

[R3-2]

リアルタイムイメージングと細胞レベルでの局在解析を 相互補完した植物元素動態解析

1. マメ科植物における複数金属元素蓄積機構の解明

Research of Plant Mineral Behavior Complemented by Real-time Imaging and Sub-cellular Localization Analysis 1. Identification of Multi-element Accumulation Mechanisms in Legume

古川純^{#,A,B)}, 鈴木伸郎^{C)}, 尹永根^{C)}, 江夏昌志^{C)},
山田尚人^{C)}, 山縣諒平^{C)}, 河地有木^{C)}, 佐藤隆博^{C)}
Jun Furukawa^{#,A,B)}, Nobuo Suzui^{C)}, Yong-Gen Yin^{C)}, Masashi Koka^{C)},
Naoto Yamada^{C)}, Ryohei Yamagata^{C)}, Naoki Kawachi^{C)}, Takahiro Satoh^{C)}

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

^{B)} Center for Research in Isotopes and Environmental Dynamics, University of Tsukuba

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

Abstract

In the comparison of two cultivars of *Lotus japonicus*, MG-20 and B-129, sodium, manganese, nickel, copper, and zinc were highly accumulated both in shoot and root in B-129 and it was also suggested that B-129 had low activity of iron translocation from root to shoot. In *Arabidopsis thaliana*, it was reported that iron deficiency in the shoot part induced multi-element accumulation in the shoot and root, therefore, we assumed that a similar mineral accumulation might occur in *L. japonicus*. To clarify the sensing mechanisms for keeping the iron homeostasis, the plants treated with high or low iron concentrations for 3 weeks were subjected to atmospheric Micro-PIXE analysis using their shoot part. Under normal and high Fe concentration conditions, the iron was localized outside the vascular bundle tissue in the MG-20 stem. On the other hand, under the low iron condition, the vascular-specific iron localization was observed, suggesting the suppressed distribution of iron outside the vascular bundle tissue. Recently, iron deficiency-related small peptide, FEP/IMA was identified and its transfer from shoot to root might be involved in the signal transduction in iron homeostasis. FEP/IMA expression was observed around the vascular bundle in the shoot suggests the change of iron localization there might be involved the FEP/IMA induction. To identify the relationship between them, the further experiment is needed.

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

1. はじめに

植物の生育に必要な必須元素には、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、マンガン、鉄、亜鉛、銅などといった微量要求性の栄養素が必要である。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、かつミクロンレベルでの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^[1,2,3]。

また、栄養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、本研究課題では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^[3,4]による実験も組み合わせることを目的としている。本年度はマメ科のモデル植物であるミヤコグサが有している複数の金属元素に対する蓄積能の系統間差に着目し、Micro-PIXE 法による鉄の局在解析を行ったのでそれらの成果について報告する。

2. 実験手法

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 培地を基本組成とする水耕栽培を行った。水耕液は 2、3 日ごとに交換し、水耕液中の栄養塩の濃度変化が植物に与える影響を最小限にとどめた。我々はこれまでの研究から、ミヤコグサを同条件で栽培した場合、B-129 の地上

[R3-2]

部・根においてナトリウム、マンガン、ニッケル、銅、亜鉛の濃度が MG-20 よりも高く、また鉄においては B-129 の根で濃度が高いにも関わらず、地上部では MG-20 の方が高濃度であることを明らかにしている。本年度は地上部における元素局在に着目し、Micro-PIXE 用のサンプルとして、各個体の茎をサンプリングした。新鮮な状態で凍結切片作成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、クライオミクロトームにより 20-100 μm 厚の輪切り切片と縦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。

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により、B-129 は MG-20 よりも根における鉄濃度が高く、地上部においては逆に MG-20 の鉄濃度が高くなっていることから、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 の根において維管束周辺に鉄が蓄積していることが示された。このため、B-129 では根の維管束周辺の細胞から導管内へと鉄を輸送する活性に MG-20 との系統間差があることで、地上部への鉄輸送が抑制されていることが示唆された。

双子葉植物のモデル植物であるシロイヌナズナでは、地上部への鉄輸送活性が抑制された変異体において、鉄以外の複数の金属元素の吸収量が増加することが報告されている^[5,6]。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、地上部における鉄欠乏がどのように認識されているかを検証するために、標準区、鉄欠乏区、鉄過剰区の鉄栄養状態の異なる 3 種類の処理区でミヤコグサを栽培し、地上部、特に茎における鉄局在解析を行った。

対照区となる培養条件である鉄濃度 2.0 μM に比べ、鉄欠乏ならびに鉄過剰の条件をそれぞれ 0.2 μM 、20 μM とし、3 週間継続して栽培したところ、鉄欠乏区においては維管束組織を含めた茎全般において鉄のシグナルが認められるが、標準区ならびに鉄過剰区では維管束組織(緑円)に存在する鉄量が減少し、維管束周辺の組織に鉄が蓄積していく傾向が認めら

れた (Figure 1)。

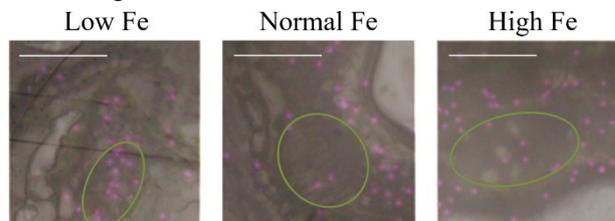


Figure 1. Iron localization images in MG-20 stem obtained by Micro-PIXE. The Fe signal (magenta) is superimposed on the optical microscope image. Bars indicate 100 μm . The part corresponding to the vascular bundle is indicated by a green circle. Plant samples are cultivated under normal, low, and high Fe conditions for 3 weeks.

根において吸収された鉄は導管を介して輸送され、地上部において導管液から再吸収されている。鉄欠乏区の地上部では維管束周辺における鉄の存在量が減少することを示唆する局在パターンであることから、B-129 においても同様であるかより詳細に検証する必要がある。また近年、鉄欠乏シグナルの地上部組織から根への伝達には FEP/IMA と呼ばれるペプチドが関与しているとされ、これらペプチドは鉄欠乏条件において維管束周辺の細胞で発現が誘導される^[7]。葉と茎という異なる組織での解析結果の比較であるが、鉄局在も同様の部位で変化しているとすれば鉄欠乏の認識部位として興味深い。根圏の栄養環境に由来する地上部組織での元素蓄積・局在の変化は非常に重要な知見であることから、さらなる解析を継続する。

4. まとめ

植物における鉄の恒常性維持は極めて重要であることから、欠乏環境に置かれると組織レベルでの含量変化が生じるよりも早い段階から関係遺伝子の発現が誘導されることが知られている。すなわち、欠乏環境の認識には生体内での鉄局在の変化が関与していると考えられることから、本研究で示唆された維管束周辺での鉄局在の変化は栄養条件に対する応答として極めて興味深い現象である。

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://doi.org/10.3769/radioisotopes.68.643>
- [4] <https://www.mdpi.com/2412-382X/3/3/18>
- [5] <http://www.plantphysiol.org/content/111/3/849>
- [6] <http://www.plantphysiol.org/content/144/1/197>
- [7] <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy145>

2. *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

2. 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)} Department of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

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

Abstract

Vigna marina is the most salt-tolerant species in the genus *Vigna*. Our previous study indicated that *V. marina* suppresses Na^+ accumulation by excreting Na^+ out of the roots. In addition, the results suggested the Na^+ excretion from the root occurs at daytime and stops at night. However, control study is necessary to confirm that those features are characteristic to *V. marina*. Thus we studied *V. luteola*, a close relative of *V. marina*. There are two types of *V. luteola*: One lives in beach and is salt-tolerant (beach-type), and the other lives in river bank is salt-sensitive (river-type). We performed PETIS analysis on both accessions and revealed that the beach-type excreted less amount of Na^+ from the root, and does not show a clear diurnal rhythm compared to *V. marina*. The river-type did not excrete Na^+ at all. As such, the diurnal rhythm in Na^+ excretion from the root is a key characteristic of *V. marina*, which could be an important player in salt tolerance of this species.

