した CO₂ 由来の炭素化合物を他の土壤微生物と競争することなく直接受け取る利益を得ている¹⁰⁾。菌根菌の一部は根外の土壤に伸長しているため、安定同位体化合物を溶液として菌糸のみに、また ¹³C を二酸化炭素として植物のみにラベルすることができ、二者間での輸送の研究材料として適している。一方、受け渡しを細胞レベルで明らかにするためには、共生領域、植物と菌糸、菌糸構造の形成と衰退過程を識別する必要がある、解剖学的手法は必須である。

本稿では、菌根と相同の構造を形成し、共生菌に C を含む全栄養を依存しているラン科植物のプロトコーム (未分化の胚からなる種子が発芽後、葉・根を発達させるまでの生長期) を用い、C および N 輸送を安定同位体の局在を用いて解析した研究¹¹⁾ について紹介する。

2. SIMS イメージング法と樹脂包埋法

SIMS は一次イオンビームを固体表面に照射し、叩き出された二次イオンを質量分析計で質量電荷比 (M/z) により分離し、計測する分析法である。分析法の詳細は成書^{12,13)} に詳しいが、高い質量分解能により同位体の同定とその濃度情報を得ることができる。SIMS によるイメージングには、細い一次イオンビームを走査し、点として取得した二次イオン情報を二次元化する方法 (走査型) と、大きな一次イオンビームをあて、面から出た二次イオンを結像する方法 (投影型) がある。空間分解能は前者は一次イオンのプローブ径、後者は二次イオン光学系の収差に依存し、それぞれ約 50 nm、および 100 nm が期待できる。SIMS では試料表面の形状はスパッ

タリングによる二次イオンの引き出し効率などに大きく影響する。試料の平坦性はイメージングでは重要で、走査モードで高空間分解能の画像を取得する nanoSIMS50 (CAMECA 社製) では試料とレンズの間の距離が数百 μm と小さく、また試料の形状・サイズに制約が少ない IMS1270 (投影モード, solid state ion imager (SCAPS) 装備, CAMECA 社製) においても画像に大きく影響する。生物組織は体積のほとんどが水で占められているため、超高真空保持を必要とする SIMS で分析するためには脱水処理が必要となる。同様に真空系を用いる透過型電子顕微鏡法 (transmission electron microscopy: TEM) では、生物試料は微細構造の維持を目的とした固定、脱水、樹脂置換・包埋後重合し、切片で観察する。このように処理された生物試料は SIMS 試料としても適している。さらに樹脂包埋試料は、連続切片 (あるいは同じ切片) を用いることでほぼ同一の組織領域で微細構造、染色、元素分析等の異なる情報を得ることができる。このように分析方法や機器、試料作製法により生じる空間分解能の制約を微細構造情報により補完できることは化学情報を細胞学的に理解するために大きな利点である。

一方、試料作製の各プロセスで単独あるいは複合的に起こり得るアーティファクトには注意を要し、目的の構造や物質に対して最も影響のない、あるいは少ない方法を選択する必要がある。一般的に用いられる固定法と脱水法を Table 1 に示す。急速凍結法は、氷晶の形成を抑えつつ凍結させることを目的とし、液化プロパンに試料を素早く浸漬する方法 (急速凍結法)²⁾ や試料に 2000 気圧以上を加えミリセカンドで凍結させる方法 (加圧凍結法)^{14,15)} などがある。前者の装置は比較的安価で自作も可能であるが、後者は専用の装置を必要とする。急速凍結法は化学固定に比べて形態・化学性の保存性が優れる一方、試料サイズを小さくする必要があり、組織の場合は切断が必要となる (方法・装置によって異なるが目安として 1 mm³ 以下)。したがって、凍結法では前処理の間に起こりうる細胞の変化を最小にしたいうえで氷晶形成のない凍結を達成することが重要であり、またその後の凍結置換による脱水の間に脂質が溶出するなど注意点が

Table 1. Comparisons of sample preparation methods for transmission electron microscopy.

