

[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

Research of Plant Mineral Behavior
Complemented by Real-time Imaging and Sub-cellular Localization Analysis

1. マメ科植物における複数金属元素蓄積機構の解明

1. Identification of Multi-element Accumulation Mechanisms in Legume

古川純^{#A,B)}, 太田日菜子^{A)}, 野田祐作^{C)}, 鈴木伸郎^{C)}, 尹永根^{C)},
 江夏昌志^{C)}, 山田尚人^{C)}, 山縣諒平^{C)}, 石井保行^{C)}, 佐藤隆博^{C)}, 河地有木^{C)}
 Jun Furukawa^{#A,B)}, Hinako Ohta^{A)}, Yusaku Noda^{C)}, Nobuo Suzui^{C)}, Yong-Gen Yin^{C)},
 Masashi Koka^{C)}, Naoto Yamada^{C)}, Ryohei Yamagata^{C)}, Yasuyuki Ishii^{C)}, Takahiro Satoh^{C)}, Naoki Kawachi^{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 (Fe) translocation from root to shoot. In *Arabidopsis thaliana*, it was reported that Fe deficiency in the shoot 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 gene expression levels related to Fe uptake and translocation in two cultivars, the plants treated with normal and low iron concentrations for 3 weeks were subjected to gene expression analysis. In Fe uptake related genes (*IRT*, *FRO*) and cytosolic Fe transport related gene (*NAS*), the expression levels were 3-fold higher in B-129 root comparing MG-20. On the other hand, in *FRD3*, related to root to shoot Fe translocation, expression level was suppressed by half in B-129. This expression pattern was consistent with Fe accumulation around vascular tissue in the root stele of B-129 obtained by Micro-PIXE analysis. Recently, Fe deficiency-related small peptide, IMA was identified and its transfer from shoot to root might be involved in the signal transduction in Fe homeostasis. Low Fe concentration and high Fe transport-related gene expression in B-129 hypothesized high IMA expression in B-129 shoot, however, IMA expression was low in B-129 shoot. These results suggest the existence of non-IMA related Fe homeostasis regulation in *L. japonicus*.

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

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元素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]。

また、栄養元素の欠乏や過剰といった現象が引き
 #furukawa.jun.fn@u.tsukuba.ac.jp

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^[1, 2]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た解析を行った。ミヤコグサには複数金属の蓄積能が異なる Miyakojima MG-20 系統(以下 MG-20)と Gifu B-129 系統(同 B-129)という主要実験系統が存在しており、地上部と根の元素濃度について測定した結果から、多くの元素で根と地上部のいずれにおいても B-129 で高い濃度を示すものの、鉄のみ地上部において MG-20 よりも B-129 中の濃度が低いという現象が認められた^[3]。先行研究から B-129 の地上部で鉄が欠乏し、その結果として複

[R3-2]

数元素の蓄積が誘導されていると予測し、根における鉄の輸送機構が両系統でどのように異なるかを明らかにし、また地上部での発現が全身の鉄恒常性維持を担うとされる短鎖ペプチド IMA の発現が系統間で異なるかについて検証した。

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。MG-20 系統と B-129 系統の 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。4 週齢の植物において凍結切片を作成した後に Micro-PIXE 法による Fe の局在解析を行った。同様に栽培されたサンプルを用いて IMA1 を含む鉄恒常性維持に関与する遺伝子群の発現量を検証した。また鉄欠乏処理として、水耕液の鉄濃度を 1/10 として 3 週間栽培したサンプルでも IMA1 の発現量を測定した。

3. 結果と考察

ミヤコグサ B-129 は MG-20 よりも根における鉄濃度が高いものの、地上部においては逆に MG-20 よりも低濃度に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。また大気 Micro-PIXE 法による鉄の局在解析から 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ている。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過程において MG-20 との間に機能的な差異があることで、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^[4,5]。これは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、鉄欠乏区でミヤコグサを栽培し、鉄の吸収や輸送に関わる遺伝子の発現解析を行った。

根における鉄の吸収は根圏に存在する鉄を 2 価の鉄イオンである Fe^{2+} に変換する FRO と、 Fe^{2+} を細胞内に吸収する IRT と呼ばれる輸送体が主な役割を担っていることが知られている。また、細胞内に取り込まれた Fe^{2+} はニコチアミン (NA) 合成酵素 NAS によって合成された NA とキレート化合物を形成し、細胞内を表皮から導管方向へ輸送される。これらをコードする遺伝子の発現をミヤコグサの系統間で比較すると、鉄標準区において *IRT1*、*IRT3*、*FRO2*、*NAS1* のいずれにおいても B-129 で MG-20 よりも約 3 倍の発現量を示すことが明らかとなった^[3]。一方、導管内

で Fe^{2+} とキレート化合物を形成して根から地上部へ輸送するために必要となるクエン酸を導管内で蓄積する FRD3 をコードする遺伝子の発現量は B-129 で半分程度に抑制されていた^[3]。これは B-129 において導管内のクエン酸量が不足しており、 Fe^{2+} を効率的に地上部へ輸送することが難しくなっていることを示唆しており、Micro-PIXE による解析から得られた中心柱付近に鉄が蓄積しているという結果を支持する遺伝子発現パターンであった。*IRT* や *FRO*、*NAS* の発現誘導は B-129 の根で鉄吸収機構が活性化されていることを示していたことから、近年鉄欠乏状態にある植物の地上部において維管束周辺の細胞で発現が誘導され、篩管を介して根へと移動することでシグナル伝達を担っている^[6]と報告されている短鎖ペプチド IMA をコードする遺伝子の発現解析を行った。B-129 は地上部での鉄濃度が低く、また根において鉄吸収・輸送に関連する遺伝子の多くが誘導されていたことから、IMA の発現も B-129 の地上部で誘導されていると予測されたが、MG-20 に比べ B-129 の方が低発現という結果であった (Figure 1 A)^[3]。鉄欠乏条件で 3 週間栽培したサンプルの地上部では両系統とも *IMA1* の誘導が約 10 倍に増加したことから (Figure 1 B)、今回我々が着目した *IMA1* はミヤコグサにおいても鉄恒常性の維持に関与する遺伝子であることが示唆された。