Keyword: *Vigna marina*, *Vigna luteola*, salt tolerance

1. はじめに

アズキの仲間である *Vigna* 属は多様性を有する植物群で、その中には海岸に適応して耐塩性を獲得したものが複数種存在する[1]。

しかしながら、これらの耐塩性野生種が獲得した耐塩性機構の詳細については十分に解析されてこなかった。特に、*Vigna* 属においては複数の種が独立に耐塩性を獲得したと考えられており[1, 2, 3]、それぞれ収斂進化によって共通のメカニズムを獲得したのか、あるいは互いに異なるメカニズムを獲得したのかを明らかにすることは、学術的にも応用を展開する上でも重要である。

そこで、本研究では 4 種の耐塩性野生種 (*V. nakashimae*, *V. riukuensis*, *V. luteola* および *V. marina*) および比較対象として感受性の栽培アズキ (*V. angularis*) について、放射性 Na (^{22}Na) を使ったトレーサー実験を実施した。これにより、植物体内における Na^+ イオンの蓄積部位や蓄積量を BAS によって可視化し、耐塩性機構の共通点や相違点を明らかにすることを目指した。同時に、ICP-MS を用いて部位ごとの Na^+ および K^+ の濃度を定量し、BAS イメージングの結果を検証した。

2. 材料と方法

栽培アズキ (JP37752)、*V. nakashimae* (JP107879)、*V. riukuensis* (JP108810)、*V. luteola* (JP233389)、*V. marina* (JP235813) はいずれも農研機構遺伝資源センターから提供を受けた。植物体の栽培条件は水耕で、発芽 3 週間後に ^{22}Na を含む 100 mM NaCl の塩ストレスを 72 時間処理した。その後イメージングプレート上で押し花にして 24 時間感光させ、BAS イメージ

ングで撮像した。また、ICP-MS では ^{22}Na を含まない 100 mM NaCl の塩ストレスを 72 時間処理し、根・茎・葉を別々にサンプリングして硝酸分解の後、質量分析を実施した。

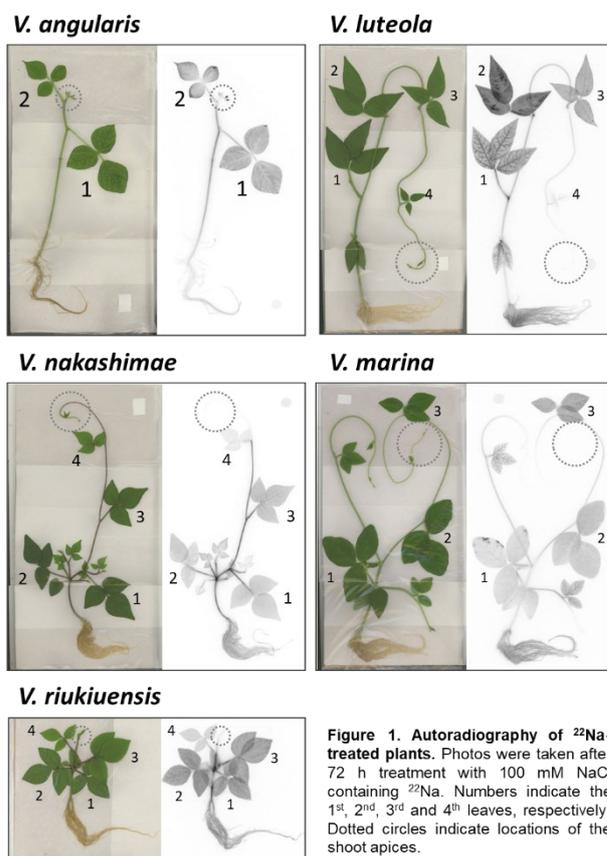


Figure 1. Autoradiography of ^{22}Na -treated plants. Photos were taken after 72 h treatment with 100 mM NaCl containing ^{22}Na . Numbers indicate the 1st, 2nd, 3rd and 4th leaves, respectively. Dotted circles indicate locations of the shoot apices.

[課題番号]R3-2

3. 結果と考察

3.1 ^{22}Na を用いたトレーサー実験

トレーサー実験の結果、全ての耐塩性系統が葉への Na^+ 蓄積を抑制することが示唆された (Figures 1, 2)。栽培アズキでは、葉での新鮮重あたりの放射線量が耐塩性種に比べて明らかに高い値を示した。一方、耐塩性種の間でも大きな違いがあり、*V. nakashimae* および *V. riukiensis* では茎により多くの Na^+ が蓄積したのに対し、*V. luteola* および *V. marina* では根により多くの Na^+ が蓄積した。したがって、耐塩性野生種の間では葉への Na^+ 流入を抑制する点は共通しているが、道管流から Na^+ を抜き取る部位が異なると考えられた。さらに、*V. marina* は *V. luteola* と比較しても葉での Na^+ 蓄積がさらに少ないことから、道管流からの Na^+ 抜き取り以外に Na^+ 吸収を抑制する機構をもつと考えられた。

3.2 質量分析による定量実験

ICP-MS による測定の結果、葉における Na^+ の蓄積量は耐塩性種で総じて低く、栽培アズキで明らかに高かった (Figure 3a)。一方、 K^+ の蓄積量には耐塩性種の間にもバリエーションがあり、*V. nakashimae* と *V. marina* で高く、*V. riukiensis* と *V. luteola* で低いことが明らかとなった (Figure 3b)。これらの値をもとに Na^+/K^+ 比を算出すると、栽培アズキ、*V. riukiensis* および *V. luteola* で高く、*V. nakashimae* および *V. marina* で低いことが明らかとなった (Figure 3c)。

したがって、*V. nakashimae* および *V. marina* は Na^+/K^+ homeostasis によって葉の Na^+ 蓄積を低く保つ一方、*V. riukiensis* および *V. luteola* ではソレ以外の未知の機構によってそれを達成していると考えられた。また、耐塩性種で Na^+ 蓄積量が低いというトレーサー実験の再現され、手法の有用性が担保された。

3.3 結論

本研究によって、*Vigna* 属野生種が独自に獲得したとされる耐塩性機構は、それぞれ異なるメカニズムによることが明らかとなった。一方、何れのメカニズムも最終的には葉への Na^+ 蓄積を抑制する方向に機能することが明らかとなった。したがって、それぞれの機構を集積することができれば、より優れた耐塩性を実現することも可能だと考えられる。

参考文献

- [1] Iseki et al., PLoS One 11: 1607 (2016)
- [2] Yoshida et al., Genetic Resources and Crop Evolution 63: 627-637 (2016)
- [3] Yoshida et al. Plant Production Science 23: 114-128 (2020)

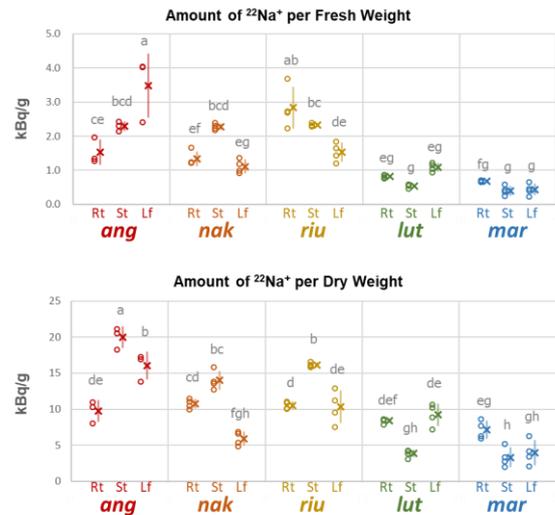


Figure 2. Amount of ^{22}Na per biomass in the roots, stems and leaves. Open circles, X and error bars indicate values of each replicate, means and standard deviations, respectively. Rt, St and Lf indicate root, stem and leaf, respectively. ang, nak, riu, lut and mar indicate *V. angularis*, *V. nakashimae*, *V. riukiensis*, *V. luteola* and *V. marina*, respectively. Means not sharing the same alphabet are significantly different (Tukey HSD $p < 0.05$)

