

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07333

研究課題名(和文) 多核種同時イメージング手法を用いた植物のミネラル輸送機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of plant mineral transport mechanism using simultaneous multinuclide imaging system

研究代表者

古川 純 (FURUKAWA, Jun)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：40451687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミヤコグサを用いたGREI装置による複数核種同時イメージングでは、Fe-59、Zn-65、Cs-137を根から同時吸収させた場合の非侵襲での画像解析と、部位別に切断した後の定量測定を行い、双方の測定結果から良好な相関関係を得た。検証対象としたミヤコグサB-129系統の複数元素蓄積能については、シロイヌナズナfrd3変異体で報告されていた地上部組織への鉄輸送機能の低下も生じているものの、複数元素蓄積の直接の原因ではなく、個々の金属元素の輸送を担う複数の機構が関与した結果であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the simultaneous imaging of multiple nuclides using GREI technique, Fe-59, Zn-65 and Cs-137 were absorbed from the root of Lotus japonicus. The results of non-invasive image analysis and quantitative measurement of each tissue had a good correlation and the reliability of gamma-ray imaging is confirmed. As for the mechanisms of multi-elements accumulation in L. japonicus line B-129, the activity of iron transport from root to shoot was decreased similar to the metal accumulating Arabidopsis, frd3 mutant. However, in B-129, such a loss of iron transport function does not induce the accumulation of multiple elements directly. It was suggested that the mechanisms responsible for the each element transport, not for iron only, are involved in the multi-elements accumulation in B-129.

研究分野：植物栄養学

キーワード：元素動態 コンプトンカメラ GREI 大気Micro-PIXE ミヤコグサ 鉄 亜鉛

1. 研究開始当初の背景

陸上植物における金属元素の蓄積には、根圏から根への吸収、根の表面から根の中心にある導管近傍への輸送、導管への導入、導管を利用した地上部への輸送、地上部における導管からの再吸収や器官・細胞レベルにおける分配、局在、隔離など、数多くの場面で必要とされる様々な機構が関わっている。植物は生育に必要な栄養塩が欠乏した環境ではその栄養塩に対する様々な獲得機構を活性化させ、また重金属過剰や高塩濃度といった条件下では、細胞に毒性をもたらすような金属の細胞外への排出、錯体の形成による細胞内無毒化、イオンバランスの是正による毒性の緩和といった機構を活性化させている。このように複雑な機構によって保たれる様々な金属の生体内における恒常性は、特定の金属に対してただ一つの機構が働くのではなく、数多くの機構が協調して機能することによって保たれていると考えられる。また逆に金属輸送体の多くは、一つの輸送体が複数の金属に対する輸送活性を持つことなどから、ある遺伝子が決まった金属だけではなく、複数の金属の恒常性維持に関与する可能性が示されている。特に近年問題となっている毒性重金属や放射性セシウム (Cs) などのような、植物にとって必須ではない元素の吸収や輸送は、何らかの必須元素の輸送機構に依存したものであると考えられており、圧倒的少量に存在する必須元素と、その輸送系に依存する非必須元素の挙動を、同一個体でリアルタイムに同時計測することは、植物の金属蓄積機構の共通性と特異性を明らかにする上で極めて重要であると考えられる。

研究代表者はマメ科のモデル植物であるミヤコグサの主要実験系統である Gifu B-129 系統 (以下 B-129) と Miyakojima MG-20 系統 (同 MG-20) を用いた水耕栽培による解析から、B-129 が MG-20 に比べナトリウム (Na)、マンガン (Mn)、ニッケル (Ni)、銅 (Cu) そして亜鉛 (Zn) を、地上部・根組織それぞれで約 3 倍にまで蓄積していることを明らかにした。このような複数元素を同時に集積する現象としては、シロイヌナズナの *FRD3* 欠損株における Mn、Cu、Zn および Mg 蓄積の増加が報告されている。*FRD3* はクエン酸を導管内に分泌する輸送体であり、導管内のクエン酸濃度を高めることにより、鉄-クエン酸錯体の形成を介して鉄 (Fe) の地上部への導管内輸送を促進している。*FRD3* 欠損株における複数金属の蓄積は、地上部の Fe 含量低下によって根で活性化される Fe 吸収・輸送機構の副次的な影響であると報告されている。複数金属に対する蓄積能が高いミヤコグサ B-129 においても MG-20 に比べて根の Fe 含量が高く、地上部で少なくなっていることから、*FRD3* 欠損シロイヌナズナと類似な地上部への Fe 輸送機能の低下が原因となっていると予測された。しかしながら一方で蓄積される元素が異なるなどの現象から、個別の金属輸

