

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15355

研究課題名(和文)植物中の多元素動態を同時に追跡するRI・蛍光マルチライブイメージングの開発

研究課題名(英文)Developing of the radioisotope-imaging system for plants

研究代表者

杉田 亮平(Sugita, Ryohei)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：60724747

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):本研究は、リアルタイムRIイメージング装置の高度化により、蛍光イメージングとの同時撮影を行うことを目的とした。植物用LED照明、蛍光イメージング用の蛍光をパルス的に照射し、暗期にRIイメージングを行うパルス照明システムの構築を目指した。パルス照明を50 msecよりも短い間隔で行う場合、植物の光合成能が低下する。そこで、マイコンボードとCCDカメラを同期させて撮影するシステムを構築することで、msec単位での照明を制御、撮影することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高度な照明システムの構築により、様々な蛍光イメージングを同時に撮影できる見通しである。本システムは他のRIイメージングにも適用可能である。また、視野範囲の拡大にも成功した。これまでは20 cm x 10 cmの視野範囲であり、幼植物のみを解析の対象としてきたが、新たにシンチレータを改良したことで、80 cm x 60 cmの撮影が可能になった。これにより、イネやダイズの収穫期ステージの試料をも撮影の対象になりうる。今後は作物の子実へ輸送される養分がどのように輸送されていくのかを解析していくことで、収量増加や施肥の最適化を目指す。

研究成果の概要(英文): In this study, we have improved a real-time radioisotope imaging system for taking fluorescence imaging. The method is to perform LED lighting for plants, pulsed fluorescence for fluorescence imaging, and radioisotope imaging during the dark period. The photosynthetic capacity of plants is reduced when pulse lighting is provided at intervals shorter than 50 msec. Therefore, we constructed a system that synchronizes a microcontroller board and a CCD camera to capture images at intervals of 50 msec. The lighting system was successfully controlled of lighting for plants and taking images in msec increments.

研究分野：植物栄養

キーワード：放射線イメージング 植物栄養 シンチレータ ベータ線

1. 研究開始当初の背景

植物体内における元素動態の解析には、植物の粉碎等の処理を必要とする破壊分析法と植物を生きたまま測定する非破壊分析法がある。元素動態は常に変化し続けるため、非破壊分析法は非常に強力である。近年、非破壊分析法であるライブイメージング技術、なかでも蛍光ライブイメージングと放射線 (RI) ライブイメージングが急速な進展を遂げている。蛍光ライブイメージングは、蛍光色素や蛍光蛋白質から発する光の検出、RI ライブイメージングは RI から発する放射線を直接、もしくは放射線から変換した光の検出を可視化の原理とする。それぞれの特徴として、蛍光イメージングは、可視化する蛍光物質の分子量や立体構造上、可視化した元素動態が本来の目的とする元素とは異なる可能性がある。さらには蛍光物質によっては、代謝や物質の置かれた環境に大きく依存するため定量性に欠ける場合がある。一方で、特殊な施設を必要としないため導入が容易である他、撮像時間が非常に短く (ms オーダー)、リアルタイムでの画像取得が可能である。一方、RI ライブイメージングは定量性に優れるが、専用施設を必要とするため導入は非常に困難である。それ故、国内外を通じて RI ライブイメージング装置は実用例が少なく、そのほとんどが医療診断に利用されている PET (positron emission tomography) を植物に応用したシステムである (Jahnke et al. 2009, Fujimaki et al. 2010)。これらの装置は、得られる RI 画像の解像度が mm オーダーであり、植物の微細空間の可視化は不可能である。また可視化に用いる RI はポジトロン放出核種に限定され、それらの半減期は数分~数十分 (^{11}C ; 20 分) というように短いものが多いため、長時間の撮影ができない。そのため数時間~数日の時間を要する植物生理を解析するには不向きである。そこで本応募者は様々な RI を検出可能とする RI ライブイメージング装置: RRIS を開発してきた (Nakanishi et al. 2009)。RRIS は β 線や軟 X 線等を検出することから (Sugita et al. 2014)、RI の選択範囲が広い他、半減期が長い核種 (^{14}C ; 5700 年) の利用が可能である (Sugita et al. 2013)。本応募者は福島第一原発事故で問題となっているイネのセシウムや環境汚染に関わるカドミウム、さらには植物生育に必須なイオン (C, Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Zn) および光合成による炭素固定 ($^{14}\text{CO}_2$ ガス固定の可視化) など、多岐に渡る生理現象において、植物地上部での長時間にわたる動態を高い解像度で可視化してきた (Sugita et al. 2016)。

