[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), 鈴井伸郎 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 Radiation, Isotopes, and Earth System Sciences, 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, however, it was also suggested that B-129 had low activity of iron (Fe) translocation from root to shoot. The results of gene expression analysis revealed that, 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 within the vascular tissue in the root of B-129 obtained by Micro-PIXE analysis. This B-129 specific Fe accumulation was not observed after 5 days low Fe treatment, suggesting accumulated Fe was slowly translocated under low Fe supply condition from the nutrient solution. Recently, Fe deficiency-related small peptide, IMAs, were identified and its transfer from shoot to root might be involved in the signal transduction in Fe homeostasis. By the comparison of gene expression levels of *LjIMA1*, *LjIMA2* and *LjIMA3* in root, there were no significant difference between two cultivars. These results suggested the shoot IMA expression might be highly related Fe homeostasis regulation in *L. japonicus*.

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]。

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[1, 2]による実験も組み合わせて行うことを目的としている。

本年度も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継続して行った。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ている[3]。シロイヌナズナで報告された先行研究から B-129 の地上部で鉄が欠乏し、その結果として複数元素の蓄積が誘導されていると予測し、根における鉄輸送機構の発現制御が両系統でどのように異なるか、また鉄欠乏

#furukawa.jun.fn@u.tsukuba.ac.jp

[R3-2]

条件での栽培で根の鉄局在がどのように変化す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 週齢の植物に対し、鉄濃度を 1/10 として栽培した鉄欠乏区を設け、5 日間処理した後、凍結切片を作成し Micro-PIXE 法による鉄の局在解析を行った。

3. 結果と考察

これまでの大気 Micro-PIXE 法による鉄の局在解析から、B-129 の根において中心柱にある維管束組織に鉄が蓄積していることを明らにしている。また導管内で鉄イオンはクエン酸とキレート化合物を形成して根から地上部へ輸送されるが、そのクエン酸を導管内に積み込む機能を持つ FRD3 輸送体をコードする遺伝子の発現量が B-129 で MG-20 の半分程度に抑制されていることも見出している。これは B-129 の根において導管内のクエン酸量が不足することで鉄イオン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 法による鉄局在解析の結果を支持するものである。

鉄欠乏 5 日の根を用いて大気 Micro-PIXE 法による鉄の局在解析を行ったところ、維管束組織の鉄蓄積が認められなくなっていた(Figure 1)。この結果は、

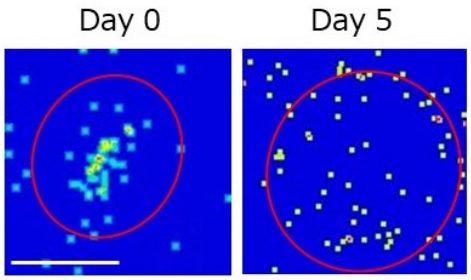

Figure 1. Iron localization images in B-129 root obtained by Micro-PIXE analysis. Red circles show root area and bars indicate 200 µm. 4-week-old plant samples were treated with low Fe conditions for 0 or 5 days.

5 日間の鉄欠乏処理により、水耕液から吸収され、表層細胞から根の中心にある維管束まで向心的に運ばれる鉄が減少したことと、維管束に蓄積していた鉄はそのままとどまらずに地上部などへと徐々に輸送されたことを示唆しており、MG-20 に比べて B-129 の地上部への鉄の輸送速度が遅いことが維管束への鉄蓄積の主な原因であることを示している。

また、本実験条件の鉄標準区では、*IRT1*、*IRT3*、*FRO2*、*NAS1* といった植物の鉄吸収や体内輸送に関わる遺伝子が B-129 で MG-20 よりも約 3 倍の発現量を示すことも明らかにしている。これらの遺伝子の発現制御を担うメカニズムとして近年、IMA という短鎖ペプチドが注目されている。ミヤコグサには IMA をコードする冗長性を持った 8 種の遺伝子が存在するとされており、そのうちの 1 種の発現誘導で鉄吸収・輸送関連遺伝子の発現が誘導される[4]。そのうちの *LjIMA1*、*LjIMA2* そして *LjIMA3* について対照区の根で発現解析を行ったところ、*LjIMA2* の発現量が最も高く、*LjIMA1* の約 250 倍、*LjIMA3* の約 5 倍であった(Figure 2)。しかしながら、MG-20 と B-129

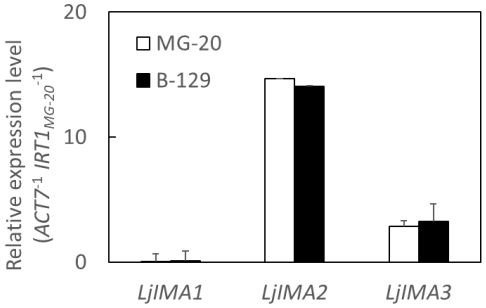

Figure 2. *IMA*s expression in MG-20 and B-129 root obtained by RT-qPCR. The expression levels of *LjIMA1, LjIMA2 and LjIMA3* were normalized by *ACT7* and *IRT1* expressions in MG-20.

