

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06317

研究課題名（和文）放射線で光る粉を用いた植物体内元素のライブイメージング法の開発

研究課題名（英文）Development of a live imaging techniques for ion transport in plants using powder scintillator.

研究代表者

杉田 亮平（Sugita, Ryohei）

名古屋大学・アイソトープ総合センター・講師

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）：本研究者は、これまでRIライブイメージング装置であるリアルタイムRIイメージングシステム（RRIS）を開発してきた。RRISでの撮影には植物を板状シンチレータに固定する必要がある。一方で植物は三次元的に成長するため、板に二次元的に固定することは植物への負荷が大きかった。そこでシンチレータを板状から粉末状に変えることで植物に負荷を与えることなく撮影を可能とする技術開発を目指した。その結果、本研究によりRRISではイメージングが困難であった植物においてもRIライブイメージングをすることができた。加えて、本研究では新規シンチレータを多数発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのRRISではイメージングが困難であった植物においてもRIライブイメージングをすることができるようになったことで、研究の対象となる植物種が広がった。さらには、本研究で発見した多数の新規シンチレータは、RRISのみならず、様々なRI検出器への適用が可能であり、新規のRI検出器の開発が期待できる。現在は、民間企業と共同研究を進めているところである。

研究成果の概要（英文）：We have been developing a real-time RI imaging system (RRIS), which is an radioisotope live imaging system. For RRIS imaging, plants need to be fixed to a plate scintillator. On the other hand, since plants grow three-dimensionally, fixing plants to a plate in two dimensions damages them. Therefore, we aimed to develop a techniques that enables radioisotope imaging without damaging the plants using powder scintillator. As a result, we were able to perform radioisotope live imaging on plants that were difficult to image with RRIS. In addition, many new scintillators were discovered in this study.

研究分野：放射線検出

キーワード：放射線 RIイメージング 植物栄養 ベータ線

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、異常気象の多発により農作物の安定的な生産が難しくなっている。そこで天候に左右されない植物工場に大きな期待が集まっている。市場規模は毎年増加傾向であり、2018年度の市場規模はおよそ60億円、2022年度では270億円と予想されている(矢野経済研究所)。生産品種は可食部が多いレタスが中心である。一方で、露地栽培と比較して導入コストおよびランニングコストが大きく、黒字化できずに撤退する企業が多い。そのため収量増加は今後の植物工場の発展に非常に重要な課題である。

植物工場や養液でレタス栽培を行う場合、露地栽培に比べて成長が格段に早く、常にチップバーンのリスクをどれだけ低く管理できるかが最も重要な課題となる。チップバーンとは、カルシウムが不足した際に発生する生理障害であり、発生すると葉の一部が褐色や黒色等に変色するため商品価値が激減する。カルシウムは植物に吸収されにくい上、植物体内での移動が少ない。そのため、カルシウムが豊富にある環境下で栽培した場合であってもカルシウムの吸収、輸送が成長に追いつかずチップバーンが発生する(Saure, 1998)。植物工場の経営としては作物の成長速度を最大限に高め、栽培日数を短縮して生産回転数をあげることが望まれる。成長速度は光合成速度に大きく依存するため、光強度、CO₂濃度を高めて栽培を行っている。一方で、レタスは光強度が高いほどチップバーンが発生しやすく(Tibbitts and Rao, 1968)、光強度を抑えて生産するため、生産量は最大の5~7割程度となっている。ただし、栽培条件は現場の経験に依存しており、カルシウム動態と光合成との関係性、さらにはこれらとチップバーン発生との関係性についてはまだあまりよくわかっていない。

これまで本研究者は、輸送や蓄積といった植物体内の物質動態を放射性同位体(RI)により可視化を行う、リアルタイムRIイメージングシステム(RRIS)を開発してきた。RRISの撮影原理は、植物体内から放出される放射線をシンチレータ(放射線を光に変換する素材)により可視光に変換し、その可視光をCCDカメラで撮像するものである。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。一方で植物の葉や茎は湾曲している上、表面が凹凸状である。そのため三次元的に複雑な形状となる植物組織を二次元的に板へ固定するためには植物を圧迫させる必要があり、固定により植物が大きく損傷する。また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。特にレタスは葉の湾曲度合いや凹凸が大きいいため、板状シンチレータでのRIイメージングには不向きである。

2. 研究の目的

本研究は、粉状シンチレータを植物に塗布することで植物に負荷をかけることなく植物組織とシンチレータとを密着させる新しいイメージング手法の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

板状シンチレータをミル等で粉砕することで粉状シンチレータを作製し、植物に塗布することを試みた。レタスを実験材料にするにあたり、品種はロメインレタス(*Lactuca sativa*)を用いた。

4. 研究成果

シンチレータの粉末化

粉砕するシンチレータは、加工性などの汎用性を重視し、プラスチック製を採用した。粉末化は超高性能ミルにて、複数段階に分けて細分化した。その結果、粒径が数 μm オーダーの微細シンチレータが出来た。