2. 研究の目的

植物の生育には元素それぞれのバランスが重要であり、植物と養分の関係を解析していく上で複数元素を同時に解析していくことが必要である。一方で、RRIS は複数核種を同時に解析することができない。RRIS の撮像原理は、放射線を光に変換して検出することである。RRIS は様々な核種を検出することが可能であるが、放射線から変換される光の波長は核種に関わらず同一であるため、核種を弁別することが不可能である。つまりは、二核種の同時撮影による解析ができない。そこで、本研究では RRIS イメージングに加え、蛍光イメージングを同時に行うことで、二種類の元素動態を同時に解析可能とする新たな撮影手法の開発を目指す。波長が異なる蛍光物質を利用することで、多種類の元素動態を一斉に解析できることも期待できる。さらには、シンチレータの改良による視野範囲の拡大、および撮影に伴う植物試料の設置に対して、植物へのストレス負荷の低減を目指した。

3. 研究の方法

植物の生長には光が必要である。一方で、放射線により変換された光シグナルは非常に微弱であり、検出には高感度 CCD カメラを用いることから、RRIS での撮影は暗環境下が必要である。そこで、撮影と植物への光照射を交互に行うパルス照明による撮影を行ってきた。このパルス照明システムを蛍光照射に適用し、生育用の光照射、蛍光イメージング用の蛍光照射をパルスの行的に行い、これらが照射していないタイミングで RI イメージングを行う新たなパルス照明システムの構築を目指した。

4. 研究成果

【照明制御システムの構築】

植物への生育用 LED、および蛍光をパル的に照射する制御システムを構築した。植物への光照射をパル的に行うことで光合成能に影響を与える。一方で、50 msec のパルス間隔においては、連続照明と比較して、光合成能を維持することが可能である (Kanechi, 2018)。そこで、50 msec 間隔でパルス照明を行い、暗期に撮影を行うことで、光合成能を落とさずに撮影できる技術の構築を行った。これまでパルス照射を制御するリレーユニットでは、msec 単位の制御ができない。そこでマイコンボードによる新たな制御方法を構築した。具体的には次のとおりである。今回使用した高感度 EMCCD カメラ (iXon Ultra 888) には、外部トリガ端子に TTL

レベル信号が印加されている間だけ画像信号を積算し、複数回の積算結果を1枚の画像として保存する間欠撮影機能がある。そこでカメラの間欠撮影とLEDによる間欠照明を同期させるため、市販のマイコンボード (ArduinoUno R3)を用い、msec単位の任意の周期でLED駆動回路のON-OFFと撮影トリガ信号のON-OFFを交互に行う電子回路を作成した。その結果、50 msec周期での照明、および撮影が可能となった。また、複数のLEDを同時に制御することが可能であり、植物生育用LED、蛍光イメージング用LEDの制御が可能であり、さらには、複数の蛍光を制御することが可能である。ただし、今回用いたLED照明は、消灯開始後、完全に消灯するまでには30 msecの時間を有することがわかった。そこで50 msecの暗期において、実際に撮影に使える時間は20 msecに限定された。この点においては、より性能の良いLEDにすることで改善が期待される。

次に、RI標準線源を用いて取得できるシグナル量の比較検討を行った。msec単位での撮影では取得できるシグナル量が非常に小さいため、複数枚を合算することでシグナル量を確保することとした。まず従来の撮影手法を用いて60 secの積算画像を1枚取得した。次に新たに構築した撮影手法を用いて、20 msecの積算画像を3000枚取得し、1枚の画像に合算した(60 sec相当)。その結果、上記2点の画像から得られたシグナル量は同一であった。ただし、新たな撮影手法においては、ノイズが大きかった。原因としては、読み取りノイズが3000回分となる他、高速での撮影を可能とする撮影モードに起因、特に撮影モードが大きく影響していることもわかった。この点においては、今後ノイズを抑える対策が必要である。本実験では撮影、およびLED照射をmsec単位で制御する手法としたが、カメラのシャッターをmsec単位で制御することで、従来通りの低速撮影モードで行い、ノイズ上昇を抑える算段である。

