2光子顕微鏡による植物深部の *in vivo* イメージング

水多陽子^{1,2}, 栗原大輔^{1,2}, 東山哲也^{1,2,3}

¹ 名古屋大学大学院理学研究科 〒464-8602 愛知県名古屋市千種区不老町

² JST・ERATO 東山ライブホロニクス 〒464-8602 愛知県名古屋市千種区不老町名古屋大学理学部

³ 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 〒464-8602 愛知県名古屋市千種区不老町

要旨：生命現象を生きている状態、かつ生体内で観察することは極めて重要である。近年、生命科学の分野では、様々な蛍光プローブを用いたイメージング技術の発展や、撮像機器の開発により、細胞や組織内外における分子のリアルタイムな挙動が次々と明らかになってきた。2光子励起顕微鏡は深部到達性、低浸襲性といった、生体深部のイメージングに適した特性を持つ顕微鏡である。我々は植物の深部で起こる生命現象を「生きたまま」解析するため、2光子顕微鏡を用いて植物組織の深部イメージングに挑戦してきた。本稿では、最新の2光子励起顕微鏡を用いた植物深部の *in vivo* イメージングについて、その特徴と利点を簡単に紹介したい。

In vivo live-cell imaging in plant tissues by two-photon excitation microscopy

Yoko Mizuta^{1,2}, Daisuke Kurihara^{1,2}, Tetsuya Higashiyama^{1,2,3}

¹ Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8602, Japan

² JST, ERATO, Higashiyama Live-Holonics Project, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8602, Japan

³ Institute of Transformative Bio-Molecules (WPI-ITbM), Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8602, Japan

Author for correspondence: Y. Mizuta, mizuta.yoko@f.mbox.nagoya-u.ac.jp

Summary: *In vivo* live-cell imaging is an essential for understanding biological phenomena. In biological science, recent advances in imaging techniques using various fluorescence probes revealed dynamic cellular/extracellular events as they occur in real time at subcellular level. Two-photon excitation microscopy provides non-invasive tool for deep imaging in living organisms. We have been trying to deep imaging in plant tissues, using two-photon excitation microscopy to study the biological phenomena *in vivo*. In this review article, we summarize the characters of two-photon microscopy and advantages for deep imaging of plant tissues *in vivo*.

Key words: Two-photon excitation microscopy, *In vivo* imaging, Autofluorescence, Fluorescent protein, Wavelength, *Arabidopsis thaliana*

はじめに

生命現象を理解する上で、目的とする分子や組織を「生きたまま」、「*in vivo*」で捉えることは、きわめて重要である。近年、生命科学の分野では、標的とするタンパク質やRNAなど、生体内の細胞・組織・個体における局在や挙動を可視化し、その動態を画像として解析するイメージング技術が目覚ましく発展してきた。特に注目されている手法のひとつが種々の蛍光タンパク質を利用したバイオイメージングである。顕微鏡分野における高解像度の光学系や、画像解析など、手法の技術革新も著しい。様々な新しい光学顕微鏡のうち、多光子(2光子)励起顕微鏡は、生体組織試料を低侵襲、かつ低光毒性な条件下で長時間観察可能なことから、生体内で解析をおこなう重要なツールとして注目されている(Helmchen and Denk 2005, Benninger and Piston 2013)。特に、免疫学や神経科学など医薬学分野において広く浸透し、その重要性が指摘されている(Miller et al. 2002, Stosiek et al. 2003)。しかし一方で、植物分野における2光子顕微鏡の応用は、いまだ広く普及するには至っていない。その原因として、(1) 機器自体が高価かつデリケートであること (2) 葉緑体や細胞壁など、観察を妨げる植物特有の構造があること (3) 植物での報告例が少なく応用範囲が不明であること、などが上げられる。