送機能が独立して、あるいは一部相互作用しながらも系統間で異なる制御を受けているという可能性も考えられた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では放射線を用いた多核種同時イメージング装置である GREI (Gamma-Ray Emission Imaging) による植物元素動態解析手法の確立を一つの目的とした。GREI は理化学研究所により開発されたガンマ線を可視化するためのコンプトンカメラの一種であり、マウスを対象とした薬理学的な多核種の局在解析に実績があるが、植物を対象とした元素挙動の解析に用いられた例は少ない。

(2) ミヤコグサ B-129 で認められる複数金属元素の集積機構を制御しているメカニズム、特に情報伝達機構の解析をもう一つの主眼とした。個々の金属の吸収や輸送に関わる遺伝子の発現を制御していると考えられる栄養吸収に関するシグナル伝達経路について、植物ホルモンの役割に着目した解析を行い、複数元素の蓄積能を向上させつつも体内の恒常性を維持するために必要となるメカニズムの一端を明らかにすることが目的である。シロイヌナズナでの研究事例に基づいて推測しているように Fe の吸収機構の制御が関与するのであれば、先行研究で示唆されている Fe 欠乏応答における植物ホルモンの役割についても検証を行う。

3. 研究の方法

GREI 装置の植物元素動態解析手法への応用

(1) 模擬試料および植物体試料を用いた定量性の確認

GREI 装置の検出限界ならびに定量性を確認するために、核種ごとに模擬試料を用意してその撮影を行った。対象核種としては、ミヤコグサ B-129 と MG-20 で蓄積や輸送活性に差が認められる元素で、かつ購入による入手が可能である Fe-59、Zn-65、Cs-137 を主に用いた。また Cs-137 の挙動に相関があると考えられるカリウム (K) の放射性同位元素である K-43 について、「新学術領域研究短寿命 RI 供給プラットフォーム」からの供給を受けて撮像実験を行った。また植物体を用いた検証実験として、模擬試料での撮像が可能であった核種について、単独ならびに複数の核種を根から吸収させてリアルタイムイメージング実験を行った。特に動態解析手法の確立という観点から、植物体の構造が単純で個体サイズを装置の解像度に比して十分に大きくすることが可能なイネや、木本植物のモデルであるポプラも一部併用することとした。撮影終了後の各植物は組織別に分けてゲルマニウム半導体検出器を用いた含有量ならびに濃度の定量を行い、イメージングにより得られた数値との整合性についてデータを収集した。

(2) 基準核種との比較による元素動態標準化手法の確立

複数核種同時イメージングが可能である GREI 装置の特徴を活かして、2-5 種類の核種を同時に植物に投与し、その動態イメージングを行った。先行研究から多量必須元素とされる窒素、リン、カリウムにおいては、ミヤコグサの系統間における元素蓄積の傾向に変化がないことが示唆されていたので、Fe-59、Zn-65 については K と挙動に相関性があるとされる Cs-137 をその基準核種とした。部位ごとの Cs-137 含量に対する対象核種の含量、あるいは Cs-137 の輸送速度に対する対象核種の輸送速度などを求め、各核種のデータから個別に移動速度などを求めた場合に比べ、試料間の個体差が減少するかどうかを検証した。

ミヤコグサにおける複数金属元素集積機構の解明

(3) Fe 欠乏および過剰環境で栽培したミヤコグサを用いた Fe-59、Zn-65、Cs-137 の局在解析

B-129 と MG-20 を播種し、発芽後 2 週目から 1/10 Hoagland's 水耕液 (対照区)、Fe 濃度を 1/10 とした水耕液 (鉄欠乏区)、Fe 濃度を 10 倍とした水耕液 (鉄過剰区) での栽培を 4 週目まで計 3 週間行った。その後各 20 kBq の Fe-59、Zn-65、Cs-137 を添加した水耕液に植物を移植し、48 時間経根吸収によるトレーサー実験を行った。ゲルマニウム半導体検出器による定量後に、乾燥重量を測定した。

(4) Fe および Zn 輸送関連遺伝子の発現解析

シロイヌナズナを用いた研究結果では、複数金属元素の同時蓄積には植物の Fe 欠乏応答が関与することが明らかになっていることから、ミヤコグサ B-129 と MG-20 においても Fe および Zn 輸送関連遺伝子の発現に差異が認められるかを検証した。(3) と同様に 4 週間栽培した植物から抽出した RNA を用いて定量 RT-PCR による解析を行った。