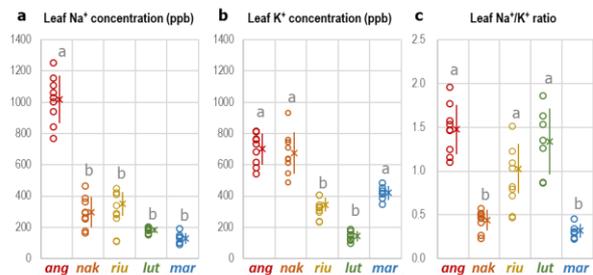


Figure 3. Concentrations of Na^+ and K^+ and Na^+/K^+ ratio in the 1st leaves of the plants. The plants were treated with 100 mM NaCl for 2 days, and then sampled for ICP-MS. Open circles, X and error bars indicate values of each replicate, means and standard deviations, respectively. Rt, St and Lf indicate root, stem and leaf, respectively. ang, nak, riu, lut and mar indicate *V. angularis*, *V. nakashimae*, *V. riukiensis*, *V. luteola* and *V. marina*, respectively. Means not sharing the same alphabet are significantly different (Tukey HSD $p < 0.05$)

[R3-2]

3. 大豆根系の放射性セシウム動態におけるカリウムの影響

3. Effect of Potassium for the Dynamics of Radioactive Cesium in Soybean Root System

井倉将人^{#,A)}, 鈴木伸郎^{B)}, 尹永根^{B)}, 三好悠太^{B)}, 榎本一之^{B)},
江夏昌志^{C)}, 山田尚人^{C)}, 山縣諒平^{C)}, 佐藤隆博^{C)}, 河地有木^{B)}
M. Igura^{#,A)}, N. Suzui^{B)}, Y.-G. Yin^{B)}, Y. Miyoshi^{B)}, K. Enomoto^{B)},
M. Koka^{C)}, N. Yamada^{C)}, R. Yamagata^{C)}, T. Satoh^{C)} and N. Kawachi^{B)}

^{A)} Institute for Agro-Environmental Science, NARO

^{B)} Department of Radiation-Applied Biology, TARRI, QST

^{C)} Department of Advanced Radiation Technology, TARRI, QST

Abstract

The localization of radioactive cesium in soybean root and nodule was investigated by positron-emitting tracer imaging system (PETIS) analysis to clarify the cesium uptake behavior in soybean root system. Radioactive cesium was significantly localized in soybean nodule, but it was confirmed that cesium uptake in root, nodule and stem was suppressed under high-concentration potassium (+K) conditions. On the other hand, radioactive cesium was also accumulated in the nodules located above the water surface and gradually increased. The micro particle induced X-ray emission (microPIXE) analysis indicated the distribution of stable cesium in soybean root and nodule, and also cesium distribution was confirmed inside of nodules located above the water surface. It was considered that cesium transport from the roots was clearly involved in this behavior. Under high-concentration potassium (+K) conditions, the cesium uptake behavior of roots was greatly suppressed, but the nodules did not indicate the remarkable decrease compared with roots.

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セシウム局在および吸収挙動を明らかにし、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的とする。

これまでの解析により、根粒組織はセシウムを蓄積しやすい組織であるとともに、根と根粒間でのセシウム移動が確認され、根粒組織も地上部へのセシウム供給に関与していることが示唆された^[1]。また、根粒内皮へのセシウム分布は、根からの内部輸送に由来する蓄積であると考えられ、カリウム共存下では、根粒表皮からの吸収および根からの内部輸送がともに低下したと考えられた^[2]。

今回の解析では、大豆根系内の部位別の放射性セシウム存在量におけるカリウム共存の影響について検討した。

2. 材料と方法

播種時に根粒菌(*Bradyrhizobium japonicum*)を接種したダイズ(エンレイ)を水耕栽培により約1ヶ月栽培し、PETISによるリアルタイムイメージング解析に用いた。作物のセシウム吸収量は共存するカリウム濃度の影響を強く受けるため、実験開始前72時間の水耕溶液中カリウム濃度を通常濃度(+K条件)およ

び無添加(-K条件)とし、各カリウム濃度条件への順化を行った。PETISによるセシウム動態解析において、上記の植物体の根系からポジトロン放出核種のセシウム¹²⁷(¹²⁷Cs)を12時間吸収させ(パルス試験)、その後無標識水耕液による栽培試験(チェイス試験)により根系のセシウム吸収および地上部へのセシウム輸送挙動について解析を実施した。また、水耕液中および水面より上に根粒部位を配置し、解析を実施した。

上記と同様の+Kおよび-K条件のダイズ株に1mMの安定同位体セシウム(¹³³Cs)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粒子励起X線放射分析(microPIXE分析)を行った。¹³³Csを添加した水溶液で72時間栽培し、その後、採取したダイズ根および根粒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50μm)を作成した。凍結切片のmicroPIXE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。

3. 結果と考察

PETISによるリアルタイムイメージング解析の経時変化について、パルス実験時をFig.1に、チェイス実験時をFig.2に示した。パルス実験時では、-K条件において¹²⁷Csが根系に速やかに取り込まれたのに対し、+K条件では顕著な¹²⁷Cs吸収は見られなかった。また、チェイス実験では、+K条件において根粒部分に顕著な分布が確認された。

[R3-2]

−K 条件のチェイス実験時における水耕液中および水面より上側に位置する根粒組織について、 ^{127}Cs シグナル(輝度値, IntDen/10mm²)の経時変化を Fig.3 に示した。水面より上側に位置する根粒の ^{127}Cs シグナルは、水中の根粒組織と比較して半分程度の値を示したが、時間経過とともに ^{127}Cs シグナルは上昇傾向を示した。水面外にある根粒は、表面から直接 ^{127}Cs を吸収することは出来ないため、観測されたシグナル上昇は根からの組織内輸送による蓄積と考えられた。また、水中に位置する根粒とのシグナル値の差は、根粒表面からの ^{127}Cs 吸収量を示すと考えられ、根粒は表面および根からの内部輸送により、 ^{127}Cs を蓄積していることが示唆された。

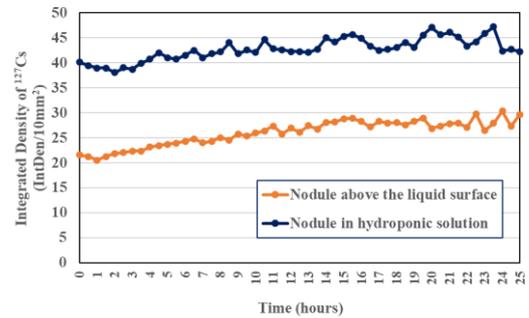
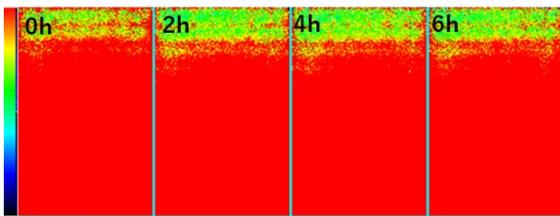