	Chemical fixation method	Freezing method	
Fixation	Aldehyde fixation (e.g. 2.5% glutaraldehyde-2% paraformaldehyde) ± 1~2% OsO ₄	Rapid freezing (e.g. Plunge into liquid propane at melting point)	High pressure freezing
Dehydration	Ethanol series(e.g. minutes to hours within 50, 70, 80, 90, 95, 100% ethanol)	Freeze substitution(in acetone ± 1~2% OsO ₄ ; several days at -80°C followed by gradual elevation to room temperature)	

ある。

オスミウム酸 (OsO_4) は、化学固定ではアルデヒドとの二重固定、凍結法では凍結置換の溶媒に加えて用いられる。脂質の固定に優れ、生体膜と結合する電子染色効果があるため、 OsO_4 処理により軽元素主体の生体試料のコントラストが著しく改善される。一方、強力な固定剤であるとともに長時間の処理で細胞質成分等を溶出すること¹⁶⁾、また重金属であることなどから、切片を用いた酵素活性、物質の染色 (免疫、蛍光等)、X線分析などを行う場合は注意を要する。たとえば、組織内のPの検出を行う場合、電子線励起によるエネルギー分散型X線分析 (EDS) ではピークが重なるためOsを加えることができないが (P, $K\alpha$ 2.013 keV; Os, $M\alpha$ 1.914 keV)、電子エネルギー損失分光法 (EELS) ではOsは影響をあたえず加えることができるため、高コントラスト情報と同時に元素分布を得ることができる²⁾。その他 OsO_4 は、置換の過程で重合が始まる樹脂があるなど重篤な影響がある場合がある。

エネルギー源としてのCを、植物は主にアミロプラスト中のデンプン、真菌類は脂質 (脂肪) およびグリコーゲンの形で貯蔵する。本研究では共生真菌を介したCおよびNの輸送解析を目的とするため、脂質の保存を考慮し、化学固定 (二重固定) を用いた。

3. 材料および方法

3.1 同位体トレーサー実験および試料作製

ネジバナ (*Spiranthes sinensis*) 種子を次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌し、0.3% エンバク培地 (OA) に播種し、これに *Ceratobasidium* sp. (菌糸融合群 I) を接種した。共生発芽したプロトコームをスパーサーで2段に分けた寒天片の上部に移植し、湿室で培養した。プロトコームから伸びた下部の培地上の菌糸に、54 mM ^{13}C -グルコース ($\text{U-}^{13}\text{C}6$, 99%; Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, MA, USA) および 24 mM ^{15}N -硝酸アンモニウム (98%; Cambridge Isotope Laboratories Inc.) の混合液を添加した。20 時間培養後、共生プロトコームを 2.5% グルタルアルデヒド-2% パラフォルムアルデヒドで前固定、次いで 1% OsO_4 で後固定し、定法に従いエタノール系列で脱水し、プロピレンオキシドに置換後、エポキシ樹脂 (Embed-it) に包埋・重合した。

3.2 同位体比画像および画像解析

樹脂包埋試料の準超薄切片をトリパンブルー染色し、構造情報を取得し (Fig. 1 (a)), 連続する切片を IMS-1270 (Fig. 1, 後出の Fig. 4) あるいは nanoSIMS50 (後出の Fig. 3) による分析に用いた。前者では 7 mm 角のシリコンウエハ上に接着した 1 μm 厚の切片に金蒸着

し、後者では同様の 300 μm 厚の切片をそのまま、あるいはカーボン蒸着し、目的の細胞位置で ^{12}C (Fig. 3 (b)), ^{13}C (Fig. 3 (c)), $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ (Fig. 1 (b), (e); Fig. 3 (a), (f); Fig. 4 (a)), $^{12}\text{C}^{15}\text{N}$ (Fig. 3 (g)) などの同位体画像を取得した。次いで、画像解析ソフト「ImageJ」による画像演算により同位体比画像 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (Fig. 1 (c), (f); Fig. 3 (d); Fig. 4 (a)) あるいは $^{12}\text{C}^{15}\text{N}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ (Fig. 1 (d), (g); Fig. 3 (h)) を作成した。その際、画像間における位置ずれの有無を確認し、適宜修正を行った。