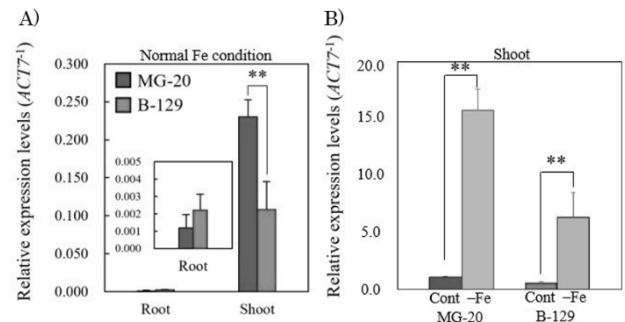


Figure 1. *IMA1* Expression in MG-20 and B-129 Obtained by RT-qPCR. The expression levels of *IMA1* were normalized by *ACT7* expressions. A) indicates *IMA1* expression in shoot and root under control condition and B) shows *IMA1* expression in shoot under control and Fe deficient condition. ** indicates $p < 0.01$ (Student's t-test).

これらの結果から、B-129 の根では地上部における IMA の発現誘導を介さない鉄吸収関連遺伝子の発現制御機構が存在していることが示唆され、今後、栄養環境への応答過程について更なる知見が得られるものと期待される。

参考文献

- [1] <https://doi.org/10.3769/radioisotopes.68.643>
- [2] <https://www.mdpi.com/2412-382X/3/3/18>
- [3] <https://doi.org/10.1093/aob/mcac101>
- [4] <http://www.plantphysiol.org/content/111/3/849>
- [5] <http://www.plantphysiol.org/content/144/1/197>
- [6] <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy145>

[R3-2]

2. *Vigna* 属耐塩性野生種のリウミ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^{B)}, 古川純^{C)}, 鈴木伸郎^{B)}, 尹永根^{B)}, 河地有木^{B)},
Ken Naito^{#A)}, Yusaku Noda^{B)}, Jun Furukawa^{C)}, Nobuo Suzui^{B)}, Yong-Gen Yin^{B)}, Naoki Kawachi^{B)}

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

^{B)} Takasaki Advanced Radiation Research Institute,

National Institutes for Quantum Science and Technology

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

Abstract

Genus *Vigna*, which includes relatives of cowpea and azuki bean, is a reservoir of diversity. Multiple *Vigna* species have independently evolved unique mechanisms of salt tolerance to and thus adapted to coastal environment. Of them, we focused on *V. riukiensis* that have a capacity to allocate high amount of Na in the leaves. This contrasts with its relative *V. nakashimae*, which is also salt-tolerant but excludes Na out of the leaves. To elucidate this unique feature of *V. riukiensis*, we first observed the leaf cells by electron microscopy and found *V. riukiensis* accumulated lots of starch granules in the chloroplasts. Next we shaded the leaves of *V. riukiensis* to make the starch granules disappeared and found out the shaded leaves did not accumulate Na while unshaded leaves did. Finally we performed SEM-EDX on the leaf sections and found Na was distributed around, not inside, the starch granules. We consider these results indicate that *V. riukiensis* forms Na-binding starch granules and thus it can trap Na out of cytosols and chloroplasts.

Keyword: *Vigna riukiensis*, salt tolerance, starch, SEM-EDX

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。

本年度は *Vigna* 属の中でも、葉に多量の Na を蓄積できる *V. riukiensis* に焦点を当てた。多くの耐塩性植物は葉への Na 流入を防ぐ機構を発達させてきたことに比べると対照的だからである。そこで、本研究では放射性 Na を使った BAS イメージングの他に、SEM-EDX を用いた葉肉細胞内における Na 分布を明らかにし、*V. riukiensis* がもつ特殊な耐塩性機構の実態に迫ることを目指した。

2. 材料と方法

2.1 材料と栽培条件

V. angularis (栽培アズキ = JP37752) および *V. riukiensis* (JP108810) 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。植物体は全て水耕で、14 時間明期・28℃ : 10 時間暗期・24℃ に設定した人工気象装置内で栽培した。塩ストレス処理は、第 2 葉または第 3 葉が展開したタイミングで水耕液の NaCl 濃度を 100 mM または 200 mM とすることで実施し

た。

2.2 オートラジオグラフィ

植物体は水耕で栽培し、任意の時期に ²²Na 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。

2.3 ヨウソデンペン反応

アルミニウム箔で多い 24 時間遮光した葉と、遮光しなかった葉をサンプリングし、ヨウ素デンペン反応を行った。

2.4 SEM-EDX

まず、100 mM NaCl・3 日の塩ストレスを受けた植物体の葉を 5 mm 角に刻んでパラホルムアルデヒドおよびグルタルアルデヒドを含むカコジル酸バッファで固定した。サンプルは蒸留水で洗浄後、メタノール溶液で脱水し、酸化プロピレンに置換した。その後さらに Epon812 で置換し、Epon812 樹脂に包埋した。包埋サンプルはマイクロトームのダイアモンドナイフで 1-2 μm の切片とした。切片は走査型顕微鏡で観察した後、高真空、加速電圧 15 kV、Spot intensity 80、照射時間 1 時間、の条件で電子線を照射し、その後 SEM による顕微鏡画像の取得および Na スペクトルの検出を行った。

3. 結果と考察

3.1 葉に Na を蓄積する *V. riukiensis*

まず、*V. riukiensis* の葉に多量の Na が蓄積されることの再現性を検証した。耐塩性をもたない *V. angularis* と、耐塩性をもつ *V. riukiensis* に ²²Na を含

[R3-2]

む塩ストレスを与えた結果、図 1 のような結果が得られ、*V. riukiensis* の葉に多量の Na が蓄積されることが改めて確認された (Figure 1)。

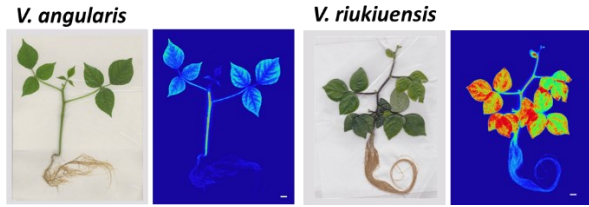


Figure 1. Photographs and Autoradiographs of the Plants Fed with ²²Na.

