

[H30-3]

マメ科植物における複数金属元素蓄積機構の解明 Identification of Multi-element Accumulation Mechanisms in Legume

古川純^{#A)}, 大内実樹^{A)}, 鈴木伸郎^{B)}, 尹永根^{B)}, 栗田圭輔^{B)}, 河地有木^{B)}, 佐藤隆博^{B)},
Jun Furukawa^{#A)}, Mizuki Ouchi^{A)}, Nobuo Suzui^{B)}, Yong-Gen Yin^{B)}, Keisuke Kurita^{B)},
Naoki Kawachi^{B)}, Takahiro Satoh^{B)}

^{A)} Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

^{B)} Takasaki Advanced Radiation Research Institute,
National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

Abstract

In the comparison of two cultivars of *Lotus japonicus*, MG-20 and B-129, it was shown that B-129 had a low activity of iron transport from root to shoot. To clarify the difference of iron transfer mechanism, atmospheric Micro-PIXE analysis was carried out using their root tissues. The iron accumulation was well observed at the root surface and around the vascular bundle tissue in B-129. The vascular specific localization patterns suggested the iron transport was suppressed at the steps of xylem loading of iron. To confirm the involvement of this deficit of Fe homeostasis in the multi-element accumulation observed in B-129, Zn behavior was investigated using PETIS system. The plants treated with low Fe concentration showed high Zn uptake and high Fe concentration induced the suppression of Zn uptake in B-129. These results suggest Fe condition in the plant body regulates Zn uptake in *Lotus japonicus*, B-129.

Keyword: *Lotus japonicus*, Micro-PIXE, PETIS, iron homeostasis, zinc uptake

1. はじめに

植物の生育には、窒素、リン、カリウムのように多量に必要とされる養分に加えて、ホウ素、カルシウム、マンガン、鉄、亜鉛などといった微量要求性の元素が必要である。これら微量元素の生理的な役割を明らかにするためには、植物の根や葉といった組織ごとの蓄積量のみならず、その組織内におけるより詳細な局在部位を知ることが重要である。特に栄養環境に応答した元素局在の変化は、元素の欠乏や過剰といった現象が植物体のどのような組織・部位で問題となっているのかを解明する上で非常に重要な知見となる。放射線を利用した元素イメージング手法である大気 Micro-PIXE (Particle Induced X-ray Emission) 法は、複数元素の同時定量が可能であり、かつ高解像度な元素分布像が得られることから、これらの情報を取得するために極めて有効な手法である^[1,2]。また元素の欠乏や過剰といった現象が引き起こす植物の代表的な応答反応として、根圏における元素吸収過程、あるいは根から各組織への輸送機構の活性化や抑制といった元素動態の変化が挙げられる。そこで、植物体における元素動態の解析手法としてこれまでに数多くの実績を有する PETIS (Positron Emitting Tracer Imaging System) 法による実験も行うこととした^[3]。本課題ではマメ科のモデル植物であるミヤコグサが有している金属蓄積能の系統間差に着目し、Micro-PIXE 法による鉄の局在解析と PETIS 法による亜鉛の動態解析を行ったのでそれらの成果について報告する。

2. 実験

実験にはマメ科のモデル植物であるミヤコグサ

(*Lotus japonicus*) を用いた。複数金属の蓄積能に差が認められる Gifu B-129 系統 (以下 B-129) と Miyakojima MG-20 系統 (同 MG-20) の 2 系統を播種し、発芽後 4 週間 1/10 Hoagland's 水耕液で栽培した。Micro-PIXE 用のサンプルとして、各個体の根から中間部をサンプリングし、新鮮な状態で凍結切片用のコンパウンドに浸潤・包埋した。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、3 MeV の H⁺ビームを照射して、対象元素から放出される特性 X 線を測定した。PETIS による亜鉛動態の解析には、鉄栄養条件を栽培水溶液の 1/10、あるいは 10 倍に変化させて 4 日間処理した植物体を準備し、亜鉛 (Zn-65) の吸収とその後の輸送について 48 時間の測定を行った。