本稿では、この2光子顕微鏡について、その特徴と植物における観察例、および今後の可能性について簡単に紹介したい。

1光子励起と2光子励起の違い

生体内の分子の局在やリアルタイムな挙動、そしてその機能を明らかにするためには、それらの分子を何らかの方法で可視化する必要がある。バイオイメージングを可能にする方法のひとつとして、分子を多種多様な蛍光プローブで標識する方法がある。GFPに代表される蛍光タンパク質は、発色が基質を必要としないこと、単体で機能すること、標的タンパク質と融合し局在解析が可能、などの特徴から、細胞内で発現方法が確立され、1990年代から蛍光プローブとして広く普及してきた。また、種々の蛍光プローブを生きた状態で観察するために、様々な蛍光顕微鏡も開発され発展を遂げてきた。革新が目覚ましい蛍光顕微鏡の例として、共焦点レーザースキャン顕微鏡や多光子励起顕微鏡があげられる。共焦点レーザースキャン顕微鏡は、点光源から出たレーザービームを試料に照射し、ピンホールを用いて焦点面以外の蛍光を排除することで、空間的に解像度の高いイメージングをおこなう顕微鏡である。しかし、図1Aの左の図に示すように、励起が焦点面以外でも起こっているため、試料全体に与える褪

色や光毒性の影響が大きいことが知られている。このことは、蛍光分子数の少ない試料を観察する際や、褪色が著しい蛍光プローブを用いる場合、そして生きた試料を長時間撮影するような場合には大きな問題となってくる。また、Z軸方向への解像度は数十 μm 程度と、組織深部になるにつれシグナル強度、解像度ともに急激に劣化するため、深部の観察には向いていない。

一方、2光子励起顕微鏡とは、多光子励起過程を利用した蛍光顕微鏡のことである(Helmchen and Denk 2005, Benninger and Piston 2013)。通常、1光子励起過程では、ひとつの蛍光分子はひとつの光子を吸収することで励起状態となる(図1A左)。この励起状態からエネルギーの低い安定な基底状態へと遷移する際に、エネルギーが蛍光として放出される現象を利用して蛍光の観察をおこなっている。それに対し、多光子励起過程とは、ひとつの蛍光分子がふたつ以上の光子を同時に吸収することで励起状態となる非線形光学過程である(図1A右)。しかし、実際に自然界でひとつの分子にふたつ以上の光子が同時に吸収される確率は非常に稀である。このため、この現象を利用するためには、光子密度を極端に上げてやり、多光子励起が起こる状況を人工的に作らねばならない。2光子励起顕微鏡にフェムト秒パルスレーザーと呼ばれる超短光パルスを発振する光源を利用するのはこのためである。フェムト秒パルスレーザーでは、フェムト秒(1000兆分の1秒)という非常に短い時間幅に高強度の光を集中させることができる。発振されたレーザーをレンズにより集光することで、複数の光子を1フェムトリットルという非常に狭い空間へ集光し、2光子励起を可能としている。図1A左に示すように、2光子顕微鏡ではこの非常に狭い空間、つまり焦点面でのみ励起が起こるため、1光子励起に比べて焦点面以外の褪色や光毒性が少ないといった特徴を持つ(低浸襲性)。また、二光子励起過程では、1光子励起の半分のエネルギー、つまり2倍の波長の2つの光子が同時に分子に吸収されることで、1光子励起と同じ波長の蛍光を発生する。単純な例をあげると、400 nmの1光子で励起した場合、2光子では800 nmで励起することになる(図1A右)。このように、2光子励起で近赤外光を用いることから、試料内部での散乱の影響を受けにくく、深部の観察が可能になるというメリット