Figure 3. Integrated Density of ^{127}Cs for soybean nodules located above and below the liquid surface (Chase experiment (−K condition)).

a) Normal potassium concentration (+K condition)



b) Potassium-free condition (−K condition)

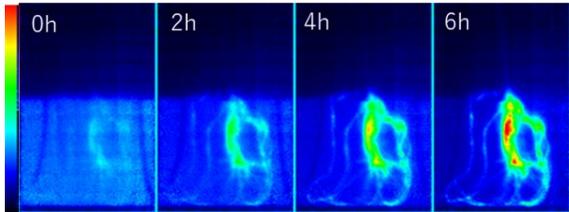
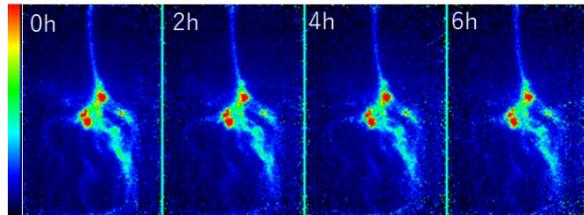


Figure 1. Real-time imaging by PETIS on ^{127}Cs uptake in soybean roots and nodules (Pulse experiment).

a) Normal potassium concentration (+K condition)



b) Potassium-free condition (−K condition)

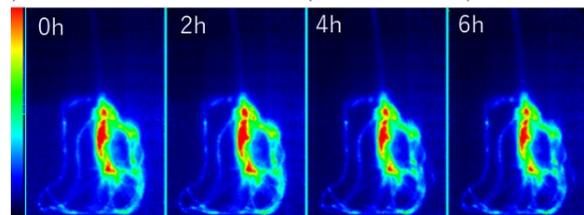


Figure 2. Real-time imaging by PETIS on ^{127}Cs uptake in soybean roots and nodules (Chase experiment).

−K および +K 条件の根、根粒(水中)、根粒(水面より上に位置)、茎における ^{127}Cs シグナル(輝度値)は、根で 20~30 倍、根粒(水中)で 5~6 倍、根粒(水面より上に位置)で 7~8 倍、茎で 10 倍程度の差が見られ、−K 条件で高い値を示した。各部位において、根粒部分で ^{127}Cs シグナルの差が小さく、セシウムを蓄積しやすい構造のためと考えられた。

microPIXE によるダイズ根および根粒組織内の非破壊的な元素分布解析において、−K 条件における水耕液中および水面より上側に位置する根粒組織について、 ^{133}Cs 分布解析を実施した。水面より上側に位置する根粒組織では、 ^{133}Cs 分布が不明瞭ではあったが、水中の根粒組織と類似した内皮での ^{133}Cs 分布が確認され、PETIS 実験と同様に、根からの内部輸送を示唆する結果が得られた。

今回のリアルタイムイメージング解析により、カリウム添加条件の異なる大豆根系の各部位(根、根粒、茎)における ^{127}Cs シグナル比を算出し、根で最も大きな ^{127}Cs シグナル低下を観測した。一方、根粒における低下は根と比較して小さく、放射性セシウムの蓄積と輸送の両方に関与していることが示唆された。また、少量ではあるが、液外に位置する根粒内部にも放射性セシウムが継続的に蓄積していることも確認され、根粒内部に蓄積された放射性セシウムの挙動について、詳細な解析が必要と考えられた。

参考文献

- [1] M.Igura, N. Suzui, Y.-G. Yin, Y. Miyoshi, K. Enomoto, T. Satoh and N. Kawachi “Elucidation of Cesium Transport Behavior in Soybean Root System”, QST Takasaki Annual Report 2019 QST-M-29, 109, 2020
- [2] 井倉将人, 鈴木伸郎, 尹永根, 三好悠太, 榎本一之, 江夏昌志, 山田尚人, 山縣諒平, 佐藤隆博, 河地有木, ダイズ根系内におけるセシウム輸送と共存元素の影響, 2020 年度連携重点研究成果報告書, 2021

[R3-2]

4. Micro-PIXE/PIGE 法を用いた茶葉の Al, F 濃度に関する研究

4. Study of Al and F Concentrations in Tea Leaves Using Micro-PIXE/PIGE

安田啓介^{#A)}, 安田香澄^{A)}, 江夏昌志^{B)}, 山田尚人^{B)}, 山縣諒平^{B)}, 佐藤隆博^{B)}, 河地有木^{B)}
 Keisuke Yasuda^{#A)}, Kasumi Yasuda^{A)}, Masashi Koka^{B)}, Naoto Yamada^{B)},
 Ryohei Yamagata^{B)}, Takahiro Sato^{B)}, Naoki, Kawachi^{B)}

^{A)} Department of Informatics and Environmental Science, Kyoto Prefectural University

^{B)} National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

Abstract

Elemental distribution and elemental concentration ratios in tea leaves were measured using micro-PIXE/PIGE method. The concentration ratios of Al, Si, and F in the epidermal cells were determined, and it was found that the values of Al/Si were almost the same in the two locations where they were measured. On the other hand, the values Al/F were 35% different. This suggests that Al and Si may form compounds.

Keyword: tea leaves, Al, F, concentration, micro-PIXE/PIGE

1. はじめに

アルミニウム (Al) は土壌中ではケイ素 (Si)、酸素 (O) に次いで 3 番目に多い元素である。通常、土壌中では Al はオキシ水酸化物、アルミノケイ酸塩等の形態で存在し、植物での化学的および生物学的反応には寄与しないと考えられている。しかし、酸性土壌では三価カチオン (Al^{3+}) として土壌中に溶け出す。 Al^{3+} イオンは植物に対して毒性を有し、多くの植物ではその体内に取り込まれることによって成長阻害等を引き起こす。特に熱帯雨林では酸性土壌が多いため影響は大きく、 Al^{3+} イオンの植物毒性がこの地域の農作物の収量を制限しているとも考えられている。一方、植物の中には酸性土壌でも Al^{3+} イオンの影響を受けないものもある。チャ (*Camellia sinensis*) はその代表的なものであり、成長阻害を受けずに植物体内に数 1000 ~ 数 10000 mg/kg という高濃度の Al を蓄積する。植物毒である Al^{3+} イオンを吸収して高濃度で集積することから、チャは Al^{3+} イオンの解毒機構を有すると考えられる。これまでの研究から、Al は茶葉の表皮細胞の細胞壁に分布することが明らかになってきた^[1]。このことからチャは茶葉において Al を細胞壁に閉じ込めることによってその影響を排除しているものと考えられる。また、他の元素と毒性の低い化合物を形成して解毒しているとも考えられている^[2]。茶葉中での Al の化学形についてはアルミノケイ酸塩、フッ素化合物、アルミニウム-クエン酸錯体などが提案されている^[3,4]。

我々はこれまでにチャにおける Al 解毒機構の解明を目指して、イオンマイクロビームを用いた PIXE (Particle Induced X-Ray Emission) 法による茶葉中の微量元素濃度、および元素分布の測定を行ってきた^[5]。これにより茶葉中では Al は表皮細胞の細胞壁に存在することを確認した。また成熟した茶葉では Al と同様に Si も表皮細胞の細胞壁に存在することを見出し、チャは茶葉でアルミノケイ酸塩を形成することで Al を解毒している可能性を示した^[6]。一方、チャはフッ素 (F) の高集積植物でもあるため、フッ素 #yasuda@kpu.ac.jp

化合物を形成することによって Al を解毒するメカニズムが推察されている。そこで我々は 2019 年度より TIARA のイオンマイクロビームを用いた茶葉中の Al および F の分布測定を開始した。この測定では Al は PIXE 法で、F は核反応からのガンマ線を測定する PIGE (Particle Induced γ -Ray Emission) 法で同時に測定する。これまでの研究で、測定に用いる試料の厚さを最適化し、Al, Si, F が茶葉内で表表皮の細胞壁に分布すること、およびこれら 3 元素の分布が非常によく似ていることを見出した^[7,8]。本報告書ではこれら 3 元素の濃度の比較について報告する。

