

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 Radiation, Isotopes, and Earth System Sciences, University of Tsukuba

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

Abstract

In 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. To identify the effect of low Fe treatment in both lines, Fe localization was investigated with Micro-PIXE analysis. After the 5 days low Fe treatment, Fe localization was not detected in stem and root of both lines, indicating the 5 days treatment was enough to induce the Fe deficiency in *L. japonicus*. 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. Therefore, the analysis of IMA expressions under 0 to 5 days low Fe treatment might reveal the Fe homeostasis regulation in *L. japonicus*.

Keyword: *Lotus japonicus*, Micro-PIXE, 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。

小テーマ 1 では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、その副次的な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

[R6-2]

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 日あるいは 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、鉄濃度をさらに 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、3 MeV に加速した H^+ 照射による 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、上記の栽培条件で生育した鉄欠乏処理前の植物では、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かにしている。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。

鉄欠乏処理による鉄の減少を明らかにするために、根と茎を対象に鉄の局在解析を実施したところ、鉄欠乏処理 5 日目のミヤコグサでは、両系統ともに根および茎における明瞭な鉄の局在を可視化することができなかった。特に茎においては根からの鉄供給が十分になされていると考えられる鉄欠乏処理前の MG-20 のみにおいてシグナルを確認することが可能であり (Figure 1)、また維管束などの組織が判別できるような局在は示さなかったことから、ミヤコグサの茎においては根のような維管束に特異的な鉄局在パターンを有していないことが明らかとなった。

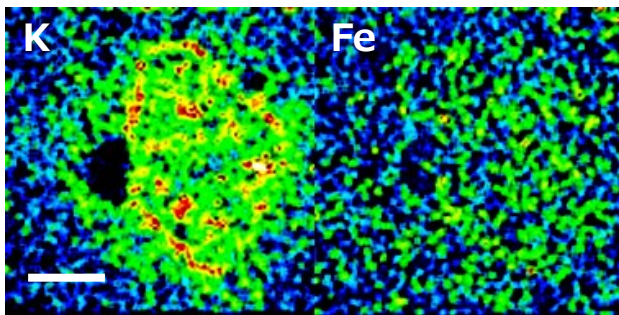


Figure 1. Potassium and iron localization images in MG-20 stem obtained by Micro-PIXE analysis. The left panel shows K distribution indicating stem shape and the right panel shows the Fe localization in the same sample. White bar indicates 200 μ m.

これらの結果から、鉄欠乏処理 5 日より両系統とも鉄濃度の減少が起こっていることが示され、特に MG-20 では茎で、B-129 では根における減少が顕著であることが示唆された。先行研究により、植物

の鉄欠乏応答は組織的な鉄濃度の減少よりも先に生じることが報告されていることから、5 日間の鉄欠乏処理はミヤコグサにおける鉄欠乏応答の誘導に十分な期間であると考えられ、MG-20 の地上部において鉄欠乏に応答して根における鉄吸収関連遺伝子の発現を促進するシグナル伝達ペプチドである IMA の発現が誘導が期待される。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]。今後 0-5 日間の鉄欠乏条件下での地上部における IMA 群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>

2. 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

— 茶葉内カルシウム 2 次元空間分布に対する点過程解析 —

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

— Point Process Analysis of Two-dimensional Calcium Spatial Distributions in Tea Leaves —

寺川貴樹^{A)}, 宮田健吾^{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)}, 鈴木伸郎^{C)}, 佐藤隆博^{C)}, 河地有木^{C)}

Atsuki Terakawa^{A)}, Kengo Miyada^{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 Science and Technology

Abstract

The micro-PIXE analysis of tea leaves revealed that Ca, Sr and Ba accumulate in almost the same dot-like pattern. To clarify the characteristics of the dot-like accumulation, the two-dimensional spatial distribution of Ca dot-like accumulation was compared with the two different point distributions generated by the Poisson point process and the Ginibre point process. Preliminary results suggested that the distribution of Ca has intermediate characteristics between the two point processes.