もある(深部到達性)。低浸襲性、そして深部到達性といったこれらの特性から、2光子顕微鏡は試料にダメージを与えずに、生体深部を観察するのに適している顕微鏡であるといえる(Centonze and White 1998, Helmchen and Denk 2005)。筆者らの研究室では植物の深部イメージングをおこなうにあたり、共焦点と2光子の両方の観察が可能なNikon社の高速多光子共焦点レーザー顕微鏡システムA1R MPを使用している(図1B)。フェムト秒パルスレーザーはSpectra-Physics社のMai Tai HP DeepSeeを搭載しており、多光子励起時には690-1040 nmと広帯域な波長で観察が可能となっている。また、検出器としてはNDD (Non-Descanned Detector) 型PMTのGaAsP、および蛍光波長の解析が可能なスペクトルディテクタを搭載している。

自家蛍光と励起波長

植物組織は様々な内在性化合物を含み、蛍光タンパク質の可視化に際してそれらの自家蛍光が観察の妨げとなることがある(Müller et al. 2013)。自家蛍光を示す代表的な内在性化合物の例として、葉緑体に含まれるクロロフィルや、細胞壁に含まれるリグニンなどがあげられる。シロイヌナズナにおいては、葉に含まれるクロロフィルIIはピークを670 nmに持ち、650-770 nmの波長域に赤色光として観察される強い自家蛍光を示すことが知られている(Chapman et al. 2005, Müller et al. 2013)。このことは、葉緑体を含む組織において葉緑体と類似したスペクトルを示す赤色蛍光タンパク質を用いた場合、そのシグナルが自家蛍光に埋もれて観察が困難になることを意味している。一方、リグニンの場合は、488 nmで励起した場合には540 nmにピークを持つ黄緑色の自家蛍光を発することがわかっている(Chapman et al. 2005)。リグニンは高等植物の主要な細胞壁成分であり、シロイヌナズナの各細胞壁に数多く蓄積されている。つまり、このことは540 nm付近にピークを持つGFPなどの蛍光タンパク質をシロイヌナズナで発現させ、488 nmで励起した場合、シグナルが弱い場合は自家蛍光に埋もれて観察が困難になることを意味している。これらの自家蛍光は、葉や茎など葉緑体を含み、かつ厚い細胞壁で囲まれている組織を観察する際は非常にやっかいな相手である。一方、根のように葉緑体を含

図1 2光子励起の原理と本実験で用いた2光子励起顕微鏡。(A) 1光子励起と2光子励起の原理。(B) Nikonの高速多光子共焦点レーザー顕微鏡システムA1R MPとフェムト秒チタンサファイアレーザー Mai Tai HP DeepSee。観察は暗所でおこなうため、暗幕を掛けるための枠を顕微鏡本体上部に設置している。

まない組織を観察する場合は、長波長励起を用いる赤色蛍光タンパク質を用いることで、細胞壁の自家蛍光を軽減することができる。しかし、mRFPやmCherryなどに代表される赤色蛍光タンパク質は、一般に量子効率が低いことが知られているため、蛍光分子数の少ない試料を観察する場合は注意が必要である (Drobizhev et al. 2011)。このように、植物における様々な自家蛍光は、蛍光タンパク質の微弱なシグナルを観察する際や、組織内で定量解析をおこなう際には、常に念頭に置かなければならない。

一方、2光子励起では長波長を用いるため、事情が少々異なる。図2はシロイヌナズナの核に局在するsGFPを、葉の表皮細胞で観察したものである。観察には2光子励起顕微鏡を用い、それぞれ900 nm、および990 nmの励起光で519-549 nmの蛍光波長を観察したものである。900 nmよりもより長波長である990 nmの方が細胞壁や細胞内の内容物の自家蛍光を抑え、核に局在するsGFPのシグナルをよりはっきりと検出できることがわかる。このことは、自家蛍光が観察されるような植物組織でsGFPなどの短波長の蛍光タンパク質を用いる場合でも、より長波長で2光子励起をおこなうことで、深部イメージングが可能となることを示唆している。また、長波長の近赤外光では、葉緑体の光定位運動と呼ばれる細胞内での葉緑体の移動が誘導されないことも知られている (佐藤と門田, 2012)。例えば、フォトトロピンなど光受容体に青色光などの刺激光を照射し、観察には近赤外光である2光子励起光を用いることで、葉緑体の移動を抑えて観察するなど、組織深部で刺激と観察を同時におこなうことも可能となってくる。

