

## 各種 DNA 結合性蛍光色素で染色したアマノリ葉状体の共焦点レーザー顕微鏡による観察

清水昭男・森島 輝・中山一郎

水産総合研究センター中央水産研究所 (236-8648 横浜市金沢区福浦 2-12-4)

Akio Shimizu, Kagayaki Morishima and Ichiro Nakayama: Confocal microscopic observation of *Porphyra* thalli stained with various fluorescent dyes. Jpn. J. Phycol. (Sôri) 53: 145- 146, July 10, 2005

Methanol fixed *Porphyra* thalli were stained with various fluorescent dyes *i. e.* Propidium Iodide (PI), YO-PRO-1, TO-PRO-3, and SYTOX-Green. The stained samples were observed with a confocal laser scanning microscope (LSM510, Carl Zeiss). Nuclei, chloroplast nucleoids, and probable mitochondrial nucleoids were visualized with 488 nm wavelength excitation and a 500-505 nm filter in both SYTOX-Green stained and YO-PRO-1 stained specimens. Observation of auto-fluorescence with 633 nm excitation and a 650- nm filter also visualized chloroplasts and pyrenoids. PI (543 nm excitation and a 560- nm filter) and TO-PRO-3 (633 nm excitation and a 650- nm filter) stained specimens were not adequate for obtaining clear images. These results indicate that confocal microscopy with an appropriate fluorescent dye is one of the useful tools for detailed cytological observations on the thalli of *Porphyra* which contain large chloroplasts having intense stainability for various histological dyes and strong auto-fluorescence.

Key index words: *Porphyra*, *Thallus*, *Confocal microscopy*, *Fluorescent dye for DNA*, *Nucleus*, *Chloroplast nucleoid*, *Mitochondrial nucleoid*

National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency, Fukuura 2-12-4, Kanazawa, Yokohama, 236-8648 Japan

アマノリは形態や核相の異なる様々な世代が交代する複雑な生活環を持つが、各世代における組織学的・細胞学的知見の蓄積が未だ十分とはいえない。この理由として、細胞の大部分を占める巨大な葉緑体を持つ強力な染色性や自家蛍光能により、詳細な光学顕微鏡的観察が従来は困難であったことが挙げられる。そこで本研究では葉緑体の自家蛍光との重なりがなるべく少ない蛍光特性を持つDNA結合性色素を探索し、これを用いた染色と、高い分解能を持つ共焦点レーザー顕微鏡による詳細な観察とを組み合わせることで、DNAの局在を正確に把握して細胞核やオルガネラ核様体を判別し、アマノリ細胞の微細構造の観察法を確立するとともに、核相同定や減数分裂位置確定のための基盤を得ることを試みた。

材料のササビノリ (*Porphyra yezoensis* UEDA) 葉状体は有明海の養殖場で採取したものをを用いた。これをメタノールで固定後、そのまま冷蔵庫内で保存した。観察時には葉状体を PBS (Phosphate Buffered Saline) で洗浄し、TO-PRO-3 (極大吸収波長 642 nm, 極大放出波長 661 nm; いずれも DNA 結合時, 以降同様), YO-PRO-1 (極大吸収波長 491 nm, 極大放出波長 509 nm), 及び SYTOX Green (極大吸収波長 504 nm, 極大放出波長 523 nm) については 2.5 mM の濃度で PBS に溶解したこれらの蛍光色素 (いずれも Molecular Probes 社製) にて 5 分間染色した。染色標本は PBS で洗浄後、VECTASHIELD (VECTOR 社製) で封入した。Propidium Iodide (PI; 極大吸収波長 536 nm, 極大放出波長 617 nm) については 1.5 µg/ml PI 含有 VECTASHIELD (VECTOR 社製) で封入と同時に染色を行った。これらの試料を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510; カールツァイス社製) により検鏡した。また、通常の蛍光顕微鏡による観察も併用し、さらに DNA 染色剤として汎用される DAPI (極大吸収波長 358 nm, 極大放出波長 461 nm) で染色した標

本についても蛍光顕微鏡観察を行った。

PI (励起波長 543 nm, 観察波長 560- nm) 染色標本では、葉緑体からの蛍光が著しく強く、核からの蛍光はそれにマスクされて同定が困難であった。TO-PRO-3 (励起波長 633 nm, 観察波長 650- nm) 染色ではある程度の判別が可能であったが、核の蛍光像は不明瞭であった。SYTOX-Green (励起波長 488 nm, 観察波長 505-550 nm) 及び YO-PRO-1 (励起波長 488 nm, 観察波長 505-550 nm) 染色では、核の強い蛍光が明瞭に観察された (図 1-1)。さらに、励起波長 633 nm で自家蛍光を観察し、これとともに 2 重蛍光観察を行うことで、葉緑体及びその内部構造が確認できた (図 1-1, 図 1-2)。ピレノイドは葉緑体中央部の自家蛍光が低い部位として観察された (図 1-2)。葉緑体の周辺部にはリング状の DNA 局在が観察され (図 1-1)、これは電子顕微鏡及び蛍光顕微鏡を用いた既存の報告 (鬼頭 1978, Kuroiwa *et al.* 1981) との比較から葉緑体核様体であると結論された。また、細胞の周辺部にも DNA 小塊が散在し (図 1-1)、これらは電子顕微鏡観察の結果 (鬼頭 1978) との比較からミトコンドリア核様体であると考えられた。DNA の局在は SYTOX-Green, YO-PRO-1, 及び DAPI 染色標本の通常蛍光顕微鏡観察でも確認されたが、得られた像は共焦点モード観察の方がはるかに鮮明であった。