【新たなシンチレータの探索】

RRISの撮像原理は、シンチレータを用いて放射線を光に変換し、その光をカメラで撮影することである。撮影の際には、植物試料をシンチレータに固定する必要がある。RIイメージングと蛍光イメージングを同時に行う際に、植物試料を中心として、RIイメージング用のCCDカメラと180度の対に蛍光イメージング用のカメラを設置する方法を検討した。つまりは、前方からRIイメージング、後方から蛍光イメージングを行う形式である。しかしながら、植物試料は厚みがある他、複雑な形状をしていることから、前方と後方とを同じ植物組織を撮影できるとは限らない。そこで、RIイメージング用のCCDカメラで蛍光イメージングを行う方法を検討した。その場合、RIイメージングと蛍光イメージングの光軸が同じになるため、それぞれから得られた画像を重ね合わせる場合に非常に有効である。ただし、植物とCCDカメラとの間にはシンチレータがあり、これまで用いてきたシンチレータ：FOS (Fiber optic plate with scintillator)はアルミマイラーで保護されている。放射線はアルミマイラーを通過することが可能であるが、蛍光は遮光されてしまう。そこで、透明無色のプラスチック製シンチレータを本システムに適用させた。厚さや材質の異なるプラスチックシンチレータを用いて、RIの検出感度、発光強度、定量性、および解像度等の性能評価を行った。比較は高エネルギー放出核種である³²P、および低エネルギー放出核種である¹⁴Cを用いた。シンチレータの保護には、無色透明なポリラップを設置した。その結果、FOSと比較して性能がほとんど変わらないシンチレータ(東京インキ株式会社)を見出した。今後は、このプラスチックシンチレータを用いて、蛍光イメージングが可能かどうかを検証していく予定である。

【シンチレータの改良：視野範囲】

RRISでの撮像可能な視野範囲はシンチレータの大きさに依存する。これまでは、FOS (10 cm x 10 cm)を2枚並列させることで、20 cm x 10 cmの視野範囲で撮影を行ってきた。FOSは非常に高価であり、並列枚数を増やすことでの視野範囲の拡大は難しい。そのためこれまでの撮影は、幼植物のみを撮影の対象としてきた。ところで、上記で見出したプラスチックシンチレータは加工性に優れている。そこで、解析の対象とする植物の拡大を目的として、視野範囲の拡大を目指した。様々な厚さごとに、RIの検出感度、発光強度、定量性、および解像度等の性能評価を行った。比較は高エネルギー放出核種である³²P、および低エネルギー放出核種である¹⁴Cを用いた。これを基にシンチレータを改良し、80 cm x 60 cmの視野範囲が可能となり、解析の対象とする植物は、幼植物のみならず、イネやダイズの成熟期においても可能となった(図1)。

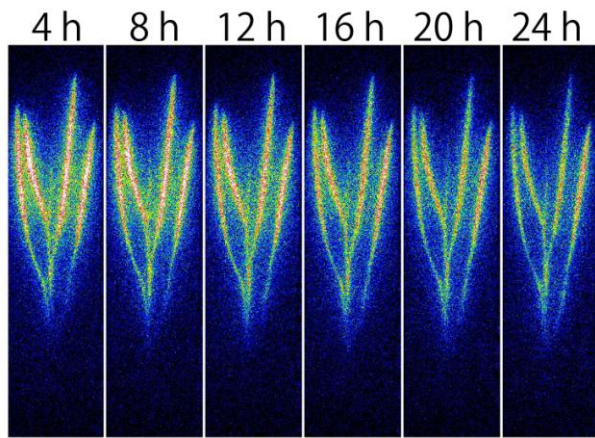


図1 大型プラスチック製シンチレータを用いた RI イメージング
イネに $^{14}\text{CO}_2$ を吸収させた後、 ^{14}C 標識された光合成産物が輸送される様子を 24 時間撮影した。
上部の時間は撮影時間を表す。