3.2 葉肉細胞の電子顕微鏡観察

次に、*V. riukiensis* の葉肉細胞内に何らかの特徴的な構造があるのかどうかを調査するため、電子顕微鏡によって葉肉細胞を観察した。その結果、*V. riukiensis* の葉緑体中に発達したデンプン顆粒が多数観察された他は、*V. angularis* との間に大きな違いは見られなかった (Figure 2)。

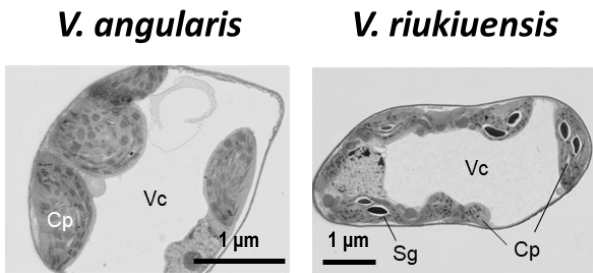


Figure 2. SEM Images of the Leaf Cells .

3.3 デンプン顆粒と Na 蓄積の関係

では、デンプン顆粒の形成と Na 蓄積との間に何らかの相関はあるのだろうか。それを検証するために、一部の葉を遮光することでデンプン顆粒の形成を阻害し、その上で ²²Na を用いたトレーサー実験を行った。まず、アルミニウム箔で葉を遮光した場合、24 時間の遮光で葉のデンプン顆粒はほぼ失われることが明らかとなった (Figure 3)。

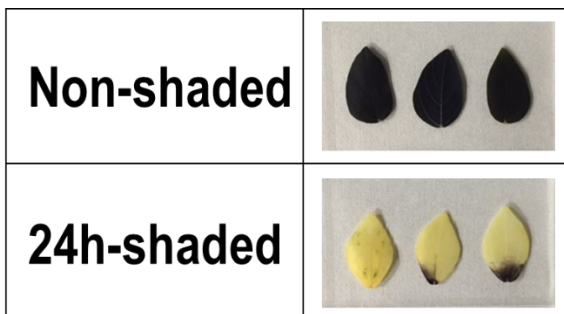


Figure 3. Starch-iodine Staining of Shaded and Non-shaded Leaves.

続いて、一部の葉を 24 時間遮光した植物体に ²²Na を吸収させたところ、遮光した葉では顕著に Na 蓄積が減少することが明らかとなった (Figure 4)。

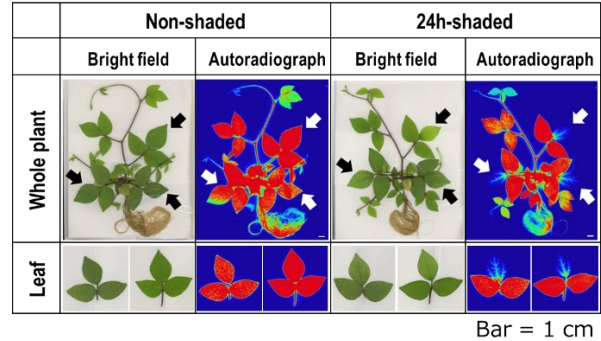


Figure 4. Photographs and Autoradiographs of Shaded and Non-shaded Plants of *V. riukiensis*.

3.4 SEM-EDX

最後に、SEM-EDX によって *V. riukiensis* の葉肉細胞内における Na の分布を分析した。その結果、葉緑体中のデンプン顆粒の周囲に高密度で Na が分布することが明らかとなった (Figure 5)。

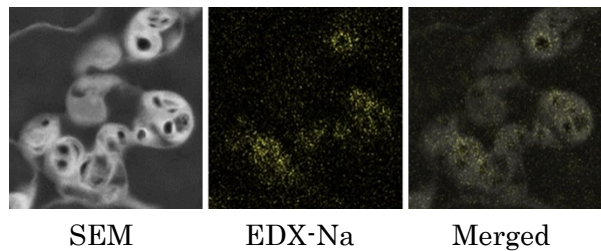


Figure 5. Na Distribution Revealed by SEM-EDX .

以上の結果から、*V. riukiensis* は葉に Na 吸着作用をもつデンプン顆粒を形成することで、葉に流入した Na を無害化することができると考えられた。これは、沖縄諸島の沿岸部という、台風による高潮や潮風に曝されやすい環境において、植物体内の急激な Na 濃度上昇による悪影響を緩和するのに有効だと考えられた。

参考文献

[1] <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164711>
 [2] <https://doi.org/10.1270/jsbbs.22012>
 [3] <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0272-0>

[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^{B)}, 山田尚人^{B)}, 山縣諒平^{B)}, 佐藤隆博^{B)}, 河地有木^{B)}
 Masato Igura^{#,A)}, Nobuo Suzui^{B)}, Yong-Gen Yin^{B)}, Yuta Miyoshi^{B)}, Kazuyuki Enomoto^{B)},
 Masashi Koka^{B)}, Naoto Yamada^{B)}, Ryohei Yamagata^{B)}, Takahiro Satoh^{B)}, Naoki Kawachi^{B)}

^{A)} Institute for Agro-Environmental Science,
 National Agriculture and Food Research Organization
^{B)} Takasaki Advanced Radiation Research Institute,
 National Institutes for Quantum Science and Technology

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, the rate of decrease in radioactive cesium signal in nodule under high-concentration potassium (+K) was lower than that in root and stem, possibly due to their involvement in both accumulation and transport of radioactive cesium. Under low-concentration potassium (-K) conditions, radioactive cesium was released from the nodule, but the radioactive cesium signal in the stem was not significantly increased.