画像解析は、 $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ 画像を用い、植物の構造 (細胞質、核、核小体、液胞、細胞壁、アミロプラスト) および共生菌の構造 (細胞質、液胞、崩壊した菌叢) の縁を多角形ツールで選択した (Region of interest, ROI; Fig. 1 (h))。これら ROI セットを対応する同位体比画像に適用し、各構造の同位体比 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ および $^{12}\text{C}^{15}\text{N}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$) を抽出した。元素輸送解析は、プロトコームを非感染領域を二つ (分裂組織および柔組織) と感染領域を三つ (前部、中部、および後部) の計五つのエリアに分け (Fig. 1 (a)), さらに感染領域の細胞を内包する菌糸構造により三つのカテゴリー (若い菌叢、崩壊期の菌叢、菌叢残さのみ) に分け、細胞単位で各構造の同位体比の分析を行った (Fig. 1 (i), (j))。

4. C および N の共生菌からプロトコームへの輸送

ラン科植物の菌根および共生プロトコームでは、菌糸は宿主の細胞の中に侵入し、コイル状の菌叢と呼ばれる構造を形成する (Fig. 2 の「H」は菌叢の菌糸の断面)。菌叢は生長後、崩壊して残さ (Fig. 2 「DP」) となるが、この菌叢形成-崩壊のプロセスは細胞ごとに非同調的に繰り返し起きる。なお、菌叢の菌糸および菌糸塊はすべてのプロセスで宿主の細胞膜由来の膜に覆われ、厳密には細胞の外にある (Fig. 2)。

本研究では、非感染領域 (分裂組織と柔組織) の同位体比は、 $r13\text{C}$ および $r15\text{N}$ とともに感染領域より高く、菌糸から渡された C および N は迅速に生長点に輸送されることが明らかになった (Fig. 1 (b)-(j))。19 世紀末に Bernard によりラン科植物の種子が共生発芽することが記載されて以来¹⁷⁾、菌から宿主への養分供給が菌叢の生長期にあるのか崩壊期にあるのか議論されてきた。この仮説を検証するため、プロトコームの領域を感染/非感染に分け、後者を非感染領域に接する側から前部、中部、後部領域、さらに宿主細胞を、菌叢無し、菌叢形成期、崩壊期、菌糸塊の計四つのタイプにわけ、各細胞構造の同位体比を解析した。その結果以下の四つの結果を

Fig. 1. (color online). Carbon and nitrogen transfer in a symbiotic orchid protocorm (*Spiranthes sinensis*—*Ceratobasidium* sp.; isolate DN8442). ^{13}C -glucose and $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ were added to hyphae extending from the protocorm (extraradical hyphae) and the protocorm was fixed after 20 h incubation. (a) Toluidine blue O staining of a semi-thin section showing meristem (Me) and adjacent parenchyma (UC) regions, and colonized forefront (F), middle (M) and basal (B) regions. Reproduced, with permission from Ref. 11. Bar, 100 μm . (b) - (d) Stable isotope images taken by IMS1270 + SCAPS. (b) - (d) Colonized cells, corresponding to area α of (a). Bar, 20 μm . (e) - (g) Uncolonized cells of area β of (a). Bar, 20 μm . (b), (e), & (h). $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$. (c) & (f). $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Natural abundance of ^{13}C is 1.07%. Color bar, 1%-4%. (d) & (g). $^{12}\text{C}^{15}\text{N}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$. Natural abundance of ^{15}N is 0.368%. Color bar, 0%-8%. (h) - (j). Region of interest analysis of (e). (h) Area sections. (i) & (j). Isotope ratios (%) of host structures. Ap, amyloplast; B, Cy, cytoplasm; DP, degenerated peloton; N, nucleus; Nol, nucleoli; SH, senescent hyphae; V, vacuole; YH, young hyphae.