3. 結果と考察

ミヤコグサの地上部と根の元素濃度を ICP-AES を用いて測定した先行研究から、B-129 は MG-20 よりも根における鉄濃度が高く、またマンガン、ニッケル、銅、亜鉛の濃度が全身で高いことが示されていた。一方、地上部においては MG-20 の鉄濃度が高いことから、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鉄輸送活性に系統間差があることが示唆されている。それぞれの系統の根においてどのような部位に鉄が蓄積しているかを明らかにするために大気 Micro-PIXE 法による鉄の局在解析を行ったところ、特に B-129 の根において表皮と維管束周辺に鉄が蓄積していることが示された。このことから、B-129 では根における細胞内への取り込みと導管を介した鉄の地上部への輸送

[H30-3]

過程がそれぞれ抑制されていることが示唆された。シロイヌナズナにおいて、地上部への鉄輸送が抑制された変異体では鉄以外の金属元素の吸収量と地上部への輸送量が増加することが報告されている [4, 5]。地上部の鉄欠乏が根において鉄の吸収機構を活性化させ、その副次的な効果として鉄以外の元素についても吸収量が増加したものと考えられている。我々はミヤコグサにおける複数元素の高蓄積も同様の機構によるものであると予想し、鉄栄養条件を変化させたミヤコグサを用いて亜鉛 (Zn-65) の動態解析を行った。

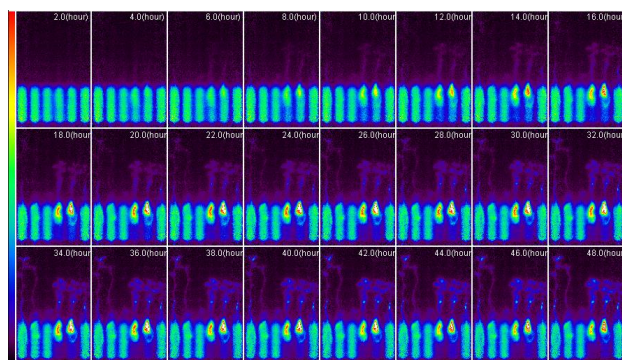


Figure 1. Real-time Zn localization images obtained by PETIS. Six sets of plant and treatment solution are observed in each frame and the samples are MG-20s (Control, 1/10 Fe, 10× Fe) to B-129s (Control, 1/10 Fe, 10× Fe) from left to right.

その結果、B-129 において鉄欠乏による亜鉛の吸収促進と、鉄過剰による亜鉛の吸収抑制が観察された (Figure 1)。鉄条件の変更により一切の変化を与えていない亜鉛吸収が制御されたことから、シロイヌナズナ同様にミヤコグサの複数元素集積機構にも鉄の恒常性が関与している可能性が示された。また MG-20 では亜鉛吸収に大きな変化が認められなかったことから、この機構は MG-20 よりも B-129 において活発に制御されているものと考えられる。

今後は、同様に鉄条件を変えて栽培した B-129 を用いて Fe-59 による鉄のトレーサー実験を行うことで鉄の挙動・分布が異なる組織を特定し、地上部を含めた更なる Micro-PIXE 解析を実施する部位の候補を得る。これによりどのような部位の元素局在の変化が環境応答のトリガーとなるのかについて知見が得られることを期待している。

参考文献

- [1] T.Yamamoto, et al., "Development of Method for Plant Material Analysis by Micro-PIXE (Particle Induced X-ray Emission)" JAEA Takasaki Annual Report 2012, 94, 2014
- [2] T. Yamamoto et al., "Development of Method for Plant Material Analysis by Micro-PIXE (Particle Induced X-ray Emission)" JAEA Takasaki Annual Report 2013, 97, 2015

- [3] <https://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13007-017-0188-0>
- [4] <http://www.plantphysiol.org/content/111/3/849>
- [5] <http://www.plantphysiol.org/content/144/1/197>