Keyword: soybean, root nodule, radioactive 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],[3]}。

今回は PETIS 実験の反復試験により得られたデータを解析し、大豆根系内の放射性セシウム輸送挙動におけるカリウム共存の詳細な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無添加(-K 条件)および通常濃度(+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}Cs 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。

3. 結果と考察

PETIS によるチェイス実験時の ^{127}Cs イメージング像を Fig.1 に示した。-K 条件では、根および根粒等の根系全域で顕著な ^{127}Cs 分布が確認されたが、+K 条件においては根粒部分で顕著な分布が確認され、根部分の ^{127}Cs 分布は -K 条件と比較して不明瞭であった。

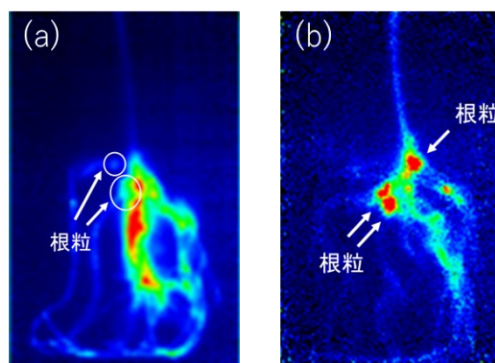


Figure 1. Real-time Imaging by PETIS on ^{127}Cs Uptake in Soybean Roots and Nodules (Chase experiment).

(a): Potassium-free condition (-K condition).

(b): Normal potassium concentration (+K condition).

[R3-2]

根、茎部分の ^{127}Cs シグナル(輝度値, IntDen/10mm²)の経時変化を Fig.2, 3 にそれぞれ示した。根および茎部分の -K および +K 条件における ^{127}Cs シグナル値には、それぞれ 10 倍程度の顕著な差がみられ、-K 条件で高い値を示した。

-K 条件において、根部分の ^{127}Cs シグナル値は時間経過とともに徐々に減少する傾向がみられた。水耕液内の ^{127}Cs シグナル値(ブランク)に明確な増加は見られず、茎部分(Fig.3 Stem①(-K)、Stem②(-K))の ^{127}Cs シグナルが徐々に増加していることから、根組織内から地上部への顕著な輸送が確認された。一方、+K 条件の根および茎部分の ^{127}Cs シグナルはともに明確な増減は確認されなかった。

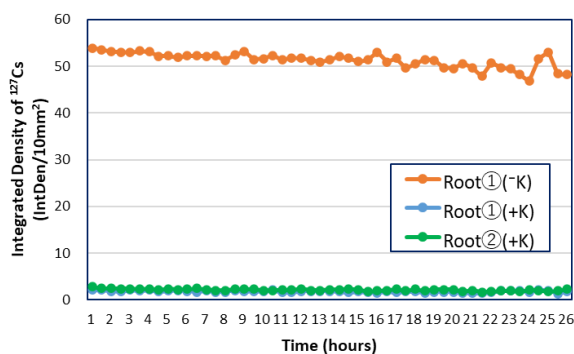


Figure 2. Integrated Density of ^{127}Cs for Soybean Roots Located below the Liquid Surface (Chase experiment (-K and +K condition)).

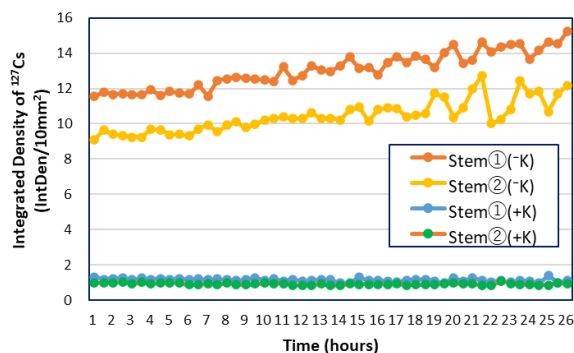


Figure 3. Integrated Density of ^{127}Cs for Soybean Stems (Chase experiment (-K and +K condition)).

根粒部分の ^{127}Cs シグナル(輝度値, IntDen/10mm²)の経時変化を Fig.4 に示した。-K および +K 条件では ^{127}Cs シグナル値に数倍程度の差がみられ、-K 条件で高い値を示した。また、-K および +K 条件における ^{127}Cs シグナル値の差は、根>根粒の関係にあり、+K 条件においても根粒内部にセシウムが蓄積しやすい事が示唆された。

-K 条件において、根粒部分の ^{127}Cs シグナル値は時間経過とともに徐々に増加する傾向がみられた。前回の報告において、根粒は根からの内部輸送により ^{127}Cs を蓄積していることを確認しており、根による ^{127}Cs 吸収が促進される -K 条件では、顕著な ^{127}Cs 蓄積挙動を示すと考えられた。一方、+K 条件では、

根粒部分の ^{127}Cs シグナルは、わずかではあるが減少傾向を示すことが確認された。水耕液内の ^{127}Cs シグナル値(ブランク)に明確な増加は見られず、根粒組織内に蓄積された ^{127}Cs が根を經由した地上部への輸送により消費された可能性が示唆された。しかし、+K 条件の茎部分の ^{127}Cs シグナルに明確な増減は確認されず、地上部への ^{127}Cs 輸送量は極めて小さいと考えられた。

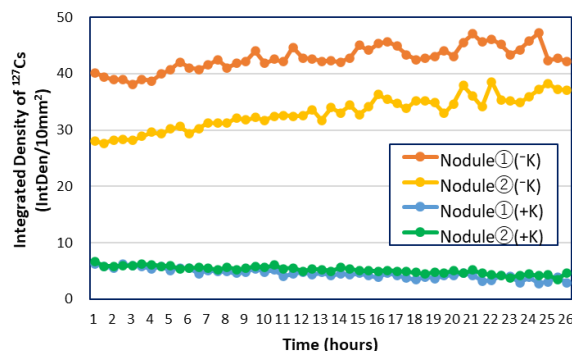


Figure 4. Integrated Density of ^{127}Cs for Soybean Nodules Located below the Liquid Surface (Chase experiment (-K and +K condition)).