Keyword: Tea leaf (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), Micro-PIXE, Calcium, Alkaline earth elements, Point process

1. はじめに

我々はマイクロ PIXE 分析により、茶葉における Ca の集積が非常に多くの微小な点状に集積することに加えて、他のアルカリ土類元素についてもマイクロ PIXE 分析を行い、Mg を除くアルカリ土類金属元素 (Sr, Ba) も Ca とほぼ同じ箇所に集積する共通した点状の集積特性を示すことを明らかにした^[1, 2]。2024 年度では、茶葉内のアルカリ土類元素の点状集積において、集積点の間に何らかの相関があるのか、あるいは全く相関がないランダムな集積なのかなど、統計的性質を解明することを本研究の目的とし、マイクロ PIXE 分析結果に対する点過程 (point process) 解析を実施した。

2. 実験および解析方法

2.1 マイクロ PIXE 分析

茶葉試料としては、市販のやぶきた茶 (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) の苗木を園芸用土壌を用いて植木鉢で栽培した茶葉を用いた。そして、BaCl₂ (47.45 g/L) と SrCl₂ (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、各水溶液の濃度については、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、高崎量子技術基盤研究所のマイクロ

PIXE 分析システム^[3, 4]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。

2.2 2 次元点過程解析

マイクロ PIXE 分析で得られた元素マップの Pixel カウント数をもとに多数の点状集積領域を K-means clustering algorithm^[5]を用いて認識し、それらの重心から元素マップ上の元素集積点の位置を決定した。なお、Sr と Ba の点状集積の位置はほぼ Ca と同じ場所であるため Ca のみ解析した。得られた集積点の位置は 2 次元点過程により生成された点の分布と比較した。点過程の方法としては、各々の点の間に相関が無い無作為な点の配置を形成する Poisson 点過程と、各点の間に相関が有る分布を作るために複素ランダム行列^[6]の固有値の複素平面上の分布 (Ginibre 点過程) を用いた。

Poisson 点過程では、ある円内の領域を対象とする場合、円内の重なりが無い有界領域 Δ_i (面積 v_i) の点の個数が $N(\Delta_i) = n_i$, ($i = 1, \dots, m$) となる確率分布関数が、

$$\prod_{i=1}^m P(N_i) = \prod_{i=1}^m \left\{ \frac{(\rho v)^{n_i}}{n_i!} e^{-\rho v} \right\}$$

により与えられる。十分大きな点の数まで考えると、数密度の平均値は ρ となり i に依存せず一様分布となる。点同士に相関が無いため非常に接近した複

数の点が発生することがあり、分布に粗密が存在するように見えるが、それらは“ゆらぎ”によるものと解釈される。

一方、Ginibre 点過程では、実部と虚部がそれぞれ独立に平均値 0、標準偏差 $1/\sqrt{2}$ の正規分布に従う複素数を行列要素とする $N \times N$ 複素ランダム行列を考える。その複素固有値 $z_i = x_i + iy_i$ について、複素平面上におけるその確率分布は、

$$p(z_1 \cdots z_N) \prod_{i=1}^N dx_i dy_i \\ \propto \prod_{i=1}^N e^{-|z_i|^2} \prod_{i < j}^N |z_i - z_j|^2 \prod_{i=1}^N dx_i dy_i$$

となる。 $|z_i - z_j|^2$ の因子が含まれているため点同士が近接するような偶然の偏りが避けられ、点同士が反発しているようにも見える。なお、固有値はランダム行列の円則により半径 $\sqrt{N}$ 内に分布する。

3. 結果および議論

Figure 1 にマイクロ PIXE 分析により得られた Ca の元素マップ(左側)と Ca の集積点について K-means clustering algorithm により導出された各集積点の重心位置(右側)の比較を示す。集積点の認識はバックグラウンドを区別するための Pixel 閾値設定に影響されるので、元素マップ上で見落とされる集積点が全く無いわけではないが、基本的に Ca の点状分布は再現されている。また、茶葉の構造に関係すると考えられる Ca の集積点がほとんど存在しない帯状の領域が元素マップの上部に認められる。よって、点過程の解析対象領域としてはそのような領域は除き、K-means clustering 法で得られた分布の円で囲まれた領域を設定した。

