

「Spring-8 マイクロ CT を利用した種子発芽の研究」

兵庫県立大学大学院生命理学研究科

峰雪 芳宣

1 研究の背景と目的

環境が悪くなくても簡単に移動できない植物では、生育が難しい環境になると種子という形で個体を維持し、周りが発芽できる環境に変化するまで待つ。雨で周囲から十分な水が供給できる環境になると、種子は発芽を開始する。もし吸水途中で雨が止み再度乾燥状態になれば、種子は死ぬことになる。自然界ではこのような環境変化にも対応し、種子が吸水開始中に水のない環境に変化しても、ある時期までは生き延びる仕組みが存在していると思われる。しかし、その仕組みはほとんど分かっていない。吸水開始前後の種子内部がどのようになっているのか、従来の組織化学的な方法で乾燥種子を観察しようとする、固定や包埋過程でアーティファクトが生じるため、種子内の細胞と細胞間隙の立体的な位置関係の解析は困難であった。非破壊で種子内の構造を観察する X 線 CT は、この問題を解決できる一つの手段である。我々が現在利用している、大型放射光施設 Spring-8 の X 線マイクロ CT では、従来の X 線 CT に比べ格段に分解能が向上し、種子内の構造がマイクロメートルレベルで観察が可能になっている。我々は、この装置を使って様々な種子や実生の観察方法を改良し、ミヤコグザ種子内のシュウ酸カルシウムの結晶の 3 次元 (3D) 分布 (Yamauchi et al. 2013 *Microscopy* 62, 353-361)、イネの根の通導組織発達段階の細胞レベルでの追跡 (Karahara et al. 2012 *Ann Bot* 110, 503-509) を可能にした。また、直径 2 mm の小さなシロイヌナズナを使って、高分解能で乾燥種子のほとんどすべての細胞の並びを観察できるようになった (Yamauchi et al. 2012 *AIP Conf Proc* 1466, 237-242)。もし、この種子内の細胞と細胞間隙のすべての空間配置を抽出できれば、種子内の細胞と細胞間隙のより精度の高い幾何学的考察への新しい道が拓ける。また、種子内の細胞の 3D 配列と、発芽が開始すると再会する呼吸などの生理活性に必要な酸素や二酸化炭素の通り道としての細胞間隙がどのようになっているのか、あるいはどの種子発芽過程でどのようにして発達するのか、今までほとんど解明できていない分野への研究発展が期待できる。

Spring-8 のマイクロ CT を使って、種子を高解像度で 3D 観察ができ、シロイヌナズナの乾燥種子のほぼすべての細胞の輪郭の判定が可能である。そこで我々は、この技術を利用して、種子発芽初期過程における種子胚を構成する個々の細胞と細胞間隙の位置関係を 3D で把握し、種子の吸水過程でどのようにして種子胚は体を構成するすべての細胞に水や酸素を供給しているのか、その仕組みを明らかにすることを中期的な目標として研究を行っている。マイクロ CT のデータから必要な情報を抽出する方法や吸水中の種子で十分な分解能を持った画像の取得する方法など、幾つか技術的に解決しなければならない問題が残っていたので、本研究ではまず、乾燥種子を使ったマイクロ CT のデータを元に、細胞の輪郭を抽出し、細胞の配列や形を記述できるモデルを作製し、ここの細胞の形と胚全体の形との関係を議論できる手法を確立することを目的とした。一方、発芽に伴う胚の成長を調べるためには、吸水過程の種子もマイクロ CT で観察する必要があるが、吸水することで、胚中のコントラストが低下する。そこで、発芽の初期過程である吸水過程で、これらの細胞の変化とその配列がどうなるか、吸水中の種子の明確な細胞の輪郭が抽出可能な試料調製法を検討する。また、吸水過程での種子内の構造変化を検出するための同一の個体を用いた連続観察法に関しても検討した。これらの方法を開発することにより、種子発芽初期過程における種子内の構造と機能に関する研究の新しい第一歩が開けるようにするのが本研究の目的である。

## 2 研究方法・研究内容

本研究では、大型放射光施設のマイクロCTを使って種子発芽の初期過程である種子の

吸水による形態変化を解析するために必要な技術の検討として、

(1) 乾燥種子の細胞地図作製と特徴抽出法の開発、(2) X線CT用の吸水種子試料調整法の開発、(3) 同一種子での吸水過程の経時的観察法の開発の3つのテーマについて研究を行った。材料としては、(1)