今回のリアルタイムイメージング解析により、カリウム存在条件の異なる大豆根系の各部位(根、根粒、茎)における ^{127}Cs シグナルを解析し、地上部への ^{127}Cs 輸送における根および根粒組織の影響について検討した。-K および +K 条件の部位別 ^{127}Cs シグナル値の差は、根および茎部分がそれぞれ 10 倍程度と類似しており、地上部への ^{127}Cs 輸送には根組織の関与が極めて大きいと考えられた。一方、根粒部分の -K および +K 条件における ^{127}Cs シグナル値の差は数倍程度で根より小さく、放射性セシウムの蓄積と輸送の両方に関与しているためと考えられた。また、前回の解析では、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ており、根と根粒組織内では放射性セシウムの挙動が顕著に異なることが明らかとなった。

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, 鈴井伸郎, 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
- [3] 井倉将人, 鈴井伸郎, 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, 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, 2021 年度連携重点研究成果報告書, 2022

[R3-2]

4. Micro-PIXE/PIGE 法を用いた茶葉の Al とその他の元素の相関に関する研究

4. Correlation between Al and Other Elements in Tea Leaves Using Micro-PIXE/PIGE Method

安田啓介^{#A)}, 山田尚人^{B)}, 山縣諒平^{B)}, 石井保行^{B)}, 鈴木伸郎^{B)}, 佐藤隆博^{B)}, 河地有木^{B)}

Keisuke Yasuda^{#A)}, Naoto Yamada^{B)}, Ryohei Yamagata^{B)}, Yasuyuki Ishii^{B)},

Nobuo Suzui^{B)}, Takahiro Sato^{B)}, Naoki, Kawachi^{B)}

^{A)} Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University

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

Abstract

Elemental analysis of the epidermis of tea leaves was performed using the using micro-PIXE/PIGE method. The ratios of the X-ray or γ -ray yields of Si, K, Ca, Mn and F to that of Al in the cell wall of epidermal cells of tea leaves were determined. The ratio of Si to Al X-ray yields agreed within a range of 11% in the four samples measured in this study. On the other hand, the ratio of the X-ray or γ -ray yields of K, Ca, Mn and F to Al varied from 20% to 87%. This result suggests that Al forms compounds with Si in tea leaves.

Keyword: tea leaves, Al, 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。

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^[1]。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。一方、チャはフッ素 (F) の高集積植物でもあるため、フッ

素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 などの元素分布測定を開始した。この測定では F 以外の元素は 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。Al が他の元素と化合物を形成する場合、濃度の比が常に一定となることが期待される。そこで、今年度は元素濃度の比から茶葉中で Al がどのような元素と化合物を形成しているかを調べたので報告する^[2]。

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 7 か月以上のサミドリ、ヤブキタ 2 品種の茶葉を使用した。クライオマイクロトーム (LEICA CM1860) を用いて、茶葉の断面を葉脈の垂直方向に厚さ 20 μ m で切り出し、これを凍結乾燥装置 (JEOL JFD-320) で約 10 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、 $^{19}F(p,\alpha\gamma)^{16}O$ 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 4X4H/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 μ m \times 1 μ m、ビーム電流は 50~100 pA だった。測定領域は 50 μ m \times 100 μ m 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

[R3-2]

ものを Figure 1 に示す。

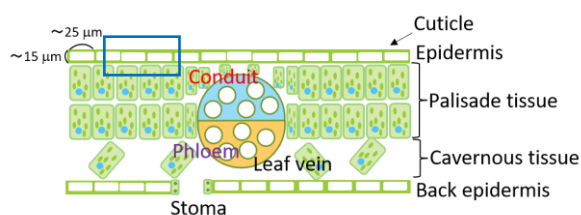


Figure 1 Schematics of the Cross Section of Tea Leaf. Measurement region is shown by blue box.

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。いずれの試料からも Al, Si, P, S, K, Ca, Mn 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、900 ch 付近のピークがこれらのガンマ線に相当する。

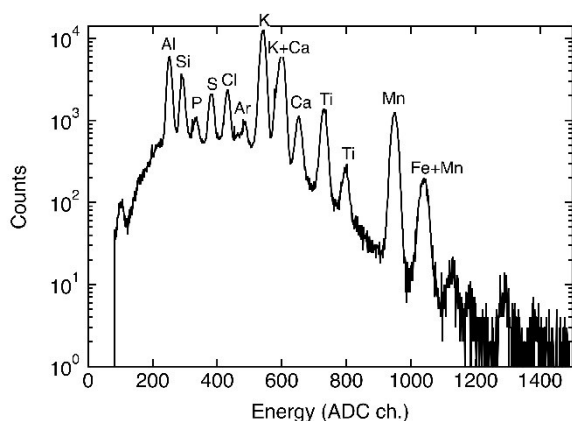


Figure 2 X-ray Energy Spectrum Obtained with Si(Li) Detector.

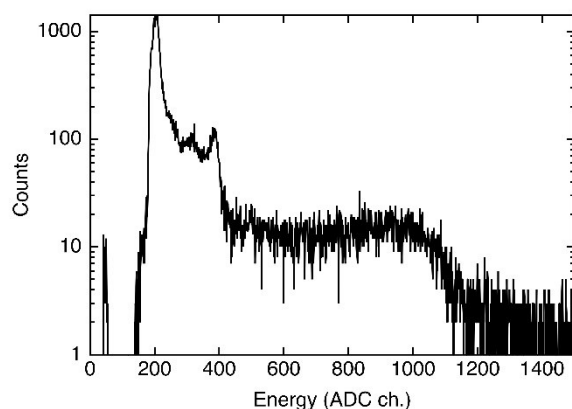


Figure 3 γ -ray Energy Spectrum Obtained with NaI(Tl) Detector.