それでは、植物の組織内では、どの蛍光タンパク質をどの励起波長で2光子励起すれば最も明るく、鮮明な像が得られるのだろうか。2光子励起では、1光子励起と異なる吸収スペクトルを示す蛍光タンパク質が数多く存在することが報告されている (Drobizhev et al. 2011)。例えばDsRed2やEGFPでは、吸収スペクトルがより短波長側にシフトすることが知られている。つまり、1光子の倍となる値よりもやや短い波長で励起した方が、蛍光タンパク質を効率よく励起できるということを示している。また、TagRFPやECFPなど、1光子ではひとつのピークを持つものが、2光子励起では異なる波長域に2つ以上のピークを持つことも報告されている (Drobizhev et al. 2011)。これらの現象から、2光子励起を用いる場合は、単純に1光子の倍の波長を使用したのでは最適な吸収効率を得られないということがいえる。また、mCherryやmOrangeのように、1光子に比べ極端に吸収効率が下がる蛍光タンパク質も報告されている (Drobizhev et al. 2011)。単純に1光子と同じ蛍光タンパク質を用いるのではなく、観察したい組織にあわせて検討することも必要である。

以上を踏まえると、見たいものをより明るく、より詳細に捉えるためには、自家蛍光、励起波長、そしてプローブに用いる蛍光タンパク質について、あらかじめ良く知っておく必要があることがわかる。また、同じ組織であっても発生ステージやダメージなど、細胞の状態によっても自家蛍光が変化することが報告されている (Roshchina 2012)。標的となる組織を可視化する前に、観察したい組織がどのような自家蛍光を持つのか、どの蛍光タンパク質が最も観察に適しているのかなど、様々な励起波長を用いて実際に観察し、あらかじめデータを取得しておくことが重要である。

図2 2光子顕微鏡における励起波長による葉表面の自家蛍光の違い。核局在sGFP発現シロイヌナズナの葉の表面を900 nmおよび990 nmの励起光で観察した。検出器はNDD型PMTを使用。スケールバーは100 μ m (上段)、または200 μ m (下段)。

1波長の2光子励起による同時多色イメージング

1光子と2光子で吸収スペクトルが異なる蛍光タンパク質が存在することは前章で述べたが、一般に、2光子の吸収スペクトルは1光子より幅が広がる傾向がある (Drobizhev et al. 2011)。つまり、それぞれの蛍光タンパク質の吸収スペクトルの裾の重なりが、より大きくなるということである。この性質により、例えば緑と赤のように蛍光波長が異なる蛍光色素においても、1波長の2光子励起で同時多色イメージングが可能になる (岡田 2009, Tilló et al. 2010)。この特徴を活かして、Nemotoら (2001) は、 Ca^{2+} 指示薬であるfura-2や他の蛍光色素など、異なる波長を示す物質を2光子励起により同時多色イメージングし、マウスの膵臓のような不透明な組織深部で、分泌現象を明らかにしている。また、インスリンの分泌現象をマウスの膵臓内でリアルタイムに計測する実験系も確立されている (Takahashi et al. 2002)。それでは、植物組織ではどのように同時多色イメージングを活用できるのだろうか。図3は花粉管と解剖した胚珠を培地上で共培養し、2光子顕微鏡で観察したものである。花粉管は花粉管特異的プロモーターを用いて、それぞれmTFP1 (青)、sGFP (緑)、TagRFP (橙)、mRFP (赤) の異なる4色の蛍光タンパク質により可視化している。また、胚珠の助細胞はVenus (黄) により可視化している。図3は異なるバンドパスフィルターによる像を重ね合わせたものではなく、一回のスペクトルイメージングで得られた写真である。カラフルに色分けした4色の花粉管を980 nmの1波長で2光子励起することで、一回の撮影で青から赤までの多色の像を得ることが可能となっている。また、花粉管を色分けすることで、胚珠へ誘引された花粉管がどこからどのようにきているかなどを詳細に解析することができる。さらに、1波長で多色イメージングが可能ということは、撮像にかかる時間を短縮し、励起光によるダメージを最少に抑えることができるということでもある。今後、花粉管伸長や花粉管ガイダンスなど、受精過程における花粉管の挙動を色とりどりに分けて、個々を追跡しながらライブイメージングすること