2. 実験

2.1 試料

試料には京都府立茶業研究所で採取した生育期間 1 年以上のヤブキタの茶葉を使用した。クライオミクロトーム (LEICA CM1860) を用いて、茶葉の断面を葉脈の垂直方向に厚さ 20 μm で切り出し、これを凍結乾燥装置 (JEOL JFD-320) で約 15 分間真空乾燥することによって試料を作製した。

2.2 micro-PIXE/PIGE 測定

micro-PIXE/PIGE 測定は量子科学技術研究開発機構高崎量子応用研究所イオン照射研究施設 (TIARA) のマイクロビーム装置を用いて行われた。エネルギーが 3 MeV の陽子マイクロビームを茶葉断面に照射し、発生する特性 X 線を Si(Li) 検出器 (PGT LS30135) で、 $^{19}\text{F}(p,\alpha\gamma)^{16}\text{O}$ 反応で発生するエネルギーが 6~7 MeV のガンマ線を NaI(Tl) 検出器 (BICRON 4X4H4/3.5A) でそれぞれ検出した。測定時のビーム径はおおよそ 1 μm × 1 μm 、ビーム電流は 50~100 pA だった。測定領域は 50 μm × 100 μm とし、表表皮付近を測定した。茶葉断面と測定領域を模式的に表したものを Figure 1 に示す。

[R3-2]

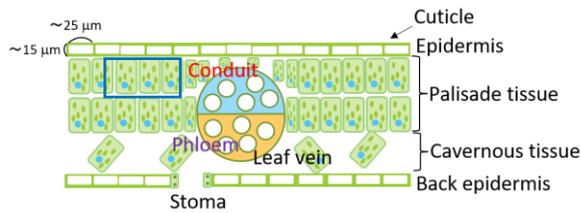


Figure 1 Schematics of the cross section of tea leave. Measurement region is shown by blue box.

3. 結果と考察

測定で得られた X 線のエネルギースペクトルを Figure 2 に示す。実線および点線の矢印はそれぞれの元素の K_{α} および K_{β} 線のエネルギーを示す。いずれの試料からもアルミニウム、ケイ素、リン、硫黄、塩素、カリウム、カルシウム、マンガンが検出された。また、 γ 線のエネルギースペクトルを Figure 3 に示す。 $^{19}\text{F}(p,\alpha\gamma)^{16}\text{O}$ 反応で発生する γ 線のエネルギーは 6.13 MeV、6.92 MeV、7.12 MeV で、いずれの試料のでもこれらのガンマ線が測定されていることがわかる。また、ピークの低エネルギー側にこれらの γ 線のコンプトンテールも見られる。ここでは、4.6 MeV ~ 7.4 MeV の範囲のイベントを $^{19}\text{F}(p,\alpha\gamma)^{16}\text{O}$ 反応で発生した γ 線とみなして、フッ素の分布を求めるのに使用した。

Figure 4 に Al, Si, F の二次元元素分布を示す。これら 3 元素の分布はよく似ていることがわかる。化合物を形成している場合含まれる元素は同じ分布をするので、二次元元素分布の測定結果は Al, Si, F の化合物形成の可能性を示唆するものと考えられる。一方、化合物を形成している場合、含まれる元素の原子数比は一定となる。PIXE および PIGE 測定では X 線または γ 線の収量は試料中に含まれる各元素の原子数に比例する。そのため、測定範囲内でいくつかの領域を設定してそこから放出される各元素の特性 X 線あるいは γ 線の収量を調べ、その比が一定なら化合物を形成している可能性が高いと考えた。そこで、Figure 5 に示す①~③の 3 つの領域で収量を調べてその比を求めた。表表皮細胞の上側を領域①、下側を領域②とし、比較のための葉肉の部分を領域③、バックグランド見積りのために試料のない部分を領域④とした。領域①~③のカウント数から領域④のカウント数を引き算し、領域①~③の Al, Si, F の収量を求め、さらに収量の比を求めた。結果を Table 1 に示す。表表皮の上側 (領域①) と下側 (領域②) では Al と Si の収量の比 (Al/Si) がほぼ一致したのに対し、Al と Si の収量の比 (Al/F) は 35% の差が見られた。現段階では測定数が少ないため確定

的な結論を出すことは難しいものの、測定結果からは Al と Si については化合物形成の可能性を示唆する結果が得られたと考えている。

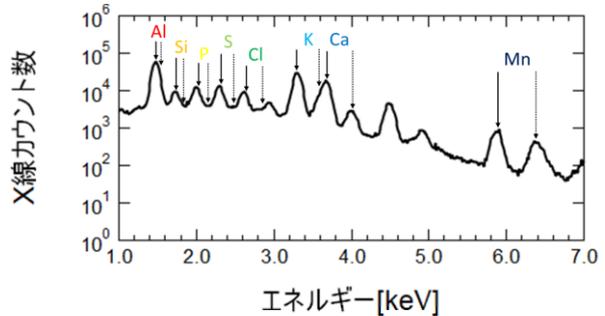


Figure 2 X-ray energy spectra obtained with Si(Li) detector. Solid and dotted arrows show K_{α} and K_{β} X-ray energy.

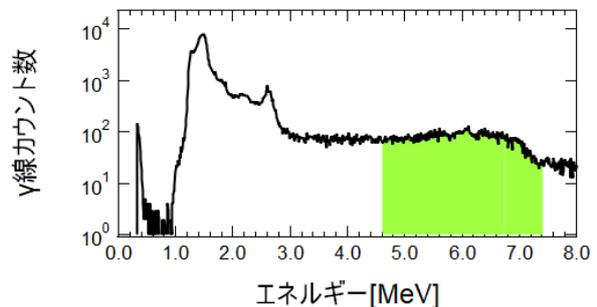


Figure 3 γ -ray energy spectra obtained with NaI(Tl) detector.

3. まとめ

micro-PIXE/PIGE 法を用いて茶葉の元素分布および元素濃度比の測定を行った。Al, Si, F について表表皮細胞内の元素濃度の比を求めたところ、Al と Si については測定した 2 か所でほぼ同じ値を示すことが分かった。一方、F と Al については 35% 違う値となった。これは Al と Si が化合物を形成している可能性を示唆している。今後はより多くの試料の測定を行い結果を統計的に解析することによって、茶葉内で Al が Si, F と化合物を形成しているかどうかを明らかにしていく予定である。

[R3-2]

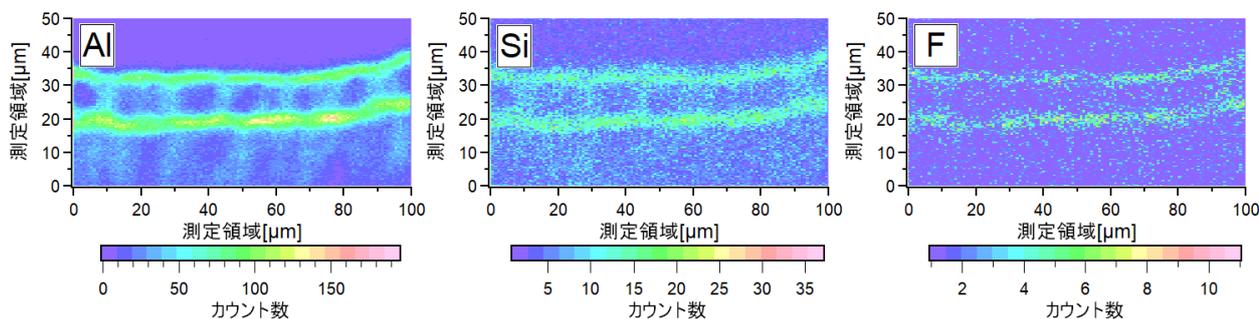


Figure 4 Two-dimensional elemental distribution of Al, Si, F and Ca near epidermal region