(2)のテーマでは、すべての細胞が丁度1個のCTで取得でき、将来個々の細胞と全体の形との議論が期待できるシロイヌ

ナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Columbia) を使用した。また (3) で

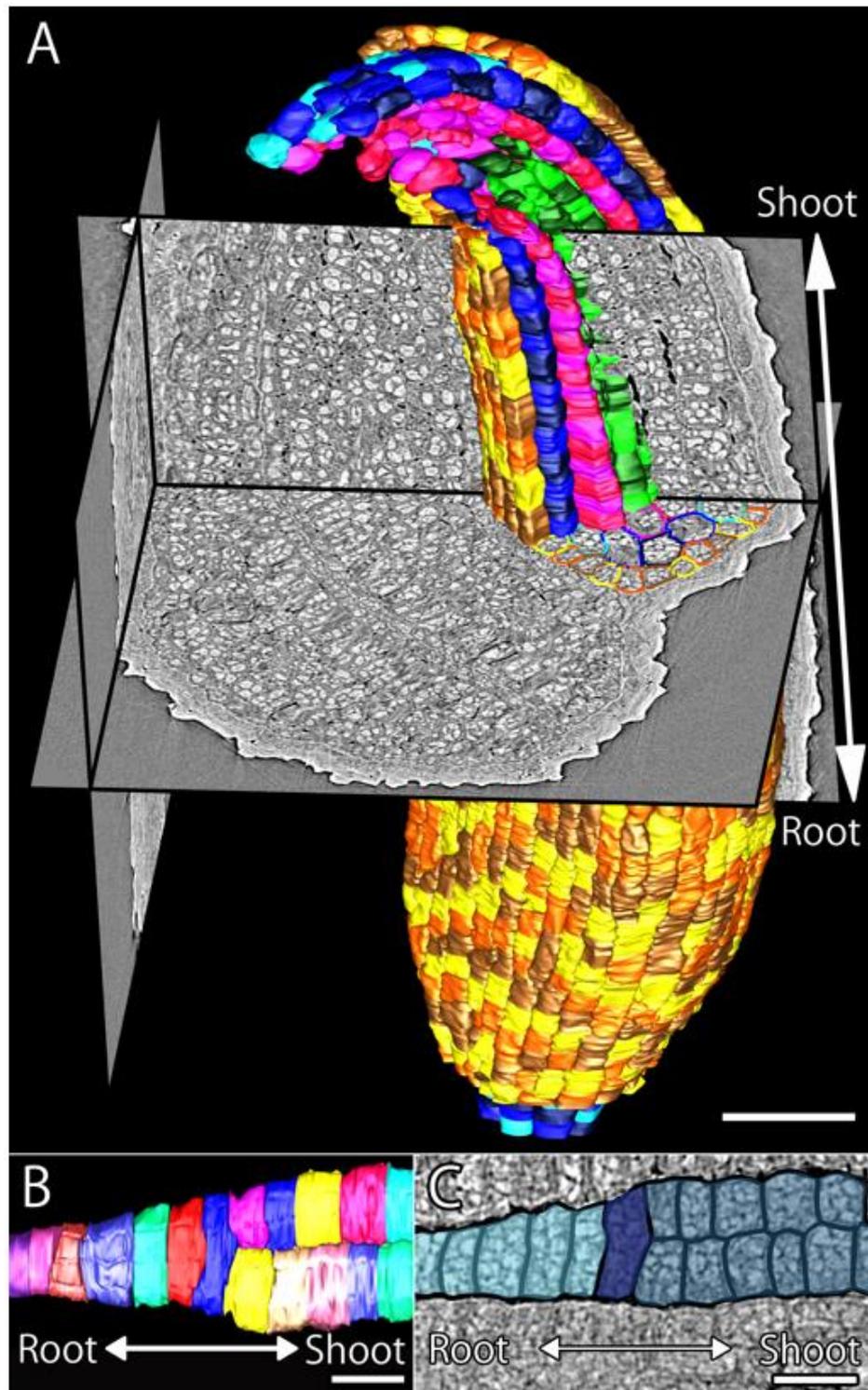


図1. シロイヌナズナ乾燥種子のマイクロCT解析. 矢印は体軸を表し, Shootは茎頂側, Rootは根端側を示している. (A) 幼根-胚軸を構成する細胞配列の3Dモデル. 一部, 種子のトモグラムの3つの断面を示している. オレンジ色: 表皮, 青色: 外側皮層, 赤色: 内側皮層, 緑色: 内皮. Bar = 50 µm. (B) 外側皮層細胞列が増加していることを示す3Dモデル. 個々の外側皮層細胞を違う色で表した. Bar = 20 µm. (C) 胚軸の接線方向断面図での外側皮層細胞の垂層分裂を表したトモグラフィックスライス. Bar = 20 µm