が可能になると期待される。

一方、同時多色励起という2光子励起の性質は、異なる分子の共局在を高解像度で見たい場合などにも重要である。なぜなら、2光子励起においては、どの波長の蛍光も同じ場所から出ていることが保証されるからである。例えば、緑と赤に色分けした分子の共局在を観察する場合、共焦点顕微鏡ではレンズの色収差のため励起波長ごとに焦点位置が異なることを考慮する必要があるが、2光子励起では同時励起されるため、その必要がない。このことは例えば一分子イメージングや蛍光相互相関分光法など、時間分解能を必要とする多色観察にも重要になってくる。

以上、2光子顕微鏡の利点を述べたが、その一方で目的のシグナルのみを観察したい場合には、同時多色励起という性質は欠点となってくることがある。この場合はバンドパスフィルターを用いるなど、得られる蛍光の取捨選択が必要となってくる。また、ひとつの波長で同時多色イメージング可能な蛍光タンパク質、および波長域も限られている。あまり波長が離れた色素や蛍光タンパク質どうしを使えないのであれば、ストークスシフトが大きい(励起波長と蛍光波長が遠い)蛍光タンパク質を用いるという選択もある(Kogure et al. 2008)。これらの特徴を踏まえ、2光子顕微鏡の利点と難点を理解し、最大限活用することで、これまで不可能であった色とりどりの生体イメージングや、組織深部におけるタンパク質相互間作用など、様々な生命現象の解明が期待できる。

図3 シロイヌナズナの胚珠へ向かって伸長する色とりどりの花粉管。mTFP1 (青)、sGFP (緑)、TagRFP (橙)、mRFP (赤)の異なる4色の蛍光タンパク質を花粉管特異的プロモーターにより発現させた花粉管と、解剖した胚珠を培地上で共培養し、培養開始から4時間後に2光子励起顕微鏡により観察した。胚珠の助細胞はVenus (黄)により可視化している。胚珠の形をわかりやすくするため、輪郭を灰色の線で示している。橙色の花粉管が胚珠の珠孔へ誘引されているのがわかる。励起波長は980 nm。検出器はスペクトルディテクタを使用。