茶葉の中で Al が他の元素と化合物を形成しているなら、Al と化合物を形成している元素の元素比は一定の値をとると考えられる。PIXE あるいは PIGE 測定での X 線、 γ 線のカウント数はその元素の濃度に比例する。そのため、Al の X 線カウント数と他の元素の X 線、 γ 線のカウント数の比も一定となるはずである。本研究では 4 試料について Al が多く分布する表皮細胞の細胞壁部分での Al に対する Si, K, Ca, Mn, F のカウント数の比とその標準偏差、変動係数を調べた。結果を Table 1 に示す。

Table 1 Ratios of the X-ray Yields of Si, K, Ca, Mn to the X-ray Yield of Al for Four Samples. Mean, standard deviation (σ), and coefficient of variation (CV) are also presented.

	mean	σ	CV
Si/Al	0.486	0.054	0.11
K/Al	2.03	0.828	0.41
Ca/Al	0.180	0.073	0.41
Mn/Al	0.208	0.180	0.87
F/Al	0.031	0.006	0.20

Si/Al の変動係数は 0.11 であるのに対し、K/Al, Ca/Al, Mn/Al の変動係数は 0.41~0.87 と大きな値で合った。これは測定した茶葉の表皮細胞の細胞壁における Al と Si の原子数の比が 10%程度の範囲で一致していることを示しており、Al と Si が化合物を形成している可能性を示唆している。一方 K, Ca, Mn については変動係数が大きく化合物形成の可能性は低いと考えられる。F については、F/Al の変動係数が 0.20 という値が得られた。ただ、F は PIGE 法で測定しておりカウント数が他の元素に比べて極端に少ないため、変動係数の値の誤差も他の元素に比べて大きいと考えられる。今後より高統計の測定が必要であると考えている。

参考文献

- [1] <https://doi.org/10.3390/qubs3020009>
- [2] K. Yasuda, N. Yamada, R. Yamagata, Y. Ishii, N. Suzui, T. Satoh, and N. Kawachi, "Study on Chemical Forms of Aluminum in Tea Leaves using Micro-PIXE Method", Int. J. PIXE, accepted.

[R3-2]

5. 茶葉におけるストロンチウムおよびバリウムの局所的集積特性の解明

5. Evaluation of Elemental Concentration and Localization of Strontium and Barium in Tea Leaf

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 Science and Technology

Abstract

The spatial distribution of Ca, Sr and Ba in tea-leaves was measured using a micro-PIXE analysis to reveal the characteristics of the concentration and translocation in tea-leaves (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) for these elements, and to study similarities and differences among them. We confirmed that those three elements concentrated in the leaf samples as small dots. While we observed Ca, Sr and Ba were mainly in the same dot areas, dot areas with high concentrations of Ca and Sr and low concentrations of Ba were also observed, suggesting characteristics of Ba accumulation different from those of Ca and Sr.

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

1. はじめに

2011年3月の福島第一原子力発電所事故による植物の放射性物質汚染を背景として、我々は、日常的に消費する茶葉を対象に、安定 Cs および Sr を添加栽培した茶葉の 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、我々は、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、さらには同族元素間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てマイクロ PIXE 分析を行った。その結果、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 と同様に茶葉に一樣に分布し、Sr は経時的变化を経て、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、それぞれ一樣およびスポット状の集積を確認された^[2]。上記の結果より、本年度の研究では、Ca と Sr に対して確認された同一の局所領域に多数のスポット状に集積する特徴が、アルカリ土類元素に共通するものかどうかを明らかにするために、新たに Ba を葉面吸収した茶葉についてもマイクロ PIXE 分析を行った。

#atsuki.terakawa@tohoku.ac.jp

2. 実験方法

茶葉試料は昨年度と同様に、鉢植え栽培した市販のやぶきた茶の苗木 (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) から採取した。ただし、安定 Sr および Ba 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、塩化ストロンチウム水溶液と塩化バリウム水溶液の濃度を決定した。葉面からの一樣な吸収を考慮し、塩化ストロンチウム水溶液 (57.8 g/L) および塩化バリウム水溶液 (47.5 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) された。

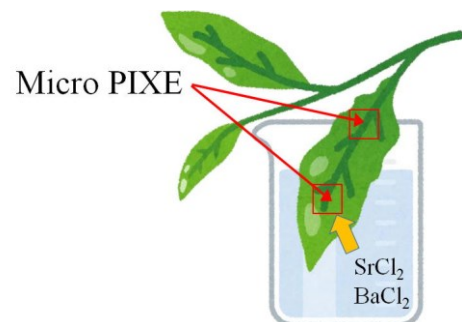


Figure 1. Foliar Absorption of Sr and Ba into Tea Leaves.

[R3-2]

3. 結果及び議論

茶葉試料からの X 線スペクトル例を Figure 2 に示す。葉面吸収によって取り込まれた Sr と Ba の特性 X 線のピークが確認された。また、葉面吸収なしの茶葉では Ba のピークは認められず、Sr についても顕著なピークではなかった。Ba および Sr は天然に存在し茶葉内にも経根吸収でそれらを取り込まれるが、分析結果に影響する程の濃度ではないことを確認した。

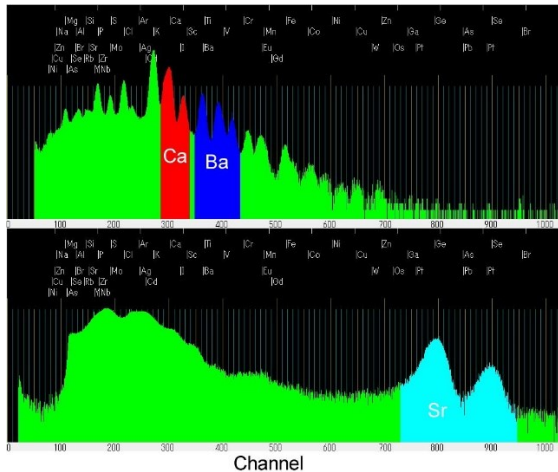


Figure 2. X-ray Spectra for Tea Leaf Samples with Foliar Absorption.