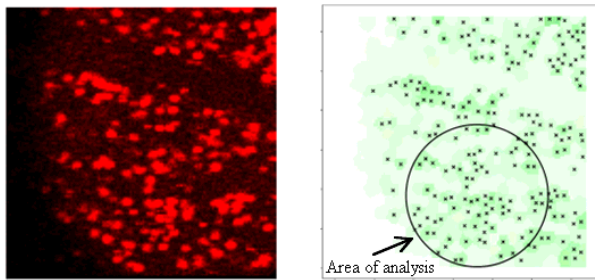


Figure 1. Spatial distribution of Ca measured using the micro PIXE analysis (left) and the accumulation points of Ca determined by the K-means clustering algorithm (right).

解析領域内には 82 個の点が存在する。Ginibre 点過程では円則により固有値は半径 $\sqrt{N}$ 内に分布するので、2 次元点分布を規格化するために Poisson 点過程と Ginibre 点過程ともに半径 $\sqrt{82}$ 内に 82 個の点を生成し同じ点密度とした。

Figure 2 に Ca 集積点分布(左)とともに、Poisson 点過程(中央) および Ginibre 点過程(右)の結果を示す。Poisson 点過程では無作為な点の配置のため点同士が偶然接近して粗密が表れるのに対し、Ginibre 点過程では点同士の間隔に顕著な違いが無く均一に近い分布に見える。一方、Ca 集積点の分布にはある程度の粗密があるが Poisson 点過程よりは緩やかであり、Poisson 点過程と Ginibre 点過程の中間的な特徴の分布に見える。しかしながら、このような判断は主観的なもので、2 点相関関数を用いるなど客観的な指標に基づく評価が必要であり、今後の課題と考えている。

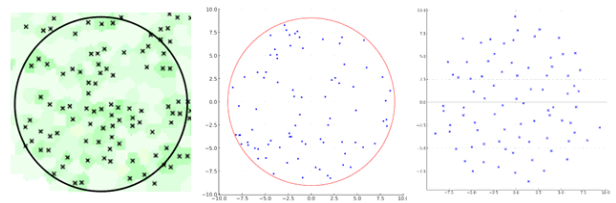


Figure 2. Comparison of the Ca accumulation points (left) with the results of the Poisson point process (middle) and the Ginibre point process (right).

4. まとめ

茶葉内 Ca の点状集積の分布について、無作為でランダムな点分布の Poisson 点過程と点同士が反発する Ginibre 点過程との比較を行った。Ca 集積点分布は両点過程の中間的な特徴を有するように見えるが、今後は客観的な指標に基づく評価とともに、茶葉のマイクロ PIXE 分析を継続し Ca 集積データの統計精度の向上も検討する。

参考文献

- [1] A. Terakawa et al., “Spatial distributions of cesium and strontium in tea [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze] leaves evaluated by micro-PIXE analysis”, *Int. J. PIXE* 30 (1–2), 41–47, 2020.
- [2] A. Terakawa et al., “Spatial distributions of alkaline earth elements in tea [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze] leaves evaluated by micro-PIXE analysis”, *Int. J. PIXE* 32 (1–4), 23–28, 2024.
- [3] T. Sakai et al., “New in-air micro-PIXE system for biological applications”, *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B* 231, 112–116, 2005.
- [4] 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.
- [5] Abiodun M. Ikotun et al., “K-means clustering algorithms: A comprehensive review, variants analysis, and advances in the era of big data”, *Inf. Sci.* 622, 178–210, 2023.
- [6] Jean Ginibre, “Statistical Ensembles of Complex, Quaternion, and Real Matrices”, *J. Math. Phys.* 6 (3), 440–449, 1965.

[R6-2]

3. 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

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

中村進一^{#,A)}, 湯澤拓^{A)}, 田代真悠^{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)}, Taku Yuzawa^{A)}, Mayu Tashiro^{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 attempted to visualize the distribution of cadmium in the root tissue of oilseed rape plants when plants were treated with 50 μM cadmium. Future application of experimental results obtained in this study is expected to elucidate the molecular mechanism triggered by root applied glutathione.