(5) 大気 Micro-PIXE 法による元素局在解析

(3) と同様に 4 週間栽培したミヤコグサを用い、各個体の根から中間部と根端側の部位をサンプリングした。新鮮な状態で凍結切片用のコンパウンドに浸潤・包埋し、サンプルが崩壊しないよう緩やかに凍結した後、クライオミクロトームにより 20 μm 厚の輪切り切片を作製した。それぞれの切片をポリカーボネートフィルム上に設置し、量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所に設置されているシングルエンド加速器から 3 MeV の H^+ ビームを照射することにより、対象元素から放出される特性 X 線を位置情報と併せて測定した。

4. 研究成果

(1) GREI (Gamma-Ray Emission Imaging) 装

置による撮像については、まずカメラ先端から一定距離における 2 次元平面を対象とした撮影データの蓄積を行った。これにより、撮像する平面内における線源の位置や核種の違い、複数核種の共存に起因する放射線強度の差を補正した画像再構成手法の確立が必要であることが判明した。そのため、線源の位置に依存する放射線強度の差異については補正式を導入した。実際に植物体を用いた複数核種同時イメージングとしては、Na-22、K-42、K-43、Fe-59、Zn-65、Cd-109、Cs-137 について単独、あるいは組み合わせによる撮像を行い、可視化に成功した。図 1 にミヤコグサ (MG-20) の根から吸収された Zn-65 と Cs-137 の分布図を示す。投与から 48 時間後の植物体を用いてそれぞれの核種の局在部位を同時撮像した結果であり、撮像時のミヤコグサの写真を重ねて表示している。左の図では中央右側の根端部位に Zn-65 の蓄積が認められるが、右図の Cs-137 ではそのような局在は確認できなかった。また、リアルタイム撮像後に部位ごとに切断して各核種の含有量を計測した結果とも良好な相関関係を得た。

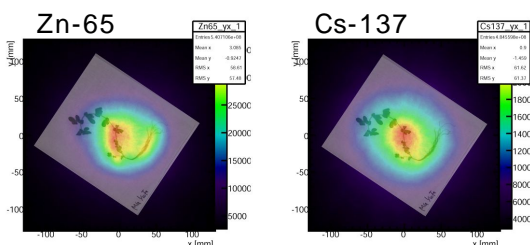


図 1 ミヤコグサ MG-20 系統における経根吸収された Zn-65 と Cs-137 の局在 カラーバーは放射線強度を示す

GREI による撮像試験には主にミヤコグサを用い、Fe-59、Zn-65、Cs-137 を根から同時吸収させた場合のリアルタイムイメージング実験を行った。根と地上部に含まれる Fe-59 および Zn-65 量を Cs-137 量で除すことで Fe-59 と Zn-65 の相対的な吸収および移動速度を標準化する手法を検討したが、各核種の独立したデータから個別に移動速度などを求めた場合に比べ、標準偏差を指標とした場合の個体差の減少にはつながらなかった。しかしながら同一処理区内での明確な生育不良個体などの判別には有効であると考えられたため、今後の更なる手法の改善と検証により、より効果的な活用方法を見出せるものと期待される。

(2) ミヤコグサ B-129 と MG-20 における複数元素の集積・輸送能の差異についての解析については、研究代表者によるこれまでの先行研究において B-129 と MG-20 の組換え自殖系統を用いた QTL 解析や、マイクロアレイによる各系統の網羅的遺伝子発現解析を行ってきた。これらの解析結果から、根圏から 2 個

Fe イオンを吸収する輸送体である IRT1 の発現が B-129 において恒常的に高いことや、B-129の地上部に Zn が蓄積されるという現象の原因遺伝子があると推定されるゲノム領域に、Zn ではなく Fe を根から地上部へと輸送するために必要とされる遺伝子が複数存在していたことなどから、ミヤコグサ B-129 においてもシロイヌナズナ *FRD3* 変異体と同様に地上部の Fe 欠乏が誘導する複数金属の蓄積機構が働いているものと予測していた。そこで Fe 過剰環境で栽培することで植物体内に蓄積された Fe 量を増加させ、その含量に応答した金属蓄積活性の変化が認められるかの検証を行った。