は、マメ科のモデル植物で、子葉の細胞間隙に関してデータを蓄積しているミヤコグサ (*Lotus miyakojimae* Karamina) を使用した。マイクロ CT 観察は (1)、(2) では BL20XU のマイクロ CT (8 keV, 0.2~0.5  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ ) で取得したデータを、(2) の一部及び (3) では BL20B2 のマイクロ CT (10 keV, 2.76  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ ) を使用した。

(2) の試料作製法の検討では、シロイヌナズナ種子を1時間吸水させたのち、4% パラホルムアルデヒド水溶液・2% 四酸化オスミウム水溶液による固定を試みた。本成果では、その中で一番外形の変形が少なかった2% 四酸化オスミウム水溶液 4  $^{\circ}\text{C}$ 、1日間の固定条件の結果を示した。固定試料を洗浄後イオン液体処理を行った。イオン液体の蒸気圧が極めて低いという特徴を利用することで、乾燥の際の水の蒸発による種子の変形が抑えられると考えたからである。イオン液体としては 1-Butyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborate および、そのほかに2種類試した。

SPring-8 のマイクロ CT を使ったデータ取得には、JASRI の上杉健太朗博士、星野真人博士、鈴木芳生博士、竹内晃久博士、富山大の唐原一郎博士、玉置大介博士との共同研究で行った。また、イオン液体は大阪大学桑畑進博士、津田哲哉博士及び和歌山工業高等専門学校の綱島克彦博士から提供を受けた。

### 3 研究成果

(1) シロイヌナズナ乾燥種子の細胞地図作製と特徴抽出 シロイヌナズナは幼根から胚軸にかけて一定の放射パターンを幼根から胚軸にかけて持っているため、細胞の形や積み重なり方といった3D 幾何学的特徴の解析を行うのに適している。BL20XU で取得したシロイヌナズナ乾燥種子のマイクロ CT 画像から、幼根から胚軸の細胞の輪郭を囲んだトモグラムを重ねてモデルを作製した (図 1)。シロイヌナズナ種子の幼根の皮層細胞は、表皮と内皮の間に1層 6~12 列の細胞列として存在するが、胚軸の皮層細胞は2層からなり、外側の皮層細胞層は幼根皮層細胞列のほぼ倍の細胞列になっている。内皮細胞から内側皮層細胞列を新たに形成させる並層分裂と、外側皮層細胞列を増加させる垂層分裂の皮層形成に関わる2種類の分裂を、幼根から胚軸への移行領域で観察することができた (図 1B, C)。これらの個々の細胞の体積や断面積など、細胞幾何学的な特徴を抽出することで、幼根-胚軸の横断面積の増大は表皮・皮層細胞列の増加と、皮層細胞の横断面積の増大が関係していることを示唆することができた。今回細胞の輪郭を抽出できた個体はまだ少ないので、今後例数を増やす必要がある。細胞の輪郭をある程度自動で抽出できれば、この効率が上がるはずで、今回も手動での細胞輪郭抽出と並行して、一部自動化することを試みたが、まだ実用化には至っていない。今後の課題である。

(2) X線 CT 観察の為にシロイヌナズナ吸水種子の試料調製法の検討 種子は吸水すると急激に種子内のコントラストが低下し、乾燥種子内の構造観察が難しくなる。(1) の研究で乾燥種子の3D 細胞幾何解析が可能になっても、吸水中の種子でそれらの構造がどのように変化していくか観察できなければ、種子の吸水の仕組みの研究には到達しない。そこで、吸水中の種子をマイクロ CT で解析する試料作製法を検討した。吸水1時間目のシロイヌナズナ種子 (図 2A) を使い、各

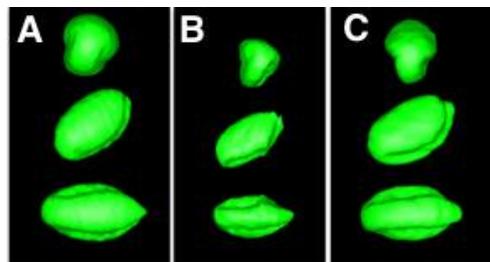


図2. イオン液体を使ったシロイヌナズナ種子の変形防止。(A) ~ (C) は吸水1時間後の種子を3方向から見た3Dモデル。SPring-8ビームラインBL20B2のマイクロCTで取得した画像の種子表面の輪郭を抽出しモデルにした。(A) 無処理 (生きている) 種子。(B) 固定後直接乾燥した種子。(C) の乾燥する前にイオン液体 (1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate) で処理し放置した種子。この処理で種子の変形が防止できている。