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。

今年度では、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、根に与えたグルタチオンがその動態を制御するカドミウムのアブラナ根におけるより詳細な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

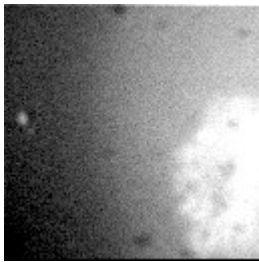
実験材料にはアブラナ(*Brassica napus*)(品種：農林 16 号)を用いた。アブラナは改変 Hoagland 液を使用して、栽培条件を完全に制御することができる人工気象器内で水耕栽培した。今回の実験では実験材料の植物の栽培期間は 4 週間とした。アブラナは畑作物である。そのため、アブラナの水耕栽培では常にエアレーションを行い、根に空気を供給しながら実施した。水耕栽培時には改変ホグランド水耕液は週に 2 回の頻度で交換した。水耕栽培によって、Micro-PIXE 実験用の根サンプルを容易に得ることができる。根におけるカドミウムの組織内分布を観察する実験では根サンプリング前の 7 日間、水耕液のカドミウム濃度を 50 μM 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。今回の実験では主に根の先端部分を用いて測

[R6-2]

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, epreidia)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℃冷凍庫から-30℃冷凍庫に移し、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、各測定用試料を 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クライオフィルム(SECTION Lab.)に取り付けた。スライスした試料中に残っている水分は再現性の良い Micro-PIXE 測定の妨げとなる。そこで、この凍結切片を接着させたクライオフィルムを 45℃のホットプレートにのせ、作成した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凍結切片の画像を顕微鏡観察し、試料の完成度を確認(Micro-PIXE 分析実験に供試する試料を選抜)した。作成した測定用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(TIARA)で行った。測定を行う作成した切片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で凍結切片に存在している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 によって解析し、カリウム、硫黄、カドミウムなどのアブラナ根における組織内分布を可視化した。

A.



B.

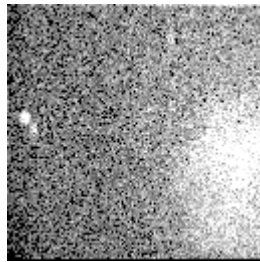


Figure 1. Potassium and sulfur distribution images in roots from oilseed rape plants obtained by Micro-PIXE analysis. (A) Potassium imaging. Distribution of cadmium in roots of plants treated with 50 μM cadmium for 7 days. (B) Sulfur imaging. Distribution of sulfur in roots of plants treated with 50 μM cadmium for 7 days.

3. 実験結果と考察

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アブラナにカドミウム処理を行った。今回の実験の主な目的はアブラナへのカドミウム処理条件を変えた時、根組織におけるカドミウムの二次元分布を調べることである。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 50 μM とした。そして、処理期間は 7 日間とした。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)凍結切片を用いて、Micro-PIXE 実験を実施

した。

50 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リ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も観察した(Fig.1B)。同じ試料でカドミウムの根組織内分布の可視化を試みたが、今回、Micro-PIXE 実験に用いた試料では得られた画像が不鮮明で明確なカドミウムの分布を確認することが難しかった。根組織におけるカリウムの分布は硫黄の分布と比較すると同じような部位に分布しているが、その分布量は硫黄よりも多いことを示す実験結果が得られた。今回、作成した切片ではカリウムの分布から、根の細胞の形状が確認できた。この結果は 100 μM のカドミウム処理を行ったアブラナの根を用いて行った実験の結果と同様であった。

今回の実験結果では根におけるカドミウムの組織内分布を明らかにできなかった。しかし、根に分布するカドミウムと思われる画像も得られている。今後は、明確な画像を得るための条件検討が必要である。これまでに行った実験の結果から、重金属元素は高濃度の処理を行うことで鮮明な二次元分布の画像が得られる。その一方で、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。根の状況をモニタリングしながら、植物にカドミウム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条件を最適化する必要がある。