発芽後 1 週間経過したミヤコグサを、Fe 欠乏および過剰とした 1/10Hoagland's 水耕液で 3 週間栽培した後、Cs-137、Zn-65、Fe-59 を経根投与し、48 時間後の地上部および根における各核種の濃度を計測した(図 2)。これまでに明らかになっているように B-129 の地上部には MG-20 に比べて約 3 倍の Zn が蓄積されており、一方で Fe に関しては MG-20 に比べて極端に輸送が抑制されていることが示された。また B-129 におけるこれらの輸送活性には栽培中の Fe 環境がほとんど影響しないことも明らかになった。MG-20 では Fe 欠乏処理を施した植物の地上部において Fe 濃度が上昇していることから、欠乏処理に応答した地上部組織への Fe 輸送の活性化が起こる処理であると認められ、この栽培環境に応答しないのは B-129 に特徴的な現象であることが示唆される。研究代表者による先行研究から、B-129 を Zn の欠乏、過剰条件で栽培すると、環境に応答して Zn の長距離輸送に関与する遺伝子の発現制御を介して体内 Zn 挙

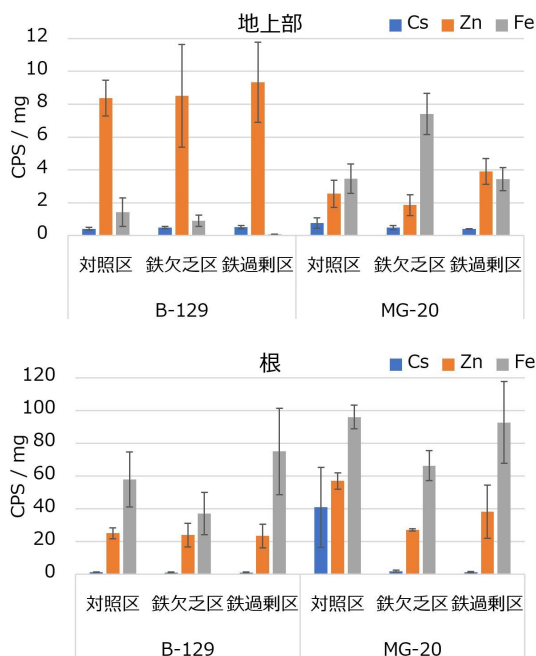


図 2 Fe 欠乏および過剰環境下で栽培したミヤコグサの地上部・根組織における Cs-137、Zn-65、Fe-59 の濃度

動が変化することが明らかになっており、Fe と Zn それぞれに独立した制御系が存在しているものと考えられる。一方根においては Zn-65、Fe-59 において両系統間で特徴的な差異は認められず、Fe 欠乏処理区において両系統に共通して Fe 濃度の減少傾向が認められた。根において最も特徴的な濃度変化を示したのは MG-20 における Cs-137 濃度の変化である。Fe の欠乏および過剰の両処理区において、Cs-137 の濃度が大きく減少していた。処理区間での栽培環境の違いは水耕液に含まれる Fe 濃度のみであることから、K の栄養状態に依存して輸送活性が変化すると考えられている Cs-137 に濃度の変化が現れることは予想しておらず、生育環境 Fe 濃度が Cs-137 の濃度に、おそらくは K 輸送系の活性制御を介して影響を与えることを示す新たな知見となった。また、MG-20 の Fe 欠乏および過剰の両処理区の根に含まれている Cs-137 の濃度は B-129 における対象区を含むすべての処理区と同等の濃度を示しており、ストレス環境下に置かれていない MG-20 の根は Cs-137 について高い集積能を持つ可能性を示している。

(3) 以上の結果から、これらの系統では水耕液から吸収した鉄を、根から地上部へ輸送するための Fe および Zn 輸送活性に系統間差があることが示唆される。B-129 において極端に地上部への輸送量が抑制されている Fe について、それぞれの系統の根においてどのような部位に蓄積しているかを明らかにするために、大気 Micro-PIXE 法による Fe の局在解析を行ったところ、両系統の根の中間部位において特徴的な Fe の局在が認められた。局在部位を特定するために、組織の形態を明瞭にとらえることができる K の画像と比較したところ、Fe が蓄積する部位は根の中心柱にある維管束組織に該当することが明らかとなった(図 3)。特に B-129 ではこの蓄積が顕著であったことから、MG-20 と比較して B-129 では導管を介した Fe の地上部への輸送が初期の段階で抑制されていることが示唆された。導管への Fe の積み込みや導管内での Fe 輸送機構に関連する機能の系統間差を分子生物学的に検証することで、ミヤコグサにおける Fe 輸送機構の一端が明らかになるものと考えられる。