以上の結果を総合すると、アマノリ細胞の共焦点蛍光観察に適する色素は SYTOX-Green 及び YO-PRO-1 であり、PI 及び TO-PRO-3 は不適と考えられる。DAPI についても、共焦点レーザー顕微鏡による微細構造の観察に有用であることが報告されているが (Kuroiwa *et al.* 2002)、この色素で染色した標本の共焦点モードによる観察には大規模な紫外線レーザー装置または特殊な短波長 (405 nm) のブルーレーザー装置が必要であり、どちらも共焦点レーザー顕微鏡の光源としては一

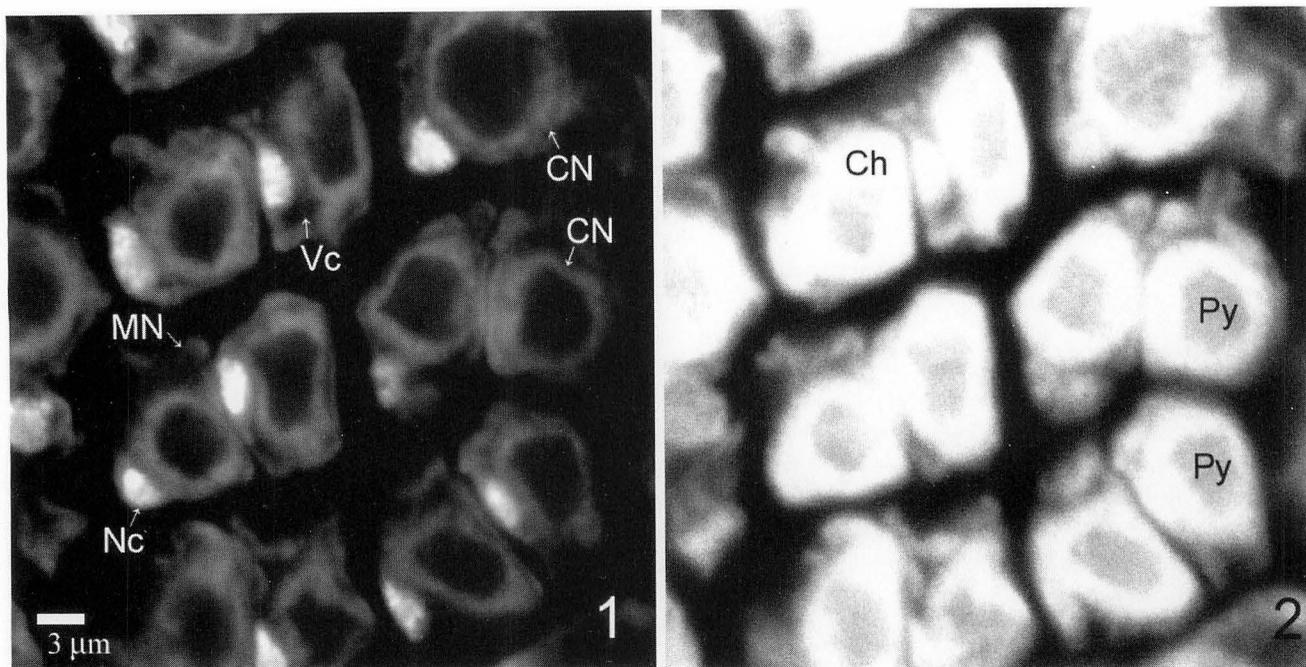


Fig. 1: Confocal microscopic photographs of SYTOX Green-stained *Porphyra* thalli. 1: Observation with 488 nm excitation and a 505-550 nm filter. 2: Observation with 633 nm excitation and a 650-nm filter. Nc: nucleus; CN: chloroplast nucleoid; MN: mitochondrial nucleoid; Vc: vacuole; Ch: chloroplast; Py: pyrenoid.

般的ではないため、共焦点観察にはこれ以外の色素の方が汎用性が高いと考えられる。類似した蛍光特性を持つ SYTOX-Green と YO-PRO-1 に関しては同様の鮮明さで観察像が得られたが、YO-PRO-1 は RNA の共染が多少あるが SYTOX-Green は RNA をほとんど染めないとされていること (鈴木ら 1997) を考えると、SYTOX-Green がアマノリ葉状体の共焦点顕微鏡観察のためには最も適した色素の一つであると結論できる。

共焦点レーザー顕微鏡は通常の蛍光顕微鏡と比較して光軸方向の解像度が著しく高く、また、光学的連続切片の観察によって三次元構造の詳細が分かるという特徴がある。今後、葉状体のみならず、生殖細胞、糸状体、各種孢子及びその発芽体などを共焦点レーザー顕微鏡で観察することで、アマノリ生活史における各世代の細胞学的特徴の詳細が明らかになるものと考えられる。

#### 引用文献

- 鬼頭 鈞 1978. アマノリ属植物の細胞学的研究. 東北水研報 39: 29-84.
- Kuroiwa, T., Kuroiwa, H., & Seki, N. 2002. Visualizing mitochondrial and plastid nuclei in thin sections of DAPI-stained cells using a confocal 405-nm laser scanning microscope. *Cytologia* 67: 439-442.
- Kuroiwa, T., Suzuki, T., Ogawa, K., & Kawano, S. 1981. The chloroplast nucleus: distribution, number, size, and shape, and a model for the multiplication of the chloroplast genome during chloroplast development. *Plant & Cell Physiol.* 22: 381-396.
- 鈴木健史・松崎利行・高田邦昭 1997. レーザー共焦点顕微鏡法における蛍光抗体染色と核酸対比染色. 日本比較内分泌学会ニュース 87 号.

(Received 10 Oct. 2004; Accepted 20 June 2005)