[H30-3]

Vigna 属耐塩性野生種のスナトリウム吸収に関するイメージング解析 Visualizing Sodium Localization in Salt-tolerant Species of the Genus *Vigna*

内藤健^{#A)}, 野田祐作^{A)}, 古川純^{B)}, 鈴木伸郎^{C)}, 尹永根^{C)}, 河地有木^{C)},
Ken Naito^{#A)}, Yusaku Noda^{A)}, Jun Furukawa^{B)}, Nobuo Suzui^{C)}, Yong-Gen Yin^{C)}, Naoki Kawachi^{C)}

^{A)} Genetic Resources Center, National Agriculture and Food Research Organization

^{B)} Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

^{C)} Takasaki Advanced Radiation Research Institute,
National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

Abstract

Genus *Vigna* is a reservoir of diversity and have several species adapted to coastal environment. These salt-tolerant species have independently evolved salt tolerance. To elucidate the mechanisms of their salt tolerance, we visualized sodium localization in the plant body and identified each species has its own mechanism. Together with genomic and genetic studies we have done, the results will facilitate identification of salt tolerance genes.

Keyword: *Vigna*, salt tolerance, adaptation

1. はじめに

農地の塩害は深刻な問題であり、その対策には植物がもつ耐塩性機構の解明と応用が必須である。特に *Vigna* 属の野生種には海浜に適応したものが複数あり、それらは独立に進化したことが明らかとなっている。しかし、これらの野生種が獲得した耐塩性機構については、詳しいことはほとんど分かっていなかった。そこで、本研究では ²²Na と RI イメージングの技術を駆使し、塩ストレス条件下で Na⁺ が植物体のどの部位に蓄積されるか、また排出されるとしたらどの部位からかを明らかにした。

2. 材料と方法

材料には耐塩性に優れる *V. marina*, *V. luteola*, *V. trilobata*, *V. riukiensis*, *V. nakashimae* の 5 種を用いた。栽培条件は水耕で、発芽 2 週間後から 50 mM NaCl を 3 日間処理して順化させ、²²Na を含む 100 mM NaCl を 24 時間処理し、BAS 法で画像化した。

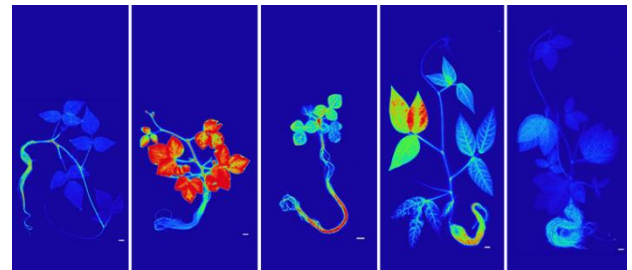
また、*V. marina* については PETIS^[1]によるリアルタイムイメージング解析を行った。上記と同じ条件で植物体を栽培して ²²Na を取り込ませ、根を洗浄した上で ²²Na を含まない 100 mM NaCl 条件に移し、72 時間にわたって撮像を行った。

3. 結果と考察

まず、植物体の Na⁺ 吸収量および蓄積様式は種ごとに全く異なることが明らかとなった (Figure 1)。*V. nakashimae* は根・茎に Na⁺ を蓄積する一方、葉にはほとんど蓄積しなかった。対して、*V. riukiensis* は多量の Na⁺ を吸収し、そのほとんどを葉に蓄積した。*V. trilobata* は全二者の中間的な Na⁺ 蓄積パターンを示し、*V. luteola* は根および最上位完全展開葉にのみ選択的に Na⁺ を蓄積した。また、*Vigna* 属の中でも最も耐塩性に優れる *V. marina* は、ほとんど Na⁺ を吸収しなかった。