【シンチレータの改良：植物への固定】

これまでは板状シンチレータに植物を固定して撮影を行ってきた。一方で植物の葉は湾曲している上、表面が凹凸状である。このように複雑な形状の植物試料を二次元的に板へ固定するためには植物組織を圧迫させる必要があり、植物組織が損傷する場合がある。また、固定が不十分な場合、シンチレータとの接触面積が小さく、感度、解像度、および定量性が低下する。そこで植物に負荷をかけることなくシンチレータを固定させる手法の開発に着手した。粒状、粉末状、液体状など様々な形状のシンチレータを用いて比較検討した結果、粉末状を植物に塗布する手法に可能性を見出した。つぎに既存の粉末シンチレータの他、固体シンチレータの粉末化などを試行した結果、上記のシンチレータ拡大化で用いたシンチレータを粉末にして用いることが、発光強度の点において優れていた。さらには、粉末状にしたシンチレータを植物に塗布した後、RI を添加したところ、イメージングできることがわかった (図2)。ただし、撮影の間に植物が動くことから、塗布したシンチレータが脱離するため、展着剤の検討が必要である。その他、シンチレータの粒径の調整、毒性の有無、定量性などさらなる検証が必要であり、引き続き研究を進めていく予定である。

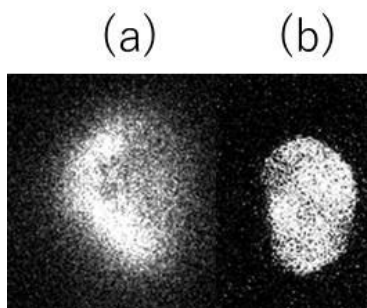


図2 粉末状シンチレータを用いたダイズ子実の RI イメージング

ダイズに $^{14}\text{CO}_2$ を吸収させた後、莢からマメを取り出し、粉末状シンチレータを塗布した。

(a) 板状シンチレータ、(b)粉末状シンチレータ

板状シンチレータで撮影した後、同試料に粉末状シンチレータを塗布して再度撮影した。粉末状シンチレータは、板状と比較して試料との接触面積が大きい。そのため、解像度の向上が可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryohei SugitaKohei SugaharaNatsuko I. KobayashiAtsushi HiroseTomoko M. NakanishiEtsuko FurutaMasaaki SensuiKeitaro Tanoi	4. 巻 318
2. 論文標題 Evaluation of plastic scintillators for live imaging of ¹⁴ C-labeled photosynthate movement in plants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry	6. 最初と最後の頁 579-584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/s10967-018-6102-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kohei Sugahara, Ryohei Sugita, Natsuko I. Kobayashi, Atsushi Hirose, Tomoko M. Nakanishi, Etsuko Furuta, Masaaki Sensui, Keitaro Tanoi	4. 巻 68
2. 論文標題 Plastic Scintillators Enable Live Imaging of ³² P-labelled Phosphorus Movement in Large Plants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 RADIOISOTOPES	6. 最初と最後の頁 73-82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3769/radioisotopes.68.73	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sugita, R.; Kobayashi, N.I.; Hirose, A.; Tanoi, K.; Nakanishi, T.M.
2. 発表標題 Live imaging of ion movement in plants by Real-Time Radioisotope Imaging System (RRIS)
3. 学会等名 IPNC 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sugita, R.; Kobayashi, N.I.; Hirose, A.; Tanoi, K.; Nakanishi, T.M.
2. 発表標題 Live imaging of photosynthate and ion movement in plants using Real-Time Radioisotope Imaging System (RRIS)
3. 学会等名 IGER International Symposium（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉田亮平
2. 発表標題 RIライブイメージングを用いた植物体内イオンの可視化
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉田亮平
2. 発表標題 放射性同位元素を利用した植物体内イオンのライブイメージング
3. 学会等名 11th NIBB/バイオイメージングフォーラム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉田亮平
2. 発表標題 植物体内イオンの可視化に向けたRIイメージング装置の開発
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

放射線植物生理学研究室 http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/radio-plantphys/index.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----