種の固定方法やその後の処理方法を検討した。図2Aの状態の種子をマイクロCTで観察してもコントラストが低く良い画像が取得できない。一方、この種子を四酸化オスミウムで固定し、水洗後自然乾燥させると、中の構造は見えるようになるが、図2Bのように、種子自体が縮み種子内の構造に大きな変形が生じていた。そこで、固定した種子を室温で放置する前にイオン液体で処理する検討を行った。3種類のイオン液体を試し、高濃度の1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborateで処理するのが、その後の種子の変形を抑えるのに良いことがわかった(図2C)。詳細な処理条件を詰める必要が残っているが、イオン液体が種子のマイクロCT観察に有効なことがわかった。

(3) ミヤコグサを使った同一種子での吸水過程の3D経時的観察法の検討 BL20XUのX線では、1回の画像取得で種子は死んでしまい、同じ種子での経時的観察は難しかった。種子の発芽過程で、種子内での酸素などのやりとりを行う空間(通洞組織)がどのようにして発達、維持されているのかを調べるには、どうしても同じ種子で吸水前後の比較が必要である。ミヤコグサはマメ科のモデル植物の一つで、我々はBL20B2のマイクロCTを使って子葉の細胞間隙が吸水開始90分までに発達することを見つけている(山内 未発表)。そこで、分解能は悪くなるが照射するX線量が少ないBL20B2のマイクロCTを使って、ミヤコグサの吸水過程の連続観察を試みた。その結果、種子が生きたまま、吸水開始から30分おきに90分間CT画像を取得できる条件をみつけることができた(図3)。まだ、このデータの3D解析方法は確立できていないが、うまくいけば将来、個々の細胞の形の変形と細胞間隙の発達の関係を解析できる可能性が出てきた。

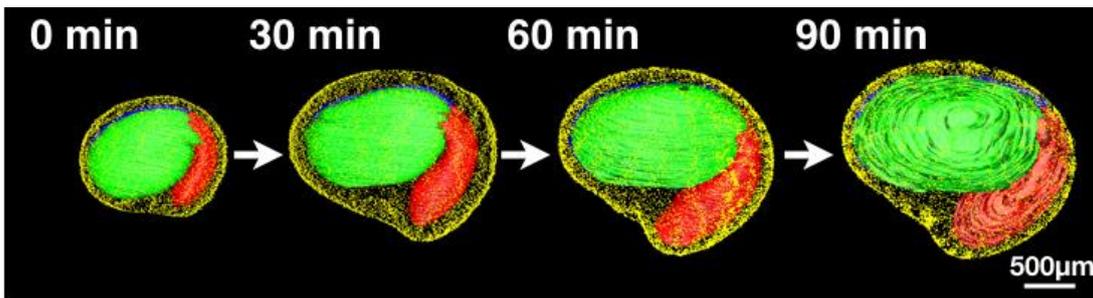


図3 . SPring-8ビームラインBL20B2のマイクロCTを使ったミヤコグサの吸水過程における体積増加の3D経時観察。左橋からそれぞれ、吸水前(乾燥種子)、吸水開始後30分、吸水開始後60分、吸水開始後90分の3Dモデルを示している。黄色: 種子の外形、緑色及び青色: 子葉の外形、赤色: 胚軸(幼根を含む)の外形。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

地球の人口増大が止まらない現代では、食糧問題は最重要な社会問題の一つである。我々は今回の大型放射光施設 SPring-8 のマイクロCTを使った研究で、種子内部の細胞の並びとその周りに存在する空間の細胞幾何学的な解析を可能にした。また、従来難しかった吸水中の種子における観察にも目処がついてきた。まだ改良の余地は残っているが、この方法をさらに改良することで、今まで見えなかった種子発芽過程の細胞間隙の様子が、3次元マイクロメートルレベルで詳細に記述可能になる。このマイクロCTの撮影法と解析法を使って発芽する能力を有する種とその能力を失った(死んだ)種のこれらの構造を調べることで、種子内にどのような間隙ができたか、その種子は発芽能力を失うのかが判明できる可能性がある。これに成功すれば、新しい種子の保存方法を提唱でき、食物資源の保存法の改良に役立つことが期待できる。