これらの結果は、種ごとに独立に生じた耐塩性進

化において、互いに全く異なるメカニズムを獲得したことを示している。*V. riukiensis* の葉において、Na⁺ は液胞に隔離されると考えられたが、実際には葉緑体に局在することが明らかとなった。これまでの定説とは全く異なる未知の耐塩性機構だと考えられた。一方、*V. luteola* の選択的な Na⁺ 局在については今後の詳細な解析が待たれる。また、*V. marina* については根から Na⁺ を排出している可能性が考えら



れた。

Figure 1. Na⁺ localization in the salt tolerant species of the genus *Vigna*. From left: *V. nakashimae*, *V. riukiensis*, *V. trilobata*, *V. luteola*, and *V. marina*.

V. marina の根における Na⁺ 排出の様子を捉えるために、PETIS によるリアルタイムイメージング解析を行った。その結果、水耕液中の放射線量が増加する一方、根の放射線量は現象したため、根から Na⁺ が排出されることは明らかとなった (Figure 2)。また、興味深いことに、Na⁺ 排出は明期にのみ観察され、暗期には停止することも明らかとなった。したがって、ハマササゲの Na 排出機構は日周性を持つことが明らかとなった (Figure 3)。夜間に Na⁺ 排出を停止することには、エネルギーの浪費を抑える効果があると考えられる。さらに別の実験から、Na⁺ は根の基部から排出されることも明らかとなった。

[H30-3]

以上により、本研究では *Vigna* 属の耐塩性機構が種ごとに全く異なること、そして特に優れた *V. marina* の耐塩性には、根からの Na^+ 排出能が寄与していること、さらにその Na^+ 排出には日周期性があることが明らかとなった。

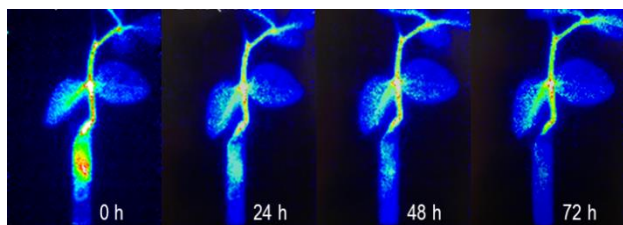


Figure 2. Real-time imaging by PETIS on Na^+ extrusion from the root of *V. marina*.

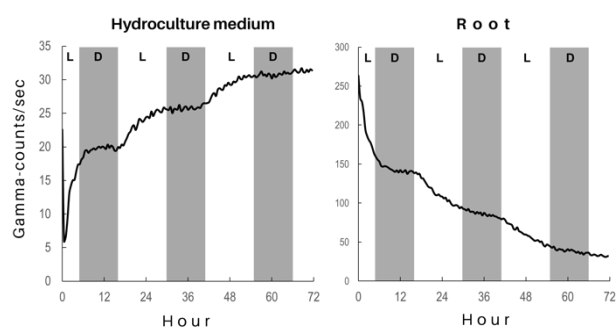


Figure 3. Gamma-counts/sec in hydroponic culture media and the root of *V. marina* during the PETIS real-time imaging.

参考文献

- [1] <https://academic.oup.com/pcp/article/56/5/943/1820482>

[H30-3]

ダイズ根系内のセシウム輸送挙動の解明 Elucidation of Cesium Transport Behavior in Soybean Root System

井倉将人^{#,A)}, 佐藤隆博^{B)},
Masato Igura^{#,A)}, Takahiro Satoh^{B)}

^{A)} Institute for Agro-Environmental Science, National Agriculture and Food Research Organization

^{B)} Takasaki Advanced Radiation Research Institute,
National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

Abstract

The distribution of stable cesium in soybean roots and root nodules was analyzed by PIXE analysis to clarify the cesium uptake behavior by soybean root system. Stable cesium was significantly distributed in soybean root nodules. The cesium concentration in root nodules was about twice that of roots, and it is necessary to clarify the role of root nodules in cesium uptake by soybean.