葉面吸収後 30 日経過した茶葉試料について、マイクロ PIXE 分析によって得られた Ca, Sr および Ba の空間濃度分布（元素マップ）を Figure 3 に示す。Ca と Sr が多数のスポット状領域に集積する性質は昨年度の結果でも判明していたが、今回の分析により、全体の傾向として Ba も Ca と Sr とともに同じスポット領域に集積することが確認された。よって、スポット状の元素集積はこれらの 3 つのアルカリ土類元素に共通する性質であると考えられる。なお、葉面吸収 3 日後の試料の元素マップでは、昨年と同様に Sr と Ba は Ca ほど顕著なスポット状には集積しておらず、Figure 2 の状態になる前の過程と考えられる。

一方、Ba の集積傾向が Ca と Sr の傾向と異なる茶葉試料も確認された。Figure 4 は葉面吸収後 30 日経

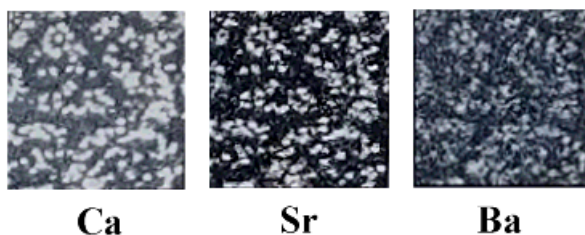


Figure 3. Spatial Distribution of Ca, Sr and Ba in the Foliar-applied Region of the Tea Leaf Sample. Almost all of dot areas show high concentration of Ca, Sr and Ba.

過した異なる茶葉試料のマイクロ PIXE 分析の結果を示す。この試料では Ca と Sr は Figure 2 と同様に同一のスポット領域に高集積していることが確認できるが、Ba はスポット状に集積しているものの、一部を除いてほとんどのスポット状領域で低濃度であり。明らかに Ca および Sr と異なる傾向が認められた。したがって、この結果は、Ba の集積に Ca や Sr と異なる特性が存在する可能性を示唆するのかもしれない。

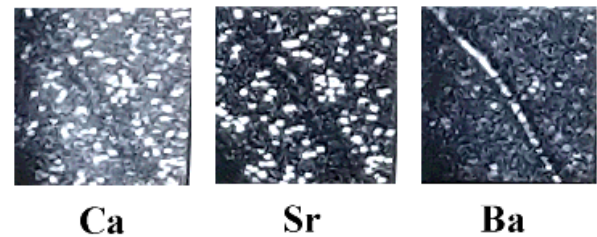


Figure 4. Spatial Distribution of Ca, Sr and Ba in the Foliar-applied Region with Dot Areas Containing Low Concentration of Ba.

4. 結論

茶葉に葉面吸収された Ca, Sr および Ba を対象としたマイクロ PIXE 分析で、これら 3 つの元素がスポット状分布を形成し、しかも同一のスポット内に集積することが確認された。スポット状集積の形成はアルカリ土類元素に共通する性質と考えられる。一方、Ba のみ低濃度のスポット状集積の茶葉試料も確認され、Ca, Sr と異なる Ba の集積特性を示唆するものかもしれない。現状では分析例が少なく限られた結果であるので、さらに分析を継続する必要がある。

参考文献

- [1] <https://doi.org/10.1142/S0129083518500195>
- [2] <https://doi.org/10.1142/S0129083520500059>

[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)}, 木島あやの^{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)}, Ayano Kijima^{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 previous studies have demonstrated that glutathione applied to oilseed rape plants site-specifically influence behaviors of heavy metal such as cadmium, copper, and zinc. However, so far, the molecular mechanisms of these phenomena are not fully understood. To elucidate the molecular mechanisms of these phenomena, it is necessary to monitor the behaviors of these elements in roots and to clarify 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 mainly in the upper part of roots from oilseed rape plants. We have successfully visualized the distribution of copper in the root tissue of oilseed rape plants when plants were treated with 100 μM copper. Future application of experimental results obtained in this study is expected to elucidate the molecular mechanism triggered by glutathione applied to plants site-specifically.

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生合成されるペプチドである。グルタチオンはファイトケラチンの前駆体として機能する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なニーズに応える付加価値の高い作物の作出に結び付く。このような作物の利用によって、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様々な効果が期待できる。しかし、グルタチオンが誘導する植物体内における重金属元素動態制御に関与する分子機構は十分に解明されているとはいえない。植物体内における重金属元素の組織内分布を明らかにすることはこれらの分子機構解明の端緒となり得る。

本研究では植物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 法を用いる。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、複数元素を同時に定性・定量分析することができる^[3]。また、この手法を用いることによって細胞レベルで高解像度の元素分布像を得ることもできる。今年度は、前年度の検討実験によって得られた知見を活かして、グルタチオンの施用効果が確認されている銅と亜鉛のアブラナ根における組織内分布を撮像するためのイメージング実験に取り組んだ。

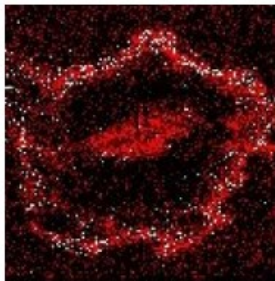
2. 実験手法

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。水耕栽培することによって、Micro-PIXE 実験用の根サンプルを容易に得ることができる。アブラナは畑作物である。そのため、アブラナの水耕栽培はエアレーションを行いながら実施した。水耕栽培時には水耕液は週に2回の頻度で交換した。銅動態を観察する実験では根サンプリング前の2日間、水耕液の銅濃度を100 μM にして、処理を行った。処理後のアブラナから、銅イメージング実験用の根サンプルを採取した。また、亜鉛動態を観察する実験ではサンプリング前の10日間、水耕液の亜鉛濃度を10 μM または30 μM にして、処理を行った。これは、グルタチオンの施用実験で最も効果がみられた処理期間に合わせたためである^[2]。処理後のアブラナから、亜鉛イメージング実験用の根サンプルを採取した。