4. まとめ

今年度実施した Micro-PIXE 実験から得られた画像では、アブラナ根先端部分のカドミウムの根組織内分布は不鮮明であった。切片作成時に作成した切片の顕微鏡観察したところ、カドミウム処理をした植物の根では根先端部と根上部では形態が異なっていた。今後は、根の様々な部位を測定対象にして、イメージング実験を行っていく予定である。

次年度以降も、アブラナのカドミウム処理条件を試行錯誤しながら、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できたらと考えている。これに並行して、切片調製方法や照射時間などの最適化も行う。これらの取り組みによって、カドミウムをはじめとする重金属元素の組織内分布を現在よりも鮮明に可視化できる測定条件・測定方法を模索していきたい。

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

[R6-2]

4. イネ体内の長距離イオン輸送における膜輸送体分子の機能同定

4. Functional Characterization of Ion Transporters in Long-Distance Transport in Rice

小林奈通子

Natsuko I. Kobayashi

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

Abstract

One mutant we created previously exhibits a phenotype of increased zinc content in the roots. Since the ion transporter is defective in this mutant, understanding the mechanism by which zinc is increased will lead to a better understanding of the function of the ion transporter. We performed μ PIXE analysis to identify the root tissues that accumulate excess zinc, which is important information for determining the cause of the increased zinc content. Experimental conditions have been identified so far that allow us to obtain sufficient counts for quantification and to expose the number of samples needed for comparison of wild-type and the mutant. Then, the signals of potassium, phosphorus, calcium, zinc, sulfur, and iron in the four areas in the root were measured, and the distribution of zinc was evaluated based on its content relative to other elements. Although the number of samples is not yet sufficient to confirm, the zinc content of the mutants can be high throughout the root and it tended to accumulate slightly higher in the outer tissues of the root compared to wild-type.

Keyword: transporter, zinc, phenotyping

1. はじめに

植物において根や葉など各器官や組織へのイオン分布の制御に寄与しているイオン輸送体の機能を理解し、それらを利活用することは、変動する環境条件下において健全な作物生産を維持するために重要である。本研究では輸送体の変異体で生じる無機元素の動態や分布の変化を解析することで、個々のイオン輸送体のイネ体内における実際の役割を明らかにしていく。本年度は、機能ノックアウトによって亜鉛が根に過剰蓄積する輸送体分子に注目し、イネ変異株と野生型株の根における亜鉛分布をマイクロPIXEにより比較解析した。

2. 実験方法

2.1 植物の栽培

イネ（品種日本晴）の野生型株（WT）およびゲノム編集にて輸送体を欠失させた変異株（Mutant）を使用した。浸水処理した種子を塩化カルシウム溶液で3日間栽培し、1/2 木村氏 B 液^[1]に移植して24時間後の植物体を採取した。

2.2 測定用サンプルの作成

主根を包埋材に浸し、速やかに液体窒素で凍結させ、ブロックを作成した。クライオトームで厚さ 60 μ m に切り出し、川本法のフィルム上に固定した切片は、 -20°C に設定した庫内で凍結乾燥させた。

2.3 マイクロ PIXE による測定と画像解析

約 200~300 カウント/秒が計測されるビーム強度にて、1 サンプルにつき約 1 時間の測定を行った。得られたデータは ImageJ で解析し、4 つの組織におけるカリウム、リン、カルシウム、亜鉛、硫黄、鉄の総カウント数を算出した（Figure 1）。また、この数値を基に、各元素間の比率を算出した。