の間に発現量の有意差がなく、先の B-129 における *IRT1* などの発現誘導を説明する候補は得られていない。IMA は地上部組織で発現し、篩管を介して根へと移動することで器官間のシグナル伝達を担っていると報告されていることから[5]、発現ならびに受容組織が重要である可能性も高く、今後鉄欠乏条件下での地上部における IMA の発現解析を行うことで更なる情報が得られるものと考えている。

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] https://doi.org/10.1038/s41467-024-44865-4
[5] https://doi.org/10.1093/pcp/pcy145

[R3-2]

2. ハマササゲにおける SOS 経路を介したナトリウム排出の日周依存制御

2. Diurnal Regulation of SOS Pathway and Sodium Excretion in *Vigna marina*

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 and Radiological Science and Technology
[C)] Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

Abstract

Vigna marina (Barm.) Merr. is adapted to tropical marine beaches and has an outstanding tolerance to salt stress. Given there are growing demands for cultivating crops in saline soil or with saline water, it is important to understand how halophytic species are adapted to the saline environments. Here we sequenced the whole genome of *V. marina* with longreads, and performed a forward genetic study to identify QTLs involved in salt tolerance. As the QTL region harbored *SOS1*, encoding plasma membrane Na^+/H^+ antiporter, we traced the sodium dynamics in *V. marina* using the positron emitting tracer imaging system (PETIS) and revealed that it actively excretes sodium from the root. In addition, the sodium excretion was faster in the light period and slower in the dark period, indicating it is under diurnal regulation. The following comparative transcriptome analyses revealed that the SOS pathway plays a key role in the diurnal regulation of sodium excretion. Furthermore, we demonstrated that, under a condition of mild salt stress, the plants with the diurnally regulated SOS pathway outperformed those with the constitutively activated one.

Keyword: Vigna marina, salt tolerance, ^{22}Na, whole genome sequencing, QTL, transcriptome

1. はじめに

ハマササゲは *Vigna* 属の中でも最も優れた耐塩性をもつ種であり、熱帯・亜熱帯の砂浜では最も海よりの植生を形成するものの一つである。これまでに、^{22}Na を用いた BAS イメージングおよび PETIS の結果から、ハマササゲは根からの Na 排出能力が高く、そのため植物体内の Na 蓄積量を低く保てることが示唆されている。さらに、根からの Na 排出は明期に多く、暗期には少ないという日周性があることも明らかになった。

しかしながら、根からの Na 排出や日周性はハマササゲに特有の特徴なのか。さらには、この現象の背後にはどのような遺伝子が関わっているのか。これらの問題を明らかにするため、我々は PETIS の他に遺伝解析、ゲノム解読・およびトランスクリプトーム解析を行った。

2. 材料と方法

2.1　材料

V. angularis (An: 耐塩性極低)、*V. luteola* の河岸型エコタイプ（Lr: 耐塩性低）、*V. luteola* の海岸型エコタイプ (Lb; 耐塩性高)、および *V. marina* (Ma: 耐塩性極高)の 4 系統を使用した。種子はいずれも NARO ジーンバンクより提供された。

2.2　PETIS

まず、上記の材料を水耕条件で 2 週間栽培した。続いて、50 mM NaCl・3 日間の塩順化処理を施し、さらに ^{22}Na を含む 100 mM NaCl で 24 時間処理をすることで植物体に ^{22}Na を取り込ませた。その後、根を洗浄したうえで ^{22}Na を含まない 100 mM NaCl の水耕液を満たした容器に移して PETIS をセットアップし、48-72 時間にわたって撮像を行った。

2.3　QTL 解析

Ma と Lb の交雑によって得られた 280 個体の F2 を 350 mM NaCl の塩ストレス下で 4 週間栽培し、葉の萎凋度をスコア下して各個体の表現型とした。同時に ma の全ゲノム解読と F2 個体群の RAD-seq を行い、各個体の遺伝子型を取った。これら表現型と遺伝子型のデータを用い、QTL 解析を行った。

2.4　トランスクリプトーム解析

Lr、Lb および Ma の 3 系統については、塩ストレス処理の開始から 24・36・48・60 時間後にそれぞれ根と葉をサンプリングして RNA-seq を実施した。塩ストレス処理を行わない対照区でも同様の操作を行った。An については 24 および 36 時間後のみサンプリングした。

2.5　シロイヌナズナの形質転換

CaMV35S プロモーターで *SOS1* および *SOS2* を過剰発現させられる 35Spro:*SOS1*/35Spro:*SOS2* をインサートにもつコンストラクトと CaMV35S プロモーターで SOS1 を過剰発現、概日遺伝子 PRR9 遺伝子のプロモーターによって明期にのみ SOS2 を発現させられる 35Spro:*SOS1*/PRR9pro:*SOS2* をインサートにもつコンストラクトの 2 種類を作成し、それぞれをシロイヌナズナの sos1/sos2 二重変異体に導入した。

これら 2 種類の形質転換体を、野生型および sos1/sos2 個体とともに 25 mM NaCl を含む水耕液で栽培し、地上部および地下部の乾物重を測定し、対照区との相対値を算出した。

[#]knaito@affrc.go.jp

[R3-2]

3. 結果と考察

3.1 Na 排出の系統間比較

PETIS による根からの Na 排出量には明瞭な差が見られた一方、日周性については Lr、Lb、Ma の 3 系統で保存されていることが明らかとなった（図 1）。Na 排出量は耐塩性をもつ Ma と Lb で高く、耐塩性をもたない Lr と An では明らかに少なかった。一方、元々 Ma で観察されていた Na 排出が明期に増加し、暗期に減少する日周性については、Lb だけでなく Lr でも観察された。An は排出が少ないだけでなく、日周性も見られなかった。