Keyword: soybean, root nodule, cesium

1. はじめに

ダイズはセシウム吸収量の高い作物として知られており、元素吸収において根粒等の共生菌の関与が示唆されている。ダイズ根系におけるセシウムおよび共存元素吸収機構を解明することは、ダイズのセシウム移行低減技術の開発に不可欠である。本研究では、ダイズの根系における根および根粒内部の元素局在を明らかにし、根系内の蓄積部位と地上部への輸送経路の解明から効率的なダイズのセシウム移行低減手法の開発を目指す。

2. 材料と方法

ダイズ(エンレイ)に根粒菌(*Bradyrhizobium japonicum*)を接種し、水耕栽培により約1ヶ月栽培したダイズ根系から100 μ Mの安定同位体セシウム(Cs-133)を吸収させ、セシウム吸収における根および根粒内部の安定同位体セシウムおよびカリウム分布についてPIXE分析を行った。

Cs-133を添加した水溶液内で24時間栽培し、その後、ダイズ根および根粒を採取した。採取したサンプルの凍結ブロックを作成し、クライオスタットを用いて根および根粒の凍結切片(厚さ50 μ m)を作成した。粒子励起X線放射分析によりダイズ根および根粒組織内の非破壊的な元素分布解析を実施した。また、採取した試料の一部はICP-MSによりCs-133濃度の定量を行った。

3. 結果と考察

根および根粒組織の安定同位体セシウムおよびカリウム分布を図1に示す。根内部の組織内ではカリウムがほぼ均一に分布しているのに対し、セシウムは全体にわずかに分布するとともに、中央の維管束付近に局在が確認された。

一方、根粒内部ではカリウムは外皮部分に局在する傾向が見られたが、セシウムは内部まで均一に分布し、外皮および内皮に差は見られなかった。根と比較して根粒組織ではセシウムの明瞭な分布が確認

され、根粒内部へのセシウム蓄積が生じていると考えられた。

水耕液中の安定セシウム濃度に対する根および根粒の安定セシウム濃度変動を図2に示す。水耕液中の安定セシウム濃度の増加にともない、根および根粒の濃度は増加し、根粒のセシウム濃度は根の1.5~2倍程度であった。

本研究による解析から、ダイズ根粒内部へのセシウムの蓄積が確認され、今後は根粒内に蓄積されたセシウムの挙動を明らかにし、ダイズ地上部へのセシウム吸収における根粒の影響を評価する。

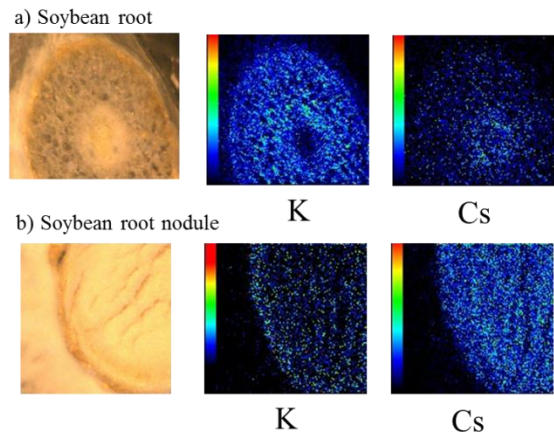


Figure.1 Stable potassium and cesium distribution for soybean root and root nodule

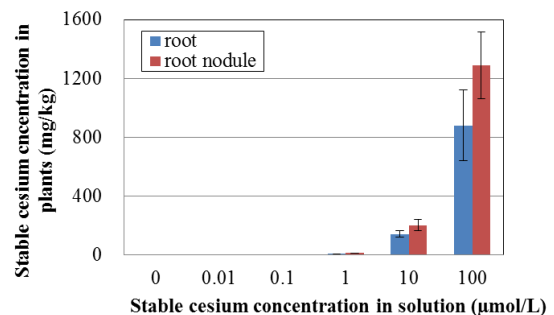


Figure.2 Stable cesium accumulation in soybean root and root nodule