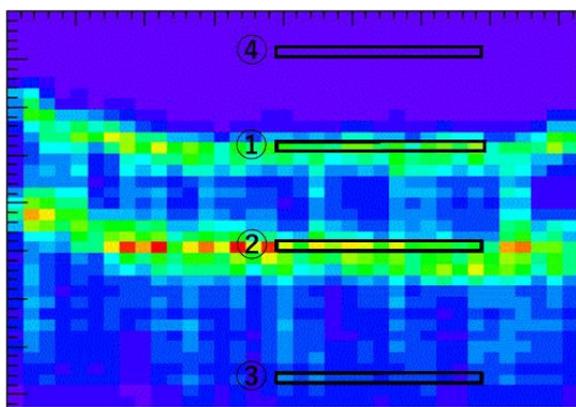


Figure 5 Two-dimensional elemental distribution of Al. Boxes show regions for yield evaluation.

Table 1 Ratio of yields of Al, Si, and F elements in regions ①-③ shown in Figure 5.

	Al/Si	Al/F	Si/F
①	8.3	49	5.9
②	8.4	37	4.4
③	6.8	400	60

参考文献

- [1] Matsumoto, H.; Hirasawa, E.; Morimura, S.; Takahashi, E. Localization of aluminum forms in tea leaves. *Plant Cell Physiol* 1976, 17, 627-631.
- [2] Nagata, T.; Hayatsu, M.; Kosuge, N., Identification of Aluminium Forms in Tea Levels by ^{27}Al NMR, *Phytochemistry* 1992, 31(4), 1215-1218.
- [3] Gao, H.; Zhao, Q.; Zhang, X.; Wan, X.; Mao, J. Localization of Fluoride and Aluminum in Subcellular Fractions of Tea Leaves and Roots. *J Agric Food Chem* 2014, 62, 2313-2319.
- [4] Morita, A.; Horie, H.; Fujii, Y.; Takatsu, S.; Watanabe, N.; Yagi, A.; Yokota, H., Chemical forms of aluminium in

xylem sap of tea plants (*Camellia sinensis* L.), *Phytochemistry* 2004, 65, 2775-2780.

- [5] Uomori, S.; Yamashita, H.; Saito, M.; Haruyama, Y.; Yasuda, K. Change of concentrations and distributions of aluminum and manganese in tea leaves, *Int J PIXE* 2013, 23, 13-19.
- [6] Haruyama, Y.; Fujiwara, T.; Yasuda, K.; Saito, M.; Suzuki, K, Localization of Aluminum in Epidermal Cells of Mature Tea Leaves, *Quantum Beam Sci.* 2019, 3(2), 9. <https://doi.org/10.3390/qubs4020019>
- [7] Yasuda, K.; Yasuda, K.; Koka, M.; Yamada N.; Yamagata, R.; Sato, T.; Kawachi, N, “Study on aluminum detoxification mechanism of tea plants (*Camellia sinensis*) by measuring trace element distribution of tea leaves”, 2019 年度連携重点研究 成果報告書
- [8] Yasuda, K.; Yasuda, K.; Koka, M.; Yamada N.; Yamagata, R.; Sato, T.; Kawachi, N, “Measurements of elemental distribution of Al and F in tea leaves using micro-PIXE/PIGE method”, 2020 年度連携重点研究 成果報告書

[R3-2]

5. 茶葉におけるセシウムおよびストロンチウムの局所的集積特性の解明 II

5. Evaluation of Elemental Concentration and Localization of Cesium and Strontium in Tea Leaves II

寺川貴樹^{#A)}, 桃北啓佑^{A)}, 服部祥堯^{A)}, 佐藤光義^{B)}, 石井慶造^{A),B)}, 江夏昌志^{C)}, 山田尚人^{C)}, 山縣諒平^{C)}, 石井保行^{C)}, 鈴木伸郎^{C)}, 佐藤隆博^{C)}, 河地有木^{C)}
 Atsuki Terakawa^{#,A)}, Keisuke Momokita^{A)}, Yoshitaka Hattori^{A)}, Mitsuyoshi Sato^{B)}, Keizo Ishii^{A),B)}, Masashi Koka^{C)}, Naoto Yamada^{C)}, Ryohei Yamagata^{C)}, Yasuyuki Ishii^{C)}, Nobuo Suzui^{C)}, Takahiro Satoh^{C)}, Naoki Kawachi^{C)},
^{A)} Cyclotron and Radioisotope Center, Tohoku University

^{B)} Research Center for Remediation Engineering of Living Environment Contaminated with Radioisotopes, Tohoku University

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

Abstract

We evaluated the spatial distribution of cesium and strontium in tea-leaves using a micro-PIXE analysis to reveal the characteristics of the concentration and translocation in tea-leaves for these elements, and to study similarities and differences between cesium and potassium or between strontium and calcium. We used tea-leaf samples (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) which took in cesium and strontium via foliar absorption. We have confirmed that strontium and calcium concentrate in the leaf samples as small dots while cesium and potassium are uniformly distributed. Almost all the dots of strontium and calcium concentration have been observed in the same locations in the leaves.

Keyword: micro-PIXE, tea leaves (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), cesium, strontium

1. はじめに

2011年3月の福島第一原子力発電所事故以降、放射性物質の食品汚染に高い関心が寄せられている。Cs-137やSr-90は半減期が長く、特にSr-90は骨に集積し体外に排出されにくいと、発がんの原因となる。我々はこれまでの研究で、日常的に消費する茶葉を対象とし、安定CsおよびSrを添加栽培して収穫された茶葉のPIXE分析から、CsとSrの緑茶への溶出を評価した[1]。その結果、Csは緑茶へ容易に溶出し、Srの溶出は極めて低いことを確認した。これらの実験結果より、茶葉内のCsはイオンや水溶性の化合物の状態が存在し、Srは非水溶性の化合物として存在すると解釈された。さらに、CsとSrの茶葉の組織レベル、細胞レベルで、集積箇所や濃度分布に、溶出特性と関連する差異が現れるのではないかと推察した。

これらの背景のもとに、本研究では、マイクロPIXE分析を用いて、茶葉の細胞および組織スケールでのCs、Sr集積の類似性、差異等について、さらにはこれらの同族元素との類似性や差異についても明らかにすることを目的とした。一方、植物の元素取込みには経根吸収と葉面吸収の異なる2つの経路があり、移行経路によるCsとSrの集積特性の差異や類似性の有無を明らかにすることも大変興味深い。本研究では、CsとSrの葉面吸収条件で栽培した茶葉サンプルを用いてマイクロPIXE分析を行った。

2. 実験方法

茶葉試料は、鉢植え栽培した市販のやぶきた茶の #atsuki.terakawa@tohoku.ac.jp

苗木 (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) から採取した。安定CsおよびSrの添加では、移行率(葉中の量/散布量)とマイクロPIXE分析に必要な濃度(300ppm程度)に基づいて、塩化セシウム水溶液と塩化ストロンチウム水溶液の濃度を決定した。葉面からの一様な吸収を考慮し、塩化セシウム水溶液(43.6 g/L)および塩化ストロンチウム水溶液(104.9 g/L)の混合溶液中に栽培中の茶葉を1分間浸した(Figure 1)。その後、栽培を継続し葉面吸収から3日後、30日後、90日後に茶葉を採取した。採取された茶葉は、流水で表面洗浄(1分間)、凍結乾燥した後に、高崎量子応用研究所にてマイクロPIXE分析(スキャン範囲800×800 μm および400×400 μm)された。