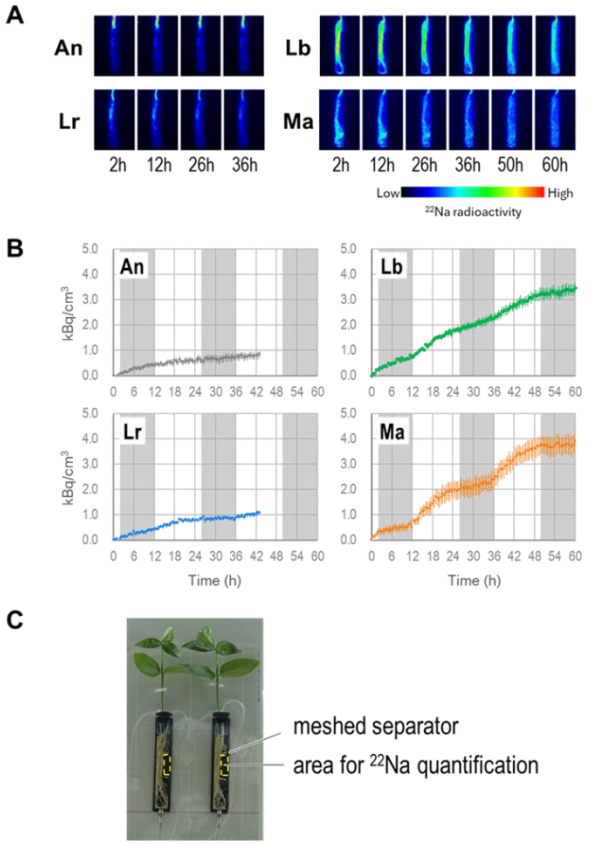

Figure 1. Dynamics of sodium excretion in *V. marina* and other accessions. A. Time-lapse of ^{22}Na mapping. An, Lr, Lb and Ma indicate *V. angularis, V. luteola* (river), *V. luteola* (beach), and *V. marina*, respectively. B. Relationships between time and the estimated concentration of ^{22}Na in the hydroponic culture. Each plot is labeled in the same way as in A. C. Set up of the PETIS. The area enclosed by the yellow line indicates the area where the separator prevented the roots from interfering with collecting data of hydroponic solution.

3.2 QTL 解析

Ma と Lb の交雑集団を用いて耐塩性に関する QTL 解析を行った結果、第 1 染色体上に最も効果の大きい QTL が同定され、しかもこの領域には *SOS1* が座乗することが明らかとなった（図 2）。なお、Ma の全ゲノム配列はナノポアシーケンサーで解読し、11 本の染色体全てを再構築することに成功した。

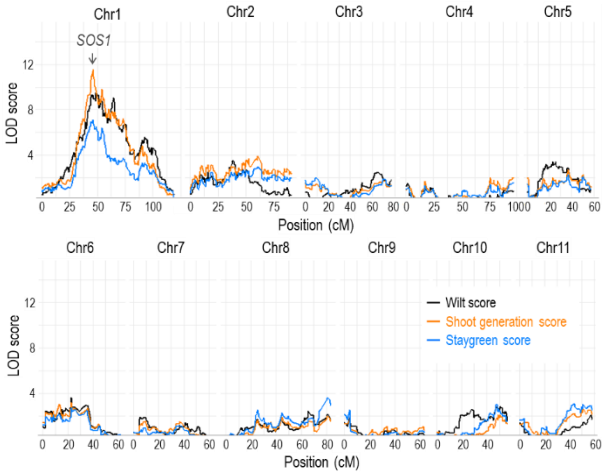

Figure 2. QTL genome scan of *V. marina* on salt tolerance-related phenotypes.

3.3 トランスクリプトーム解析

An、Lr、Lb および Ma について、塩ストレス開始 24 時間後から 12 時間おきに 4 回サンプリングした根の RNA-seq を行った。その結果、*SOS1* 遺伝子の発現量と耐塩性との間には強い正の相関が見られた（図 3）。An では *SOS1* の発現量は低く、塩ストレスによる誘導も見られなかった。Lr では An より高いものの、塩ストレスによる誘導は僅かに見られた程度であった。Lb では対照区では Lr との発現量と同等だったものの、塩ストレスによって速やかに発現が上昇した。Ma では対照区でも発現が高く、塩ストレスによってさらに増加した。

しかしながら、*SOS1* の発現量のみでは Na 排出の日周性までは説明できない。そこで、リン酸化を介して *SOS1* を活性化するプロテインキナーゼ *SOS2* の発現データを抽出した（図 3）。その結果、Lb、Lr および Ma において *SOS2* の発現量は明期に上昇して暗期に低下するという明瞭な日周性を示した。一方、An では明期・暗期間の発現量に有意な差はなかった。

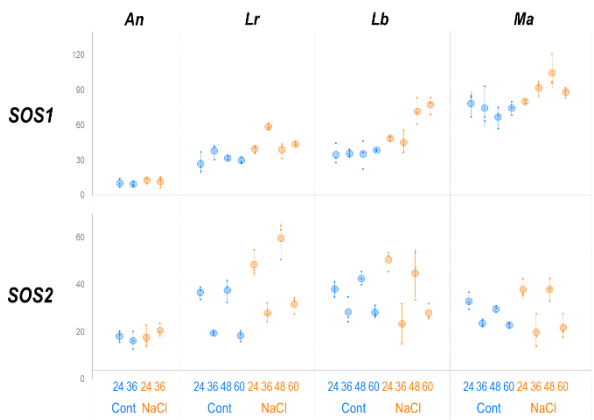

Figure 3. Expression patterns of *SOS1* and *SOS2* in the 4 accessions.