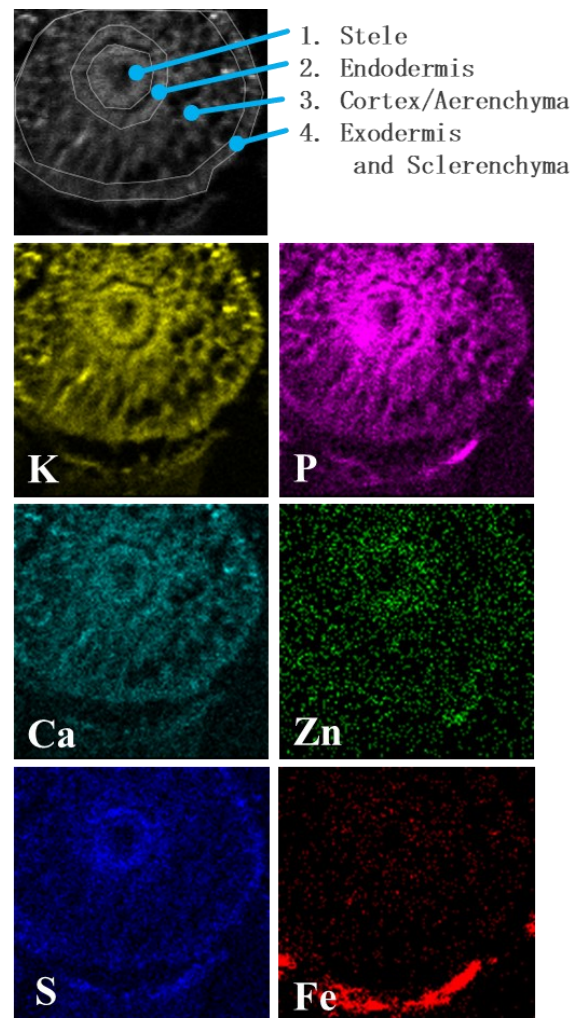


Figure 1. Elemental mapping on rice root section

3. 結果および考察

3.1 測定条件の決定

WT と Mutant を比較解析するためには、少なくとも各 3 サンプルのデータが必要であり、実験日数を考慮すると、1 サンプルあたりの照射時間は 1 時間以内が目標となった。サンプルは厚いほど得られるカウント数が高くなるが、嵩高い切片は物理的な歪みを生じやすい。サンプル厚、照射時間、カウント数の関係を実験検討したところ、切片厚が 60 μm の場合、照射時間 1 時間で亜鉛のカウント総数が 3000 程度得られ、根構造に応じた分布も視認できたため (Figure 1)、これを測定条件と定めた。なお、この条件では測定後半に稀にポリカ膜が破損するが、カプトン膜ではリンやカルシウムのノイズが発生することが判明したため採用を見送った。

3.2 亜鉛含量と分布の評価

野生型株 3 サンプル (WT1, 2, 3) と変異株 2 サンプル (Mutant1, 2) の亜鉛分布を比較するため、根の 4 つの組織にて亜鉛/リン比率を算出した結果を Figure 2 に示した。WT では亜鉛/リン比率はいずれの組織でも概ね 0.02~0.04 の範囲にあったが、Mutant ではこれより高く、Endodermis や Cortex/Aerenchyma では 0.06、外皮では 0.1 に達した。亜鉛含量が根全体で高く、特に根の外側の組織で WT との差が大きいという結果は亜鉛/カリウム比率等、他の元素との比率からも支持された。今後は他の数値指標の検討や、複数の実験日に測定したデータとの統合等を進め、Mutant における亜鉛分布の特徴の定量的評価を目指す必要がある。

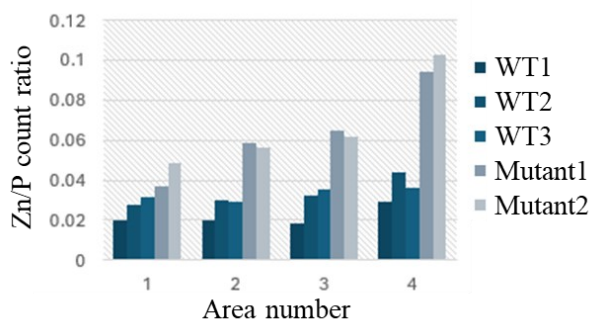


Figure 2. Ratio of Zn/P in various root tissues

The net count of Zn and P in the four areas (see Figure 1) was determined and the Zn/P ratio was calculated.

参考文献

- [1] NI.Kobayashi, et al., “Magnesium deficiency damages the youngest mature leaf in rice through tussye-specific iron toxicity”, Plant and Soil. 137-152, 2018