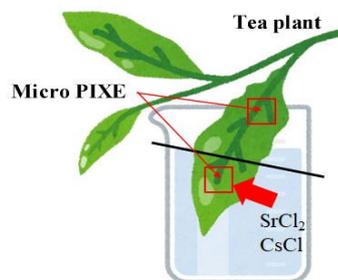


Figure 1. Foliar absorption of Cs and Sr into tea leaves

3. 結果及び議論

茶葉の葉面吸収させた領域のマイクロPIXE分析

[R3-2]

によって得られた K と Cs の空間濃度分布（元素マップ）を Figure 2 に示す。なお、K は土壌より摂取された経根吸収によるものである。K と Cs は基本的に葉内に一様に分布しており、特に K では葉脈のような葉の構造に関係すると考えられる濃度分布も確認された。それ以外の点で K と Cs の比較では特に顕著な違いは無く、葉面吸収後の経過日数に関し

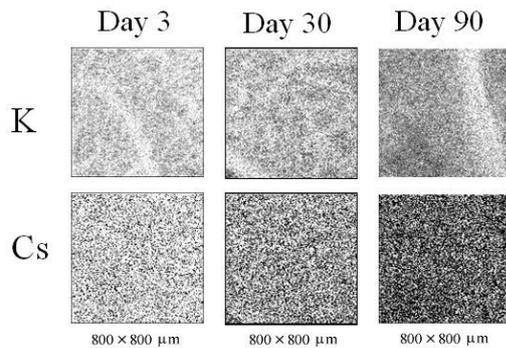


Figure 2. Spatial distribution of Cs and K in the foliar-applied region of the tea leaf sample.

ても違いは見られなかったが、90 日後の試料では Cs の濃度がやや低い状況であった。

Figure 3 は茶葉の葉面吸収させた領域における Ca および Sr の元素マップを示す。Ca も K と同様に経根吸収されたものである。K や Cs の集積傾向と異なり、Ca と Sr は共にスポット状に茶葉内に集積することが確認された。これは、細胞の構造的な維持に寄与する Ca を含むアルカリ土類金属に共通する傾向と考えられ、茶へほぼ溶出しにくい非水溶性の特徴と関連すると示唆される。また、Ca (赤) と Sr (緑) を融合させた元素マップ (赤と緑が同一場所にあると黄色で表示される) では、2次元の限定的情報ではあるが、Sr は Ca と同じ局所領域に集積することが示されている。一方、経時的変化に関しては、葉面吸収 3 日後の Sr の分布は、スポット状集積の特徴を示すものの葉内に広く分布し、経根吸収された Ca の分布との違いも確認された。しかしながら、30 日、90 日後では Ca の分布とほぼ一致し、Sr が茶葉内を移動し、吸収経路が異なっても最終的には Ca と同じ集積状況に至ると考えられる。また、Sr に関して 90 日後は濃度の減少が示唆された。

葉面吸収から 90 日後の試料で、Cs や Sr 濃度の減少が示唆され、また、60 日以降の Sr と Ca 集積のほぼ完全な一致から、吸収された Cs や Sr は経時的に葉内を移動することが考えられる。したがって、同一の茶葉試料内でも水溶液に浸していない非葉面吸収領域に移動し集積していることが考えられる。そこで、非葉面吸収領域のマイクロ PIXE 分析も実施した。その結果、Cs と Sr の特性 X 線ピークが認められたが、元素マップを得る統計量が得られなかったのは 30 日後の試料のみであった。その Sr に関する元素マップを Figure 4 に示す。葉面吸収領域の結果 (Figure 3) と同様に、Sr と Ca のスポット状の集積はほぼ完全

に一致した。また、Cs についても、元素マップは示していないが、30 日後の試料において茶葉内でほぼ一様な分布が確認されている。したがって、これらの分析結果は、上記の Sr や Cs の茶葉内での動態に関する推察を支持する実験データと考えられる。今回の実験では確認していないが、Cs と Sr の移動は

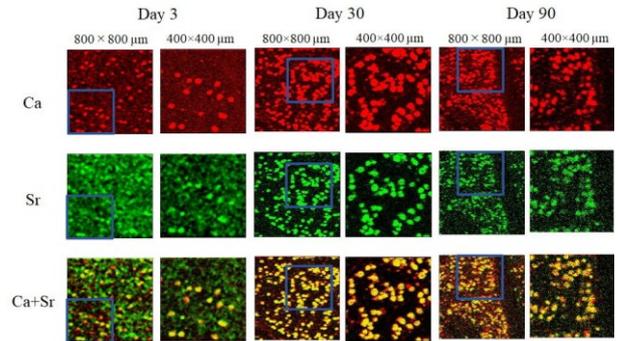


Figure 3. Spatial distribution of Ca and Sr in the foliar-applied region of the tea leaf.

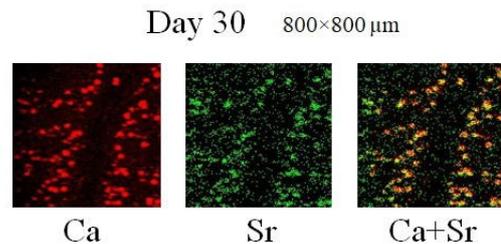


Figure 4. Spatial distribution of Ca and Sr in the tea leaf region which was not soaked in the solution 30 days after foliar absorption.

葉面吸収させていない他の茶葉へも及ぶ可能性も考えられる。

4. 結論

茶葉に葉面吸収された Cs と Sr のマイクロ PIXE 分析で、Cs は K と同様に茶葉に一様に分布し、Sr は経時的変化を経て、スポット状に分布する Ca とほぼ同一箇所に集まり、同様のスポット状分布を形成することが明らかとなった。また、Cs と Sr は葉面吸収領域以外の葉の領域にも広がり、それぞれ一様およびスポット状の集積をすることが確認された。

参考文献

- [1] A. Terakawa, H. Ushijima, K. Ishii, M. Sato, K. Sera, "Elution of Cs and Sr from Tea Leaves (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) to Green Tea Evaluated by PIXE Analysis", *International Journal of PIXE*, 28, 93-100, 2018

[R3-2]

6. 高等植物におけるグルタチオンによる重金属元素動態の制御機構の解明

6. Elucidation of Control Mechanisms of Heavy Metal Behaviors Triggered by Glutathione in Higher Plants

中村進一^{#A)}, 今泉佑菜^{A)}, 須田啓斗^{A)}, 鈴木伸郎^{B)}, 尹永根^{B)},
野田祐作^{B)}, 江夏昌志^{B)}, 山田尚人^{B)}, 山縣諒平^{B)}, 佐藤隆博^{B)}, 河地有木^{B)}
Shin-ichi Nakamura^{#A)}, Yuna Imaizumi^{A)}, Keito Suda^{A)}, Nobuo Suzui^{B)},
Yong-Gen Yin^{B)}, Yusaku Noda^{B)}, Masashi Koka^{B)}, Naoto Yamada^{B)},
Ryohei Yamagata^{B)}, Takahiro Sato^{B)}, Naoki Kawachi^{B)}

^{A)} Department of Bioscience, Faculty of Life Sciences, Tokyo University of Agriculture

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

Abstract

Glutathione is a tripeptide with a variety of biological activities. Our researches have demonstrated that glutathione given to oilseed rape plants site-specifically have affects behaviors of heavy metal such as cadmium, copper, and zinc. However, the molecular mechanisms of these phenomena are not fully understood. To elucidate the molecular mechanisms of these phenomena, it is necessary to understand the movement of these elements in roots and to analyze the functions of transporter proteins involved in their regulation. In this study, we conducted experiments using Micro-PIXE to establish an experimental system for imaging the distribution of copper and zinc in roots. Due to detection sensitivity issues, clear observations could not be made with sections prepared from oilseed rape roots grown under normal conditions. On the other hand, we succeeded in determining detectable copper and zinc concentrations in hydroponic solutions. Future application of experimental results obtained in this study is expected to elucidate the molecular mechanism triggered by glutathione.