以上から、4 系統間の Na 排出の量や日周性の違いが、*SOS1* と *SOS2* の 2 遺伝子の発現様式で決定されることが示唆された。特に *SOS1* は QTL 領域に座乗し、またその発現量は根からの Na 排出量だけでなく、植物体の耐塩性そのものとも強く相関していることから、*SOS1* は各系統の Na 排出ポテンシャルを決定する遺伝子であることが示唆された。また、明期の *SOS2* 発現上昇は *SOS1* を活性化して Na 排出を促進する一方、暗期の発現現象は *SOS1* を不活化して Na 排出を抑制することが示唆された。

3.4　Na 排出の日周制御と生育との関係

SOS2 発現の日周性が Lr、Lb、Ma で保存されていたことから、この日周性には何らかの生物学的意義があると考えられた。そこで、シロイヌナズナの *sos1/sos2* 二重変異体を背景として、*SOS1* と *SOS2* の両方を 35S プロモーターによって過剰発現させた形質転換体（*35Spro::SOS1/35Spro::SOS2*）と、*SOS1* を過剰発現、*SOS2* を概日遺伝子の一つである *PRR9* 遺伝子のプロモーターによって明期にのみ発現させた形質転換体（*35Spro::SOS1/PRR9pro::SOS2*）を作成し、塩ストレス条件下での根の生育を、対照区との相対乾物重によって評価した。

その結果、*35Spro::SOS1/PRR9pro::SOS2* 最も高い値を示した（図 4）。*sos1/sos2* 二重変異体では対照区に比べて根の相対乾物重が約 0.5 だったのに対し、形質転換体はいずれも対照区よりも高い生育を示した。さらに、*35Spro::SOS1/PRR9pro::SOS2* の根の相対乾物重は、*35Spro::SOS1/35Spro::SOS2* のそれよりも有意に高くなった。

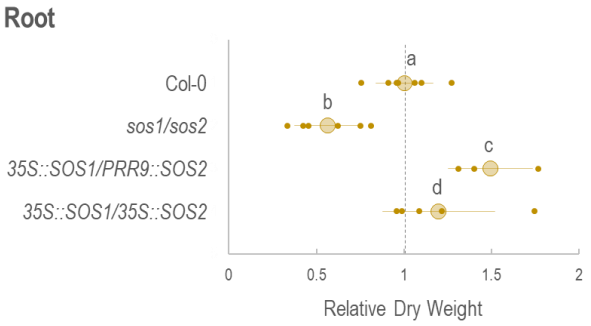

Figure 4 Relative dry mass of Arabidopsis plants with various *SOS1/SOS2* expression patterns.

以上から、暗期に *SOS2* 遺伝子の発現を低下させ、Na 排出を抑制することは、耐塩性機構の駆動に消費されるエネルギーを最小限に抑え、生育を維持することに寄与すると考えられた。

参考文献

[1] https://doi.org/10.1270/jsbbs.22012
[2] https://doi.org/10.1101/2024.03.26.586888

[R3-2]

4. Micro-PIXE/PIGE 法を用いた茶葉の Al と Si, K, Ca の相関に関する研究

4. Correlation between Al and Si, K, Ca, Mn 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), 鈴井伸郎 B), 佐藤隆博 B), 河地有木 B)
Keisuke Yasuda #,A), Naoto Yamada B), Ryohei Yamagata B), Yasuyuki Ishi 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 and Radiological 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 yields of Si, K and Ca to that of Al in the cell wall of epidermal cells of tea leaves were determined. Measurements of samples collected at three different times showed no significant differences in the x-ray ratios of these elements by collection time.

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などの障害を引き起こす。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、アルミニウムー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[1,2]。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。また、同一日に採取した 4 試料において、表表皮付近の Al と Si の X 線収量の比が 10%の範囲で一致した。これは、測定した試料では茶葉の表表皮において Al と Si の原子数比がほぼ一定であったことを示唆している。この結果を踏まえて、今回は採取時期が異なる試料を用いて表皮付近の Al と Si, K, Ca の X 線収量の比を調べたので報告する。

2. 実験

2.1　試料

試料には 2022 年 8 月および 2021 年 12 月に京都府立茶業研究所で採取したサミドリ、ヤブキタ 2 品種の茶葉を使用した。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 5 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

#yasuda@kpu.ac.jp

[R3-2]

4X4H4/3.5A）でそれぞれ検出した。測定時のビーム径はおよそ 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、主に表皮付近を測定した。Figure 1 に茶葉断面と測定領域を模式的に表した図を示す。2022 年 8 月に採取した 6 試料と 2021 年 12 月に採取した 1 試料の測定を行った。

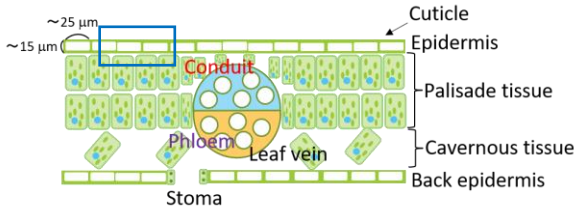

Figure 1. Schematics of the cross section of tea leave. Measurement region is shown by blue box.

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。いずれの試料からも Al, Si, P, S, K, Ca, Mn が検出された。

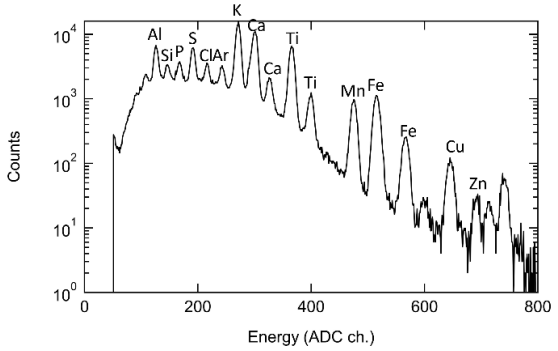

Figure 2. X-ray energy spectrum obtained with Si(Li) detector.