2光子顕微鏡による深部イメージング

これまで2光子顕微鏡の特性について述べてきたが、それではいったいどのくらいの深さまで生体組織を観察するこ

とができるのだろうか。動物細胞における2光子顕微鏡の応用は、脳深部のニューロンや臓器の*in vivo*ライブイメージングが盛んにおこなわれており、近年技術革新が目覚ましい。Kawakamiら(2013)は、麻酔したマウス、つまり生きたマウス的大脑新皮質において、1030 nmで2光子励起し、深さ1 mmを超える海馬のCA1ニューロンを観察することに成功している。また、2光子励起とバンドパスフィルターを駆使することで、マウスの細胞を同時多色励起し、4次元画像を得る試みもおこなわれている(Kitano and Okada 2012)。一方、植物組織において2光子顕微鏡を用いた報告は今のところ数報を数える程度となっている。2光子顕微鏡が植物分野に応用された当初から、根や葉の表面、葯の内部など数十～数百 μm の組織であっても、深部観察が容易でないことが報告されてきた(Feijó and Moreno 2004)。Cheungら(2010)は、めしべ内での花粉管伸長と花粉管ガイダンスを観察するため、シロイヌナズナのめしべ表面から内部への*in vivo*ライブイメージングを試みている。その結果、めしべ内の100-120 μm 深部の花粉管を捉えることには成功したものの、花粉管が内部で伸長する様子、つまりライブイメージング自体は20分程度と、生殖過程の概要を解明するには至らなかった。このように、植物組織の深部イメージングでは、組織によっては1 mmどころか100 μm 深部を観察するのも困難である。これは上記に述べた葉緑体や細胞壁の自家蛍光といった植物特有の障害があるとともに、植物の組織自体が屈折率の異なるさまざまな細胞や構造からなっていることが原因ではないかと考えられる。しかし、近年の顕微鏡分野における光学系の発達や、GaAsPに代表されるような高感度な検出器の開発により、従来に比べ植物の深部イメージングが徐々に可能になってきている。通常、胚発生初期のシロイヌナズナの胚珠の厚さは200 μm 程度であり、胚珠内部を観察するためには組織を固定し、染色や試薬による透明化をおこなう必要がある。組織を固定せずに、どこまで胚珠内部を観察できるか確かめるため、Kuriharaら(2013)は、シロイヌナズナのめしべから胚珠を取り出し、胚珠内の胚を1光子顕微鏡と2光子顕微鏡を用いて比較している。この観察では、1光子顕微鏡では不鮮明であった球状胚の核の一つ一つを、2光子顕微鏡ではっきりと捉えることに成功している。また、Hamamuraら(2011)は、受精前後のシロイヌナズナの胚珠を培地上で観察し、胚珠内の重複受精の様子を生きたまま数時間にわたって捉えることに成功している。この観察から、胚珠の中で2つの精細胞が卵細胞と中央細胞の間にしばらく留まる様子や、再び動き始める様子など、重複受精のタイミングが明らかとなっている。これらの例は、2光子顕微鏡を用いることで、より深部まで鮮明な像を得ることが可能となっただけでなく、植物組織でも長時間のライブイメージングが可能となってきたことを示している。図4は2光子顕微鏡により観察されたシロイヌナズナの胚珠とめしべ内部の画像である。図に示すように、解剖して培地中に取り出したFGR8.0の胚珠では胚珠内部の助細胞の核(GFP)、卵細胞の核(dsRed)、中央細胞の細胞質(YFP)が1000 nmで同時励起されており、核の位置や細胞内部の様子をはっきりと観察できる(図4A)。一方、*in vivo*、つまり解剖せずにめしべ内の胚珠をめしべの外側から観察した場合でも、胚珠内部の様子を捉えることが可能である(図4B)。胚珠内の助細胞や卵細胞、中央細胞が、胚珠を解剖したものと同じくらいはつきり観えている。胚珠の向きが

適切であれば、図4Bの左上に示すように、100-150 μm 深部であってもめしべの中の助細胞の核が2つ並んでいる様子まで捉えることができる(矢印)。Cheungら(2010)の方法では、シロイヌナズナの植物体に付いたままのめしべを2光子顕微鏡で観察後、そのまま栽培を続け、鞘が正常に発達し種子が得られている。In vivo イメージングにより観察しためしべをそのまま植物体上で育てることができるのであれば、胚珠が種子、そして個体になるまでを経時的に解析するなど、組織レベルと個体レベルを結びつけるような研究が可能になってくる。今後、2光子顕微鏡を用いたin vivo ライブイメージング技術が発達することで、受精の瞬間や胚発生の様子など、めしべ内部で進行する生殖過程をリアルタイムで観察できるようになることが期待される。