[R3-2]

植物の根では根の上部と先端部では生理活性が異なることが知られている。そこで、今回の実験では根の上部および根の先端部分から測定用試料を調製した。今回は収穫した根の上部を用いて、イメージング実験を行った結果を紹介する。収穫した植物根は新鮮な状態で凍結切片作成用の樹脂(Cryomatrix, epremedia)に浸潤・包埋した。凍結切片作成時まで各サンプルは -80°C で凍結保存した。切片作成の数時間前に凍結切片を -80°C から -30°C に移し、切片作成用試料の硬度を下げておいた。切片作成装置(クリオスタット Leica CM1520, Leica)を用いて凍結した各サンプルを $30\ \mu\text{m}$ 厚または $60\ \mu\text{m}$ 厚にスライスし、凍結切片を作成した。スライス後の切片をポリカーボネートフィルムに取り付けた。このフィルムを 45°C のプレートに載せ、試料中の余分な水分を速やかに除去した。水分除去後に作成した切片の画像を顕微鏡観察し、完成度を確認した。計測を行う切片をホルダーに固定した。測定装置に測定サンプルをセッティングした後、各切片に $3\ \text{MeV}$ の水素イオンビームを照射した。イオンビームの照射によって、切片中に含まれる様々な元素から放出される特性 X 線を測定した。得られたデータを画像解析ソフト PIXEana を用いて解析し、銅、亜鉛などの注目している元素のアブラナ根における組織内分布を可視化した。

A.



B.

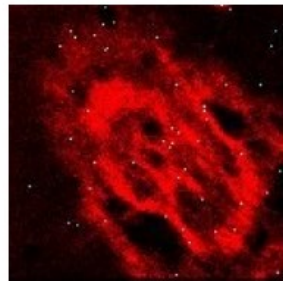


Figure 1. Copper, Zinc and Potassium Distribution Images in the Upper Roots from Oilseed Rape Plants Obtained by Micro PIXE. (A) Copper and potassium imaging. Distribution of copper (cyan) and potassium (red) in the upper roots of plants treated with $100\ \mu\text{M}$ copper for 2 days. (B) Zinc and potassium imaging. Distribution of zinc (cyan) and potassium (red) in the upper roots of plants treated with $10\ \mu\text{M}$ zinc for 10 days.

3. 実験結果と考察

アブラナ根への部位特異的なグルタチオンの施用効果が確認されている 2 日間の $100\ \mu\text{M}$ の銅処理を行ったアブラナ根の上部から作成した輪切り切片及び 10 日間の $10\ \mu\text{M}$ の亜鉛処理を行ったアブラナ根の上部から作成した輪切り切片を作成して、銅、亜鉛及びカリウムの元素分布を調べた。

銅処理、亜鉛処理を行ったいずれのアブラナの根でも通気孔の存在を確認できた(Figure 1A, 1B)。この

ような通気孔の存在は根先端部では見られなかった。 $100\ \mu\text{M}$ の銅処理を行ったアブラナの根上部から作成した輪切り切片では、通気孔の部分を除く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できた(Figure 1A)。また、カリウムも通気孔の部分を除く根の組織に全体的に広がって分布している様子を観察できた。この結果は根先端部とも同様であった。高濃度の銅処理を行った場合、アブラナ根では銅は根の組織に全体的に広がって分布していることが明らかになった。

10 日間の $10\ \mu\text{M}$ の亜鉛処理を行ったアブラナの根上部から作成した凍結切片(輪切り)で亜鉛分布の観察を試みた(Figure 1B)。根組織の輪郭部分に亜鉛のシグナルがわずかに検出できた(Figure 1B)。前年度の実験では、 $30\ \mu\text{M}$ 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。高濃度で根圏に存在する重金属元素は、植物にとってストレスとなる。銅やカドミウムの実験とは異なり、亜鉛動態に影響を及ぼすグルタチオンの施用効果は植物が重金属ストレスを受けていない状況で確認できたものである。そのため、亜鉛動態制御に関する実験の条件設定からするとできるだけ低濃度の亜鉛の存在下で亜鉛の組織内分布を可視化できる実験系を確立することが望ましい。今後、より高感度で亜鉛を検出するためには、測定サンプル(凍結切片)の調製方法、照射エリア、サンプル照射時間などいくつかの測定条件を最適化していく必要がある。

4. まとめ

今年度実施した Micro-PIXE 実験によって、アブラナ根上部の輪切り切片より、画像データを得ることができた。作成した切片の顕微鏡観察の結果、根上部は根先端部とはその形態が異なっていることが確認できた。2 日間の $100\ \mu\text{M}$ の銅処理を行ったアブラナの根上部の銅の組織内分布も明らかにすることができた。これまでに鮮明に可視化できた重金属元素の実験結果から判断すると、Micro-PIXE 実験は重金属ストレスの耐性機構を明らかにするために高濃度の重金属元素処理を行う時の方が鮮明な画像データが得られる可能性が高い。

次年度以降にはカドミウムの組織内分布の可視化に取り組み、グルタチオンがアブラナ根におけるカドミウム動態に及ぼす影響を可視化できたらと考えている。その一方で、切片調製方法や照射時間の最適化によって、これまでよりも高感度で根における銅、亜鉛、カドミウムなど重金属元素分布を可視化できる測定条件を試行錯誤しながら模索していきたい。

参考文献

- [1] <https://doi.org/10.1093/jxb/ers388>
- [2] <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.10.018>
- [3] <https://doi.org/10.3769/radioisotopes.68.643>