これらの元素の 2 次元分布を Figure 3 に示す。Ca の分布は K_β線、F の分布は $^{19}F(p,\alpha\gamma)^{16}O$ 反応で発生するγ線、それ以外の元素は K_α線のイベントでそれぞれ作成した。Al と Si, Mn は表皮細胞の細胞壁付近に局在して分布することがわかる。K と Ca も表皮細胞の細胞壁付近に多く存在するが、内部の葉肉部分にも存在する。一方、P と S は葉肉部分に多く含まれることがわかる。

以降の解析では、Al のカウント数が多い部分を切り出し、その部分での各元素の X 線カウント数を求めた。さらに Al の X 線カウント数に対する他元素の X 線カウント数の比を求めた。2022 年 8 月採取の 6 試料についての、Si, K, Ca の X 線カウント数の Al X 線カウント数に対する比を Figure 4 に示す。これらの値から求めた平均値と標準偏差、および変動係数を Table 1 に示す。

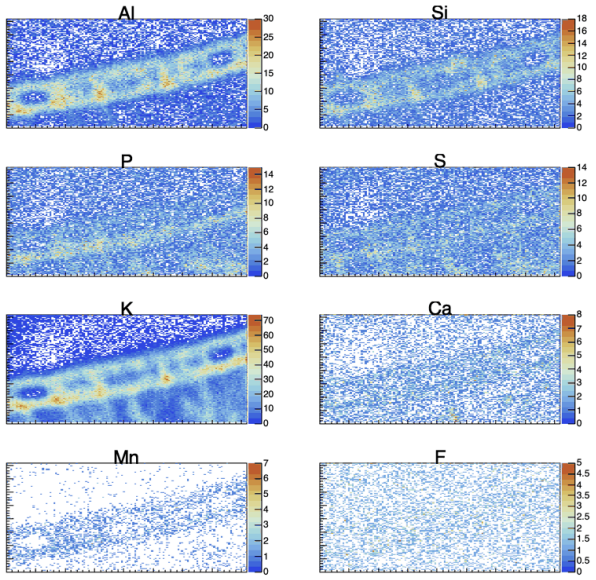

Figure 3. Elemental distributions of Al, Si, P, S, K, Ca, Mn and F for the tea leaf sample. The color bars indicate the number of X-ray counts. Measurement area is 100 μm×50 μm.

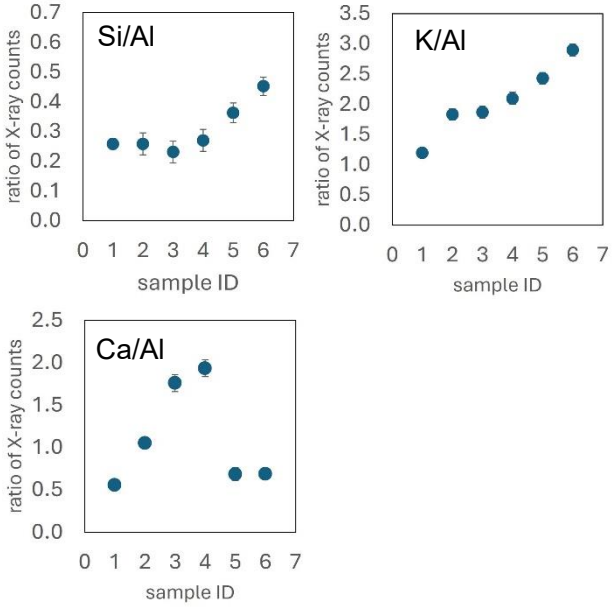

Figure 4. Ratio of Si, K, Ca X-ray counts to Al for each sample collected in August 2022. Error bars show statistical errors.

[R3-2]

Table 1. Mean Values of the Ratios of the X-ray Yields of Si, K, Ca to the X-ray Yield of Al for Samples Collected in August 2022.

	mean	σ	CV
Si/Al	0.306	0.085	0.28
K/Al	2.05	0.58	0.28
Ca/Al	1.05	0.53	0.50

Standard deviation (σ) and coefficient of variation (CV) are also presented.

標準偏差を平均値で割った変動係数の値は Si/Al と K/Al が 0.28 で、同一日に採取した試料間でのばらつきは同じであった。一方。Ca/Al の変動係数は 0.50 で、Si/Al と K/Al に比べて高い値となった。これは K/Al の値の試料ごとのばらつきが他に比べて 2 倍弱大きいことを示している。

次に、2022 年 8 月採取試料と 2021 年 12 月採取試料、それに昨年度の報告書で報告した 2022 年 10 月採取試料の Al の X 線カウント数に対する Si, K, Ca の X 線カウント数の比を Figure 5 に示す。横軸は試料採取年月、縦軸は Al に対する各元素の X 線カウント数の比を表す。X 線カウントの比は複数の試料の値の平均値で誤差棒は標準偏差を表す。2021 年 12 月採取試料については 1 試料のみの測定で標準偏差が 0 のため誤差棒はない。

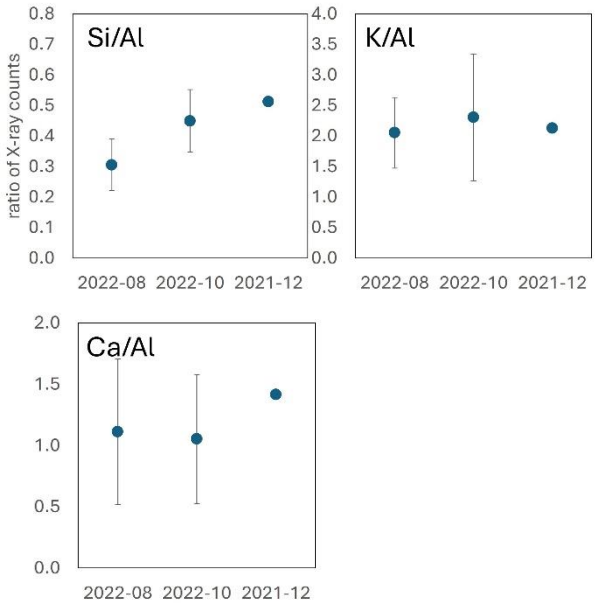

Figure 5. Mean ratio of Si, K, Ca X-ray counts to Al for samples collected in August 2022, October 2022 and December 2021.