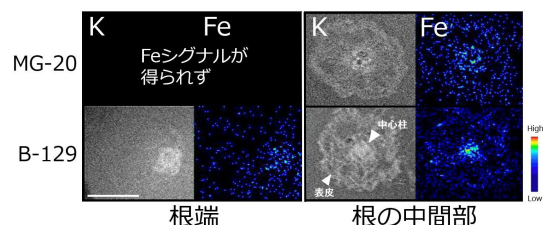


図 3 ミヤコグサ根端および根の中間部における K と Fe の局在 カラーバーは放射線強度を示す スケールバーは 200 μm

(4) GREI および大気 Micro-PIXE 法を用いて検証を進めたミヤコグサ B-129 の複数元素蓄積能について、シロイヌナズナで報告されていた Fe 輸送機能の欠損という単一の機能の差異に起因するものではなく、各金属元素の輸送・蓄積に関与する機構の系統間差が独立して作用した結果であることが示唆された。ミヤコグサの植物ホルモン含量について、処理区ごとの変動を B-129、MG-20 の地上部、根の組織別に定量したところ、栄養環境の違いに応答した植物ホルモン含量の変化は認められるものの、これまでの先行研究で検証されている Fe 欠乏処理などの結果に合致する場合としない場合があることから、種間あるいは系統間でのより詳細な検証が必要であることが明らかとなった。

このようにミヤコグサにおいては Fe あるいは植物ホルモンを介した統一的な制御系を示唆する結果が得られなかったことから、根圏から根の細胞内へ金属元素を吸収する、あるいは維管束を介して根から地上部へ輸送するといった個々の金属輸送過程における系統間差について解析を進めたところ、特に、成熟根を対象とした Fe の局在解析から、B-129 の維管束周辺における Fe 輸送の停滞が地上部への Fe 輸送が抑制されている一因であることを示す結果が得られた。今後は他の金属元素についても特徴的な挙動の原因となる部位や輸送過程を同定し、各過程に關与するメカニズムの解明が必要であると考えらる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

H.Rai, S.Yokoyama, N.Satoh-Nagasawa, J.Furukawa, T.Nomi, Y.Ito, S.Fujimura, H.Takahashi, R.Suzuki, E.Yousra, A.Goto, S.Fuji, S.Nakamura, T.Shinano, N.Nagasawa, H.Wabiko, H.Hattori, Caesium uptake by rice roots largely depends upon a single gene, *HAK1*, which encodes a potassium transporter. *Plant and Cell Physiology*, Vol. 58, 9, 1486 - 1493, 2017, doi: 10.1093/pcp/pcx094 (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

J. Furukawa, Y. Noda, N. Nihei, A. Hirose, K. Tanoi, S. Satoh, Novel function of potassium and cesium channel, SKOR, involved in dormancy-induced nutrient re-allocation in poplar, XVIII International Plant Nutrition Colloquium, 2017

頼 泰樹、横山 咲、佐藤 奈美子、古川 純、能美 多希子、伊藤 那香、森田 祥司、藤村 恵人、後藤 明俊、信濃 卓郎、永澤 信洋、我彦 廣悦、中村 進一、服部 浩之、セシウム低吸収水稻の Cs/K 吸収特性と現地

試験結果、日本土壤肥料学会、2017 年

古川 純、植物 RI イメージング 空と大地と植物と、理化学研究所・生命機能科学研究センター エンジニアリング・ネットワーク公募型課題ワークショップ、2017 年

野田 祐作、RI イメージングから樹木内セシウム動態制御機構を探る、第3回農学中部の会、2017 年

〔その他〕

(1)アウトリーチ活動

佐藤 忍、古川 純、植物の根と導管液、つくば科学フェスティバル、2017 年 11 月 18-19 日、つくばカピオ(茨城県つくば市)

佐藤 忍、古川 純、植物の根と導管液、国際植物の日、2017 年 5 月 20 日、筑波大学(茨城県・つくば市)

佐藤 忍、古川 純、植物の根と導管液、つくば科学フェスティバル、2016 年 11 月 12-13 日、つくばカピオ(茨城県つくば市)

佐藤 忍、古川 純、植物の根と導管液、国際植物の日、2016 年 5 月 22 日、筑波大学(茨城県・つくば市)

(2)ホームページ等

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~plphys/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

古川 純(FURUKAWA, Jun)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：40451687

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

野田 祐作(NODA, Yusaku)