Keyword: *Brassica napus*, Micro-PIXE, glutathione, copper, zinc

1. はじめに

グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンの3つのアミノ酸からなる酵素的に合成されるペプチドである。グルタチオンは活性酸素の除去など様々な生理活性を持つ。これまでの研究によって、アブラナでは植物体に部位特異的に施用したグルタチオンが重金属元素動態を選択的に制御することを明らかにしている[1, 2]。例えば、根に部位特異的に与えたグルタチオンはカドミウム・銅の地上部への移行・蓄積を抑制する。また、葉に部位特異的に与えたグルタチオンは亜鉛の地上部への移行・蓄積を促進する。植物体内において、カドミウム、銅、亜鉛などの重金属元素の動態を制御することは社会的価値の高い植物の作出へと結び付くことが期待される。このような作物を利用することで、重金属元素が比較的多く蓄積した土壌の浄化、重金属元素が比較的多く蓄積した土壌での安全な農作物栽培、さらには栄養価の高い(ミネラル分を豊富に含む)付加価値を持つ作物の栽培などが期待できる。しかし、グルタチオンが誘導するこれらの現象の分子機構は十分に解明されているとはいえない。植物における重金属元素の組織内分布を明らかにすることがこれらの分子機構解明の端緒になると考えている。

植物の根における重金属元素の組織内分布を調べるために、Micro-PIXE Particle Induced X-ray Emission法を用いた。この実験手法はイオンビームを利用した元素イメージング手法である。この手法を用いる

ことで、複数元素の存在を同時に定量することができる[3]。また、細胞レベルで高解像度の元素分布像も得ることができる。今年度は、グルタチオンの施用効果が確認されている銅と亜鉛の組織内分布を撮像するための実験系を確立することを目指し、イメージング実験に取り組んだ。

2. 実験手法

実験にはアブラナ(*Brassica napus*)(品種:農林16号)を用いた。アブラナは改変 Hoagland 液を使用して、栽培条件を完全に制御することができる人工気象器内で4週間水耕栽培した。水耕液は週に2回交換し、エアレーションを行いながらアブラナを水耕栽培した。通常の条件で水耕栽培したアブラナ及びサンプリング前の2日間、水耕液の銅濃度を100 μ Mにして、処理を行ったアブラナから、銅イメージング実験用の根サンプルを採取した。また、通常の条件で水耕栽培したアブラナ及びサンプリング前の10日間、亜鉛濃度を1～100 μ Mにして、処理を行ったアブラナから、亜鉛イメージング実験用の根サンプルを採取した。収穫した各植物体の根の先端部分をイメージング実験に用いた。サンプリングした植物根は新鮮な状態で凍結切片作成用の樹脂に浸潤・包埋した。凍結切片作成時まで各サンプルは-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。切片作成装置を用いて凍結した各サンプルを40～120 μ m厚にスライスした。作成したそれぞれの切片をポリカーボネートフィルムカートリ

[R3-2]

ッジに取り付けた。作成した各切片に 3 Mev の水素イオンビームを照射して、銅、亜鉛、カリウムから放出される特性 X 線を測定した。

3. 実験結果と考察

3.1 銅

グルタチオンの施用効果が確認されている 100 μM の銅処理を行ったアブラナ根から作成した輪切り切片を作成して、銅及びカリウムの元素分布を調べた。対照として、通常の水耕栽培したアブラナ根からも輪切り切片を作成し、銅及びカリウムの元素分布を調べた。対照区のアブラナを水耕栽培するのに用いた改変 Hoagland 液の銅濃度は 0.5 μM とした。

対照植物の根の輪切り切片の銅分布は不鮮明であった(Fig.1A)。サンプル中の銅の存在量が十分でないため、銅の組織分布を観察することができなかったと考えられる。一方、100 μM の銅処理を行ったアブラナ根から作成した輪切り切片では、根の組織に全体的に広がって銅が分布している様子を観察することができた(Fig.1B)。

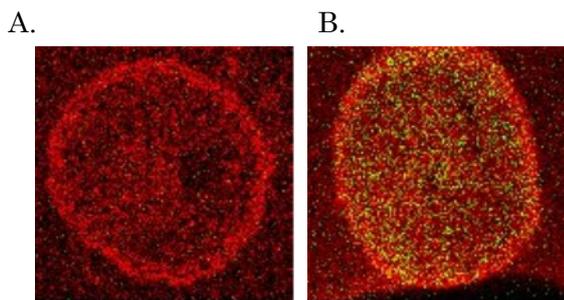


Figure 1. Copper and potassium localization images obtained by Micro-PIXE. Oilseed rape plants (*Brassica napus*) were cultivated under normal growing conditions (A) and 100 μM copper treated conditions (B). Green; copper localization. Red; potassium localization. Potassium localization was presented to indicate the location of the roots.

3.2 亜鉛

通常の水耕栽培をしたアブラナの根から作成した輪切り切片を用いて実施したイメージング実験では銅と同様に亜鉛の組織内分布も不鮮明であった。そのため、今年度は様々な亜鉛濃度で水耕栽培したアブラナの根からイメージング実験用の切片を作成して、まずは根における亜鉛分布を観察することを試みた。その結果、30 μM の亜鉛処理を行ったアブラナの根から作成した切片で亜鉛分布を観察することができた(Fig.2A)。また、100 μM の亜鉛処理を行ったアブラナの根から作成した輪切り切片では銅の組織分布と同様に根の組織に全体的に広がって亜鉛が分布している様子を観察することができた(Fig.2B)。

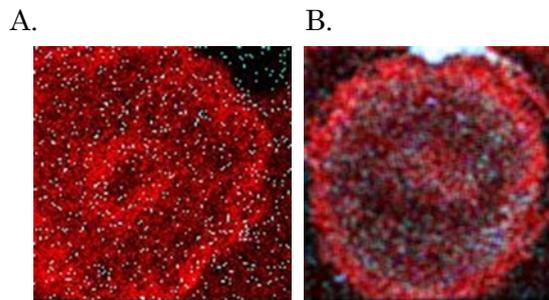


Figure 2. Zinc and potassium localization images obtained by Micro-PIXE. Oilseed rape plants (*Brassica napus*) were cultivated under 30 μM zinc (A) and 100 μM zinc treated conditions (B). Cyan; zinc localization. Red; potassium localization. Potassium localization was presented to indicate the location of the roots.

4. まとめ

今年度実施した Micro-PIXE 実験によって、アブラナの輪切り切片より、銅、亜鉛の分布を確認することができた。今年度に元素の分布を確認することができた栽培条件は、銅・亜鉛のいずれも通常の栽培条件に比べて高い濃度の水耕液を用いて処理を行う必要があることが明らかになった。根におけるイメージングが可能であった濃度の銅や亜鉛を含む水耕液を用いてグルタチオン処理を行ったところ、その効果を確認することができた。次年度以降にはグルタチオンがアブラナの根における重金属動態に及ぼす影響を可視化できると期待している。同時に、より高感度で根における銅、亜鉛の分布を検出することができる実験手法も確立していきたいと考えている。

参考文献

- [1] Nakamura et al, Journal of Experimental Botany, 64: 1073-1081, 2013
- [2] Nakamura et al, Plant Science, 283: 424-434, 2019
- [3] Suzui et al., RADIOISOTOPES, 68: 643-657, 2019