茶葉は 4 月ごろに芽吹くため、Figure 5 の横軸はおおよその葉の生育期間を表すと考えると、Si/Al の値は生育期間とともに大きくなっているように見える。しかし、2021 年 12 月のデータは 1 試料のみの測定であるため試料ごとのばらつきの評価ができない。2022 年 10 月の値は同年 8 月の値より大きいものの、標準偏差も同程度であるため有意な差があるとは言えない。また、K/Al、 Ca/Al については、生育期間の違いによる差は標準偏差に比べると小さい。以上から、 茶葉の表皮付近における Si, K, Ca の Al に対する原子数の比の生育期間による変化は、個体ごとの変化に比べて大きくないことがわかった。これは茶葉に含まれる元素の原子数比を比べる際に、試料の採取時期は結果に大きく影響しないことを示唆している。

参考文献

[1] https://doi.org/10.3390/qubs3020009
[2] https://doi.org/10.1142/S012908352350002X

[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 II

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

寺川貴樹 A), 帆足莉子 A), 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), 鈴井伸郎 C), 佐藤隆博 C), 河地有木 C)
Atsuki Terakawa A), Riko Hoashi A), 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) Research Center for Accelerator and Radioisotope Science, 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 investigated the spatial distributions of alkaline earth elements (Mg, Ca, Sr and Ba) in tea leaves using micro particle-induced x-ray emission (micro-PIXE) analysis to explore the characteristics of the concentrations and translocations of them in tea leaves. We examined samples of tea [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze] leaves in which Ba and Sr were taken up via foliar absorption, while Mg and Ca were absorbed through roots as usual. We observed that Ca, Sr and Ba accumulated in almost the same narrow locations, and that Mg was almost uniformly distributed throughout tea leaves, suggesting that there are the similarities and differences in the concentration properties of alkaline earth elements in tea plants.

Keyword: Tea leaf (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), Calcium, Strontium, Barium, Magnesium, Micro-PIXE

1. はじめに

チェルノブイリや福島で起きた原子力発電所事故後、トルコと日本の茶栽培地域における ^{134,137}Cs による茶樹の汚染は詳細に調査されてきた[1-6]。一方、原子力災害時に環境中に放出されやすい放射性 Cs 以外にも、事故の状況によっては発がんの原因として懸念される放射性 Sr の放出が伴う可能性もある。これまでの放射性物質で汚染された茶葉の研究は、主に茶葉中の Cs の放射能と、単一の茶樹内での古い茶葉から新しい茶葉への Cs の移動に焦点を当てていた。 環境中に放出された ^{90}Sr の量は放射性 Cs よりも少なかったため、茶樹中の ^{90}Sr を調べた研究はほとんどない。さらに、茶葉中の ^{90}Sr の空間濃度分布に関する情報もほとんどない状況である。

我々は、茶葉における Cs と Sr の空間濃度分布とともに、アルカリ土類元素である両元素の集積特性の共通性や差異を明らかにする目的で、安定 Cs と Sr を葉面吸収させた茶葉試料のマイクロ PIXE 分析を行ってきた[7]。その結果、Sr は Ca とともに茶葉中の多数の微小な局所領域に集積し、Cs は K と同様に葉サンプル全体にほぼ一様に分布していることがわかり、同種元素間に共通の集積特性が存在することが示唆された。本研究では、さらに安定 Ba を移行させた茶葉サンプルのマイクロ PIXE 分析を実施し、アルカリ土類元素の集積特性をより対象を広げ詳細に解明することを目的とした。

2. 実験方法

茶葉試料準備のため、やぶきた茶 (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) の苗木を市販の園芸用土壌を用いて植木鉢で栽培した。そして、$BaCl_2$ (47.45 g/L) と $SrCl_2$ (57.8 g/L)の混合水溶液に茶木上部の複数の新芽の茶葉を 1 分間浸して安定 Ba と Sr を茶葉へ葉面吸収させた。なお、各水溶液の濃度ついては、元素の移行係数 0.01 を仮定し茶葉内で 100 μg/g オーダーの濃度（マイクロ PIXE で容易に検出される濃度）になるように決定した。葉面吸収から 30 日後に茶葉を採取し、表面を 1 分間流水洗浄した後に凍結乾燥した。茶葉の中央部の約 3×3 mm の部分を切り出し、高崎量子応用研究所のマイクロ PIXE 分析システム[8, 9]を用いて茶葉内の元素濃度分布（スキャン範囲 800×800 μm）を取得した。

3. 結果及び議論

茶葉からの X 線スペクトルの例を Figure 1 に示す。

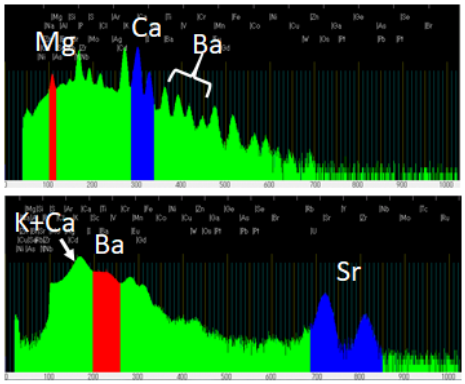

Figure 1. Energy spectra for x-rays emitted from a tea leaf sample with foliar-applied Sr and Ba measured using Si(Li) (top) and HPGe (bottom) detectors. The region of interest for creating a spatial distribution of each element is shown in red or blue.