Fig. 2. Ultrastructure of a colonized cell of an orchid symbiotic protocorm (*Spiranthes sinensis*—*Ceratobasidium* sp.; isolate DN8442). Ap, amyloplast; DP, degenerated peloton; ER, endoplasmic reticulum; H, fungal hyphae; M, mitochondrion; N, nucleus; Nol, nucleolus; V, vacuole. Bar, 10 μ m. Reproduced, with permission from Ref. 15.

得た：1) 菌糸に近接するアミロプラストの同位体比の上昇, 2) 三つの各感染領域の宿主の細胞質の同位体比：非感染<菌糸有（形成期）<（崩壊期）, 3) 若い菌糸を含む宿主細胞の細胞質と菌糸の同位体比の間に正の相関, 4) 菌糸の同位体比：形成期<崩壊期。これらのことから、菌糸形成期（1~3）および崩壊期（2および4）のいずれから宿主への輸送があるが、元素分析による菌糸のN量の結果（形成期<崩壊期）も併せ、輸送量は崩壊期が重要であると結論付けられた。

宿主の構造では、細胞壁周囲の同位体比が非感染細胞で高くなるが、感染細胞（形成期および崩壊期）では上昇せず、菌糸の存在が宿主細胞の輸送にかかわる代謝を変えることが示唆された。また、 ^{13}C はアミロプラスト、次いで核小体、 ^{15}N は核小体に最も集積した（Fig. 3）。その際、核小体のN濃度は核内のその他の部分より高い（Fig. 3（f））が、 ^{15}N の上昇率により二つのタイプに分かれることが示された。その他、菌糸残さの周囲で ^{13}C のみが上昇したこと（Fig. 1（c））、菌から宿主に渡されたCとNの輸送経路が異なる、あるいはこれらが化合物を形成せずに輸送される現象が観察された。

Fig. 3. (color online). Stable isotope imaging of uncolonized meristematic cell of a symbiotic orchid protocorm (*Spiranthes sinensis*—*Ceratobasidium* sp.; isolate DN8442) taken by nanoSIMS50. ^{13}C -glucose and $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ were added to hyphae extending from the protocorm (extraradical hyphae) and the protocorm was fixed after 42 h incubation. (a) $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$. Bar, 10 μ m. (b) - (h) A part of nucleus of (a). Bar, 3 μ m. (b) ^{12}C . Black areas of (b) indicates insufficient resin infiltration. (c) ^{13}C . (d) $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. ^{13}C accumulates in amyloplasts and nucleoli. Natural abundance of ^{13}C is 1.07%. Gray bar, 1%-4%. (e) ^{32}S . (f) $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$. (g) $^{12}\text{C}^{15}\text{N}$. (h) $^{12}\text{C}^{15}\text{N}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$. ^{15}N accumulates strongly in nucleoli and moderately all over nucleus. The lower ratio areas (arrow) in nucleus are rich in N. Natural abundance of ^{15}N is 0.368%. Gray bar, 0%-8%. Ap, amyloplast; N, nucleus; Nol, nucleoli.

Fig. 4. (color online). Carbon transfer in a symbiotic orchid protocorm (*Spiranthes sinensis*—*Ceratobasidium* sp.; isolate DN8442). ^{13}C -glucose was added to hyphae extending from the protocorm (extraradical hyphae) and the protocorm was fixed after four-day incubation. (a) $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$. (b) $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Natural abundance of ^{13}C is 1.07%. Color bar, 1%-4%. (c) Ultrastructure of an area of (a) (a dotted square, a serial ultra-thin section). Amorphous materials (arrows) of a degenerated peloton show high elevations of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. CW, cell wall; DP, degenerated peloton. Bars, 5 μm .