おわりに

2光子顕微鏡を用いることで、従来の1光子顕微鏡では実現不可能であった植物組織深部のin vivo イメージングや同時多色イメージングが可能となってきた。しかし一方で、観察したい組織や植物種によって自家蛍光の波長や最適な励起波長が異なること、そして最適な蛍光タンパク質が異なることに留意する必要がある。せっかく様々な蛍光タンパク質で色分けしても、ひとつの波長では励起できなかつたり、その波長では自家蛍光を誘起してしまつたりでは、同時多色および深部イメージングの魅力が半減してしまう。これらの条件検討が必須であることは、植物だけでなく、動物組織や細胞でも指摘されている(Kitano and Okada 2012)。さらに、これら2光子顕微鏡の特徴を最大限に生かすためには、対物レンズなど光学系の選択も重要になってくる(横井, 2011)。いずれにせよ、観察したい試料にあわせて、最適な観察条

件を地道に検討することが重要である。2光子励起顕微鏡の光源であるフェムト秒パルスレーザーは、焦点面にのみ集光できるという特性から、深部イメージングという側面だけでなく、局所的な細胞破壊(アブレーション)をおこなうことも可能である(Hosokawa et al. 2011)。今後、植物組織の深部で展開される生命現象をin vivo で捉えるだけでなく、狙った細胞のアブレーションと観察を同時並行でおこなうなど、細胞レベルの研究に大いに役立つことが期待される。2光子顕微鏡を用いた観察が植物全体の様々な研究分野で活躍することを期待したい。

謝辞

本稿は日本植物学会第77回大会でおこなわれたシンポジウム「新世代の画像情報が切り拓く世界」の内容を元に執筆したものである。本研究をおこなうにあたり、植物材料の種子をDr. Rita Groß-Hardt (University of Tübingen) から分与して頂いた。この場を借りて深く感謝したい。本研究はJST・ERATO 東山ライブホロニクスプロジェクトによる研究助成により遂行された。ご指導・ご支援を頂いた研究室の方々にこの場を借りて深く御礼申し上げたい。

引用文献

- Benninger, R. K. P., and Piston, D. W. (2013) Two-photon excitation microscopy for the study of living cells and tissues. *Curr Proto Cell Biol* Chapter 4: Unit 4.11.1-24.
- Centonze, V. E., and White, J. G. (1998) Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging. *Biophys J* 75: 2015-2024
- Chapman, S., Oparka, K. J., and Roberts, A. G. (2005) New tools for in vivo fluorescence tagging. *Curr Opin Plant Biol* 8: 565-573.
- Cheung, A. Y., Boavida, L. C., Aggarwal, M., Wu, H.-M., and Feijó, J. A.

図4 FGR8.0 (Völz et al. 2013) の胚珠、およびめしべを二光子励起顕微鏡により観察した像。(A)めしべを解剖後、培地上に取り出したFGR8.0の胚珠の明視野像と2光子励起像。助細胞の核(GFP, 黄)、卵細胞の核(dsRed, 橙)、中央細胞の細胞質(YFP, 黄)がそれぞれ各細胞特異的なプロモーターにより可視化されている。重ね合わせ像では、胚珠の形をわかりやすくするため、輪郭を灰色の線で示している。Bar = 50 μm 。(B)FGR8.0のめしべ内部の2光子励起像。図は子房壁表面からZ軸方向に100-150 μm 深部の画像を立体構築したもの。自家蛍光によりめしべ両側の子房壁と壁面に付着した花粉が観えている。解剖した胚珠に比べ解像度は劣るが、めしべ深部にある胚珠内の各細胞のシグナルをはっきり捉えることができる。矢印は助細胞の核が2つ並んでいる様子を示す。Bar = 100 μm 。励起波長は1000 nm。検出器はNDD型GaAsPを使用。