#atsuki.terakawa@tohoku.ac.jp

[R3-2]

低エネルギー及び高エネルギー領域を Si(Li)と高純度 Ge 検出器でそれぞれ測定した。アルカリ土類元素に関して、葉面吸収させた Ba と Sr の他に、土壌より経根吸収された天然由来の Ca と Mg の特性 X 線が計測された。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が取り込まれるが、分析結果に影響する程の濃度ではないことを確認した。各アルカリ土類元素のピーク領域に ROI を設定し茶葉試料における元素の空間濃度分布（元素マップ）を得た。Ba に関しては Si(Li)と Ge の両検出器で X 線ピークが測定されているが、検出効率の高い Ge 検出器で取得されたデータから元素マップを作成した。なお、Ge 検出器の方が分解能では劣るが他元素の X 線イベントが混入しないように ROI を設定した。

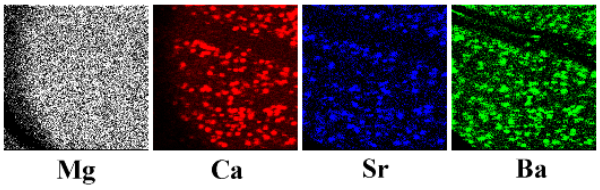

Figure 2. Spatial distributions of Mg, Ca, Sr and Ba in the foliar-applied region of the tea leaf sample collected 30 days after foliar absorption.

Figure 2 に Mg, Ca, Sr, 及び Ba の元素マップをそれぞれ白、赤、青、緑で示す。Ba は Ca や Sr の場合と同様に非常に多数のドット状微小領域に集積していることが判明した。一方、Mg は対照的に試料全域にほぼ一様な濃度で分布し、Ca や他のアルカリ土類元素とは全く異なる元素集積特性を示すことが確認された。Mg と Ca は植物中の主要なアルカリ土類元素であるが、生物学的機能には大きな違いがある。Mg は植物の多くの生化学的プロセスに関与し、ATP アーゼ、RNA ポリメラーゼ、プロテインキナーゼなどの多くの生物学的機能に不可欠な元素である[10-11]。それに対して Ca は主に細胞レベルで構造的役割に関与し、ペクチン重合を通して植物組織の強度維持に寄与している[12]。よって、Mg が葉の全領域に一様に分布し、Ca が多数の微小な局所領域に集積する顕著に異なる集積特性は、元素機能の違いと関連していることが示唆される。

Figure 3 は Figure 2 の Ca, Sr 及び Ba の元素マップを重ねた元素マップである。もし、Ca (赤)と Ba (緑)が同じ領域に集積すればその領域は黄で表示される。同様に Sr (青)と Ba (緑)が同じ領域に集積すれば水色で、3 つの元素が同じ領域に集積すれば白で表示される。PIXE 分析の結果、Ca, Sr, Ba は基本的に同一のドット状局所領域に集積していることが確認された。よって、Sr と Ba は茶葉において Ca と類似する元素動態及び集積特性を持つことが強く示唆される。

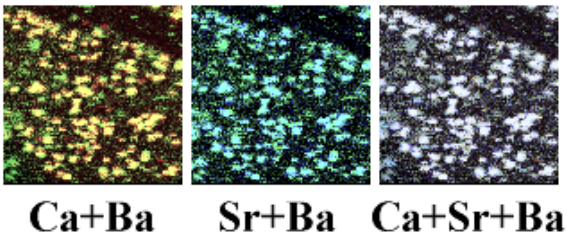

Figure 3. Overlaid images of the spatial distributions of Ca, Sr and Ba shown in Fig.3.

4. 結論

茶葉に葉面吸収された Ba と Sr の元素マップをマイクロ PIXE 分析により評価した。その結果、Ba と Sr はともに Ca が蓄積している多数の同一のドット状局所領域に蓄積し、Mg は茶葉試料の全域にほぼ一様に集積することが確認された。アルカリ土類元素間でこのような顕著な集積特性の違いは、茶葉中での各元素の生化学的役割の違いと関連することが示唆される。

参考文献

[1] M. Scott et al., “Comments on internal dose resulting from drinking Turkish tea harvested in 1986”, Health Phys. 57 205–206 (1989).
[2] M. Ünlü et al., “Natural effective half-life of ^{137}Cs in tea plants”, Health Phys. 68(1), 94–99, 1995.
[3] S. Topçuoğlu et al., “Translocation and depuration of ^{137}Cs in tea plants”, J. Radioanal. Nucl. Chem. 218(2), 263–266, 1997.
[4] https://doi.org/10.1080/00380768.2014.1003191
[5] https://doi.org/10.1080/00380768.2015.1004993
[6] https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2015.10.011
[7] https://doi.org/10.1142/S0129083520500059
[8] https://doi.org/10.1016/j.nimb.2005.01.043
[9] T. Sakai et al., “External scanning proton microprobe: A new method for in-air elemental analysis”, J. Nucl. Radiochem. Sci. 6, 1, 69–71, 2005.
[10] Orit Shaul, Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg, Bio Metals 15, 309–323, 2002.
[11] https://doi.org/10.1111/nph.18410
[12] M. C. Jarvis, “Structure and properties of pectin gels in plant cell walls”, Plant Cell Environ., 7, 153-164, 1984.