5. ま と め

安定同位体トレーサー実験-樹脂切片-SIMS イメージングにより、抽出や細胞分画法では得ることのできない新規の細胞機能が示された。本手法は連続切片を用いた超微細構造観察と同位体比画像 (Fig. 4), あるいは一つの超薄切片で微細構造観察と同位体画像を取得することも可能であり、オルガネラ、膜レベルの解析を行うことが可能である。さらに、SIMS は生体元素を含むほぼすべての元素の検出が可能であることから、元素ラベルしたプローブを用いることにより、元素のトレースと微生物同定を同時に行うことが可能である¹⁸⁾。SIMS イメージング法は細胞・生物・生物圏機能の解析に有力な手法の一つとなると考えられる。

謝 辞

本研究は、塚本尚義博士、坂本直哉博士 (北海道大学) との共同研究、および Dr. François Hillion (Cameca, France) の協力を得て行った。本研究は JSPS 科研費 22380045 により行った。

文 献

- 1) S. Paracer and V. Ahmadian : "Symbiosis : An introduction to biological associations, 2nd ed." (Oxford University Press, New York, New York, 2000).
- 2) Y. Kuga, K. Saito, K. Nayuki, R.L. Peterson and M. Saito : *New Phytol.* **178**, 189 (2008).
- 3) G. Natale, P. Lenzi, G. Lazzeri, A. Falleni, F. Biagioni, L. Ryskalin and F. Fornai : *Frontiers in Cellular Neuroscience* **9**, 434 (2015). 10.3389/fncel. 2015.00434.
- 4) K. Nayuki, B. Chen, R. Ohtomo and Y. Kuga : *Microbes Environ.* **29**, 60 (2014).
- 5) K. Saito, R. Ohtomo, Y. Kuga-Uetake, T. Aono and M. Saito : *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5692 (2005).
- 6) L.-Q. Chen, X.-Q. Qu, B.-H. Hou, D. Sossio, S. Osorio, A.R. Fernie and W.B. Frommer : *Science* **335**, 207 (2012).
- 7) M.R. Thorpe, A.P. Ferrieri, M.M. Herth and R.A. Ferrieri : *Planta* **226**, 541 (2007).
- 8) C.P. Lechene, Y. Luyten, G. McMahon and D.L. Distel : *Science* **317**, 1563 (2007).
- 9) D.-S. Zhang, V. Piazza, B.J. Perrin, A.K. Rzedzinska, J.C. Poczatek, MeiWang, H.M. Prosser, J.M. Ervasti, D.P. Corey and C.P. Lechene : *Nature* **481**, 520 (2012).
- 10) S.E. Smith and D.J. Read : "Mycorrhizal symbiosis, 3rd edition" (Academic Press, Great Britain, 2008).
- 11) Y. Kuga, N. Sakamoto and H. Yurimoto : *New Phytol.* **202**, 594 (2014). 10.1111/nph. 12700.
- 12) 日本表面科学会 : "二次イオン質量分析法" (丸善株式会社, 1999).
- 13) 塚本尚義 : *顕微鏡* **41**, 134 (2006).
- 14) K. Saito, Y. Kuga-Uetake, M. Saito and R.L. Peterson : *Can. J. Bot.* **52**, 643 (2006).
- 15) 久我ゆかり : *顕微鏡* **51**, 17 (2016).
- 16) K. Tanaka and H. Fukudome : *J. Electron Microsc. Tech.* **17**, 15 (1991).
- 17) M.-A. Selosse, B. Boullard and D. Richardson : *Symbiosis* **54**, 61 (2011).
- 18) 久我ゆかり : "難培養微生物研究の最新技術Ⅲ—微生物の生き様に迫り課題解決へ—"大熊盛也, 野田悟子監修 (シーエムシー出版, 2015) p. 61.