葉へのシンチレータの塗布

次に、この粉末シンチレータを植物に塗布した。植物の葉や茎は常に不規則に動いているため、葉に粉末シンチレータを直接に塗布しても、すぐにシンチレータが落下して、葉の表面に粉末シンチレータを保持できなかった。そこで、シンチレータを接着剤に練りこんで植物へ塗布することで、粉末シンチレータの保持を図った。接着剤としては、植物に無害であることが重要であり、農薬を植物に葉面吸収させるために用いられる展着剤、植物の撥水性を低下させるために用いられる界面活性剤、及び増粘剤を用いて検討した。その結果、農薬展着剤及び界面活性剤は葉から流れ落ち、特に傾きのある部分においては塗布できるシンチレータの量に限りがあった。また、シンチレータが葉の表面にコーティングができた部分においても、24時間後には一部の粉が落ちてしまった。これは、接着剤が乾燥してシンチレータが再び粉の状態に戻ったためと考えられる。一方で、増粘剤であるPEG溶液は葉から流れ落ちることなく塗布することができた。液体状であったPEG溶液が、24時間後に接着剤が乾燥により固体状になっていたが、シンチレータはレタスの葉に保持されていた。PEGは粘性のある高分子化合物であり、乾燥してもシンチレータ

と葉を接着することができたためと考えられる。これらの結果より、レタスの葉へのシンチレータの接着剤は、PEG 溶液を用いることにした。

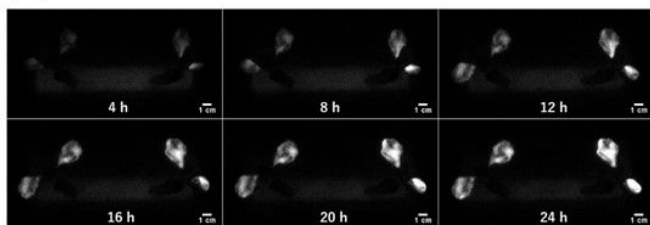
粉末状シンチレータの評価

植物へのシンチレータのコーティング方法としてシンチレータを PEG 溶液に練りこんで植物に塗布することとしたが、この状態でもシンチレータが機能を果たす、すなわち放射線に当たると蛍光を発することを確認する必要がある。また、シンチレータ自身が光を蓄えて、暗所でも発光する性質である蓄光 (Hong et al., 2009) を持つ場合、シンチレーション光と蓄光が同時検出された際に分別がつかない。つまりは、蓄光があるシンチレータは RI ライブイメージングには適さない。そこで PEG 溶液に練りこんだ粉末状シンチレータを用いて、シンチレータ能、蓄光の有無を調べた。加えて、従来からシンチレータとして使われてきた DPO、アントラセンも比較を行った。その結果、いずれのシンチレータにおいても放射線により蛍光を発したため PEG がシンチレータとしての機能を阻害しないと言える。ただし、アントラセン及び DPO は放射線源が存在しない状態においても微弱な蛍光を発した。これは部屋に設置してある蛍光灯による蓄光と考えられる。一方で、プラスチックシンチレータは蓄光が認められなかった。そのため、コーティングに用いるシンチレータに適することがわかった。さらには、これまで RRIS での撮影で用いてきた板状シンチレータと粉末状シンチレータの定量範囲を評価した結果、 $1.3 \times 10^{-1} - 2.9 \times 10^2$ Bq/mm² であり、板状シンチレータと比較して PEG 溶液にシンチレータを練りこむ手法でも同等であった。

植物を用いた RI ライブイメージング

上記で検討した条件を踏まえ、実際に植物を用いて RI ライブイメージングを行った。レタスを用いて、³²P 及び ⁴⁵Ca を吸収していく様子を可視化した (図 1)。シンチレータコーティング法により、レタスが RI を吸収していく様子を経時的にイメージングすることができた。ただし、特に ³²P において、葉における RI シグナルが不均一であった。これは、PEG 溶液に練り込んだシンチレータの塗りムラにより、感度にバラつきが出てしまっているためと考えられる。この点については、次節で検証及び改善を図ることとした。また、植物を板に貼り付けていないため、イメージング中に植物が動き、CCD カメラに対しての距離や角度が変化した。このため、同じ部位においても得られる画像により CCD カメラに対する位置関係が異なり、定量性が得られない可能性がある。この点についても検証することとした。

(a)



(b)

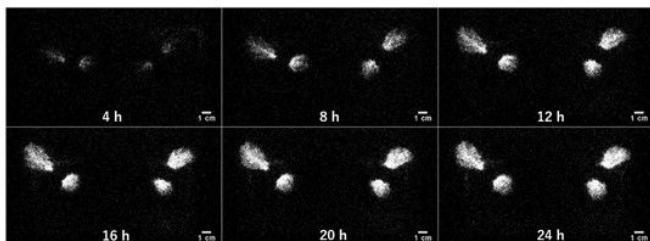


図 1 レタス葉における養分の蓄積

(a) ³²P, (b) ⁴⁵Ca