[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)],木島あやの [A)], 湯澤拓 [A)],鈴井伸郎 [B)], 尹永根 [B)], 三好悠太 [B)], 野田祐作 [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)], 石井保行 [B)],河地有木 [B)]
Shin-ichi Nakamura [#, A)], Ayano Kijima [A)], Taku Yuzawa [A)], Nobuo Suzui [B)], Yong-Gen Yin [B)],
Yuta Miyoshi [B)], Yusaku Noda [B)], Kazuyuki Enomoto [B)], Masashi Koka [B)], Naoto Yamada [B)],
Ryohei Yamagata [B)], Takahiro Sato [B)], Yasuyuki Ishii [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 cadmium mainly in the roots from oilseed rape plants. We have successfully visualized the distribution of cadmium in the root tissue of oilseed rape plants when plants were treated with 100 μM cadmium. 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, cadmium

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生理活性ペプチドである。グルタチオンは活性酸素の除去やファイトケラチンの前駆体としてなどの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。一方、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た付加価値の高い作物の作出に結び付く。作出された作物の農業での利用は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)作物の栽培など様々な効果が期待できる。しかし、グルタチオンが関与する植物体内における重金属元素動態制御の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(主に根)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、複数の元素の組織内における二次分元分布とその存在量を同時に分析できる[3]。また、この方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可能である。

今年度は、これまでの予備的な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カドミウム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主に取り組んだ。

2. 実験手法

実験材料にはアブラナ(*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水耕栽培した。今回の実験では実験材料の植物の栽培期間は 4 週間とした。アブラナは畑作物である。そのため、アブラナの水耕栽培では常にエアレーションを行い、根に空気を供給しながら実施した。水耕栽培時には改変ホグランド水耕液は週に 2 回の頻度で交換した。水耕栽培によって、Micro-PIXE 実験用の根サンプルを容易に得ることができる。根におけるカドミウムの組織内分布を観察する実験では根サンプリング前の 2 日間、水耕液のカドミウム濃度を 100μM にして、カドミウム処理を行った。処理後のアブラナから、Micro-PIXE 実験用の根サンプルを採取した。

植物の根では根の上部と先端部では生理活性が異なる。今回の実験ではまずは根の先端部分を用いて

#sn206169@nodai.ac.jp

測定用試料を調製した。今回の報告書では根の先端部分を用いて、Micro-PIXE 法による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, epredia)に浸潤・包埋した。実験用の試料作成時まで採取した各サンプルは-80℃で凍結保存した。切片作成の数時間前に凍結切片を-80℃から-30℃に移し、切片作成用試料の硬度を調整した。切片作成装置(クリオスタット Leica CM1520, Leica)を用いて、各サンプルを 60 μm 厚にスライスし、凍結切片を作成した。スライス後の凍結切片をポリカーボネートフィルムに取り付けた。試料中に残っている水分は再現性の良い測定の妨げになることがこれまでの Micro-PIXE 実験で明らかになっている。そこで、この凍結切片を接着させたポリカーボネートフィルムを 45℃のプレートにのせ、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、試料の完成度を確認した。作成した試料へのイオンビームの照射は量研機構高崎研の照射施設で行った。測定を行う作成した切片をホルダーに固定した後、測定装置にセッティングした。各測定試料に 3 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、切片中の様々な元素から放出される特性 X 線をモニタリングした。得られたデータを画像解析ソフト PIXEana を用いて解析し、カドミウム、硫黄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.

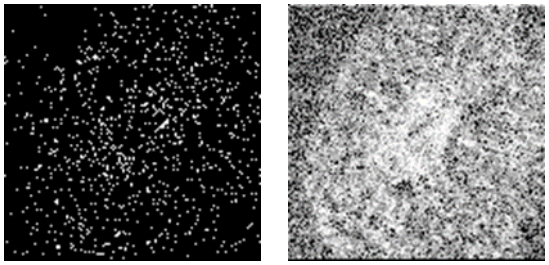

Figure 1. Cadmium and sulfur distribution images in the roots from oilseed rape plants obtained by Micro-PIXE experiments. (A) Cadmium imaging. Distribution of cadmium in the roots of plants treated with 100 μM cadmium for 2 days. (B) Sulfur imaging. Distribution of sulfur in the roots of plants treated with 100 μM cadmium for 2 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 日間のカドミウム処理を行った。今回の実験では根組織におけるカドミウムの二次元分布を調べることが第 1 目標である。そこで今回の実験ではアブラナへのカドミウムの処理濃度を 100 μM とした。このカドミウム処理を行ったアブラナ根先端部から作成した(輪切り)切片を用いて、Micro-PIXE 実験を実施した。

100 μM のカドミウム処理を行ったアブラナの根先端部分から作成した切片でカドミウムの組織内分布を確認することができた(Fig.1A)。また、同じ切片で硫黄の二次元分布を観察した(Fig.1B)。硫黄は根組織に一様に分布していた。硫黄の根組織における二次元分布の可視化と比べると不鮮明であるが、カドミウムも根組織に一様に分布していた。今回、作成した切片ではカリウムも根組織に一様に分布していることを確認している。根組織におけるカリウムの可視化の実験結果は、根の細胞の形状も確認できるような鮮明な画像が得られた。

このような結果から根組織で高濃度で存在する元素に関しては十分に鮮明な画像が得られることが明らかになった。また、これまでに行った実験の結果から、重金属元素も高濃度の処理を行うことで鮮明な画像が得られることを確認している。あまりに高濃度な重金属処理は植物の生理的機能(重金属体積機構)を損なう要因となり得る。根の状況をモニタリングしながら、重金属処理を行う必要がある。今後、より鮮明に根におけるカドミウムの二次元分布を可視化するためは、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条件の最適化が必要である。

4. まとめ

今年度に実施した Micro-PIXE 実験によって、アブラナ根先端部分の切片より、カドミウムの根組織における二次元分布の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、カドミウム処理をした植物の根でも根先端部と根上部ではその形態が異なっていた。次年度以降は根の上部におけるカドミウムの二次元分布も可視化していきたいと考えている。

Micro-PIXE 実験は(重金属)元素ストレスの耐性機構を明らかにするような特定の元素を高濃度で処理する実験で可視化対象元素の鮮明な画像データが得られる。次年度以降も引き続き根組織におけるカドミウムの二次元分布の可視化に取り組む。そして、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したいと考えている。加えて、切片調製方法や照射時間などの最適化を行う。これらの取り組みによって、銅、亜鉛、カドミウムなどの重金属元素を現在よりも鮮明に可視化できる測定条件を模索していきたい。

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