- (2010) The pollen tube journey in the pistil and imaging the *in vivo* process by two-photon microscopy. *J Exp Bot* 61: 1907-1915.
- Drobizhev, M., Makarov, N. S., Tillo, S. E., Hughes, T. E., and Rebane, A. (2011) Two-photon absorption properties of fluorescent proteins. *Nat Methods* 8: 393-399.
- Feijó, J. A., and Moreno, N. (2004) Imaging plant cells by two-photon excitation. *Protoplasma* 223: 1-32.
- Hamamura, Y., Saito, C., Awai, C., Kurihara, D., Miyawaki, A., Nakagawa, T., Kanaoka, M. M., Sasaki, N., Nakano, A., Berger, F., and Higashiyama, T. (2011) Live-cell imaging reveals the dynamics of two sperm cells during double fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 21: 497-502.
- Helmchen, F., and Denk, W. (2005) Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* 2: 932-940.
- Hosokawa, Y., Ochi, H., Iino, T., Hiraoka, A., and Tanaka, M. (2011) Photoporation of biomolecules into single cells in living vertebrate embryos induced by a femtosecond laser amplifier. *PLoS ONE* 6: e27677.
- Kawakami, R., Sawada, K., Sato, A., Hibi, T., Kozawa, Y., Sato, S., Yokoyama, H., and Nemoto, T. (2013) Visualizing hippocampal neurons with *in vivo* two-photon microscopy using a 1030 nm picosecond pulse laser. *Sci Rep* 3: 1014.
- Kitano, M., and Okada, T. (2012) Four-dimensional tracking of lymphocyte migration and interactions in lymph nodes by two-photon microscopy. *Meth Enzymol* 506: 437-454.
- Kogure, T., Kawano, H., Abe, Y., and Miyawaki, A. (2008) Fluorescence imaging using a fluorescent protein with a large Stokes shift. *Methods* 45: 223-226.
- Kurihara, D., Hamamura, Y., and Higashiyama, T. (2013) Live-cell analysis of plant reproduction: live-cell imaging, optical manipulation, and advanced microscopy technologies. *Dev Growth Differ* 55: 462-473.
- Miller, M. J., Wei, S. H., Parker, I., and Cahalan, M.D. (2002) Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* 296: 1869-1873.
- Müller, S. M., Galliardt, H., Schneider, J., Barisas, B. G., and Seidel, T. (2013) Quantification of Förster resonance energy transfer by monitoring sensitized emission in living plant cells. *Front Plant Sci* 4: 413.
- Nemoto, T., Kimura, R., Ito, K., Tachikawa, A., Miyashita, Y., Iino, M., and Kasai, H. (2001) Sequential-replenishment mechanism of exocytosis in pancreatic acini. *Nat Cell Biol* 3: 253-258.
- 岡田蜂陽 (2009) 多光子顕微鏡による生体組織の多色ライブイメージング. 基礎老化研究 33: 13-15.
- Roshchina, V. V. (2012) Vital autofluorescence: Application to the study of plant living cells. *Int J Spectrosc* doi: 10.1155/2012/124672.
- 佐藤良勝, 門田明雄 (2012) 微光束照射装置付き蛍光イメージングシステムにより観えた葉緑体アクチン繊維の動態. *Plant Morphol* 24: 19-22.
- Stosiek, C., Garaschuk, O., Holthoff, K., and Konnerth, A. (2003) In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7319-7324.
- Takahashi, N., Kishimoto, T., Nemoto, T., Kadowaki, T., and Kasai, H. (2002) Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet. *Science* 297: 1349-1352.
- Tillo, S. E., Hughes, T. E., Makarov, N. S., Rebane, A., and Drobizhev, M. (2010) A new approach to dual-color two-photon microscopy with fluorescent proteins. *BMC Biotechnol* 10: 6.
- Völz, R., Heydlauff, J., Ripper, D., von Lyncker, L., and Groß-Hardt, R. (2013) Ethylene signaling is required for synergid degeneration and the establishment of a pollen tube block. *Dev Cell* 25: 310-316.
- 横井英司 (2011) 2光子励起顕微鏡による生体深部イメージング. In: 顕微鏡の使い方ノート 改訂第3版, 野島 博 (ed), 羊土社, 東京, pp 176-180.

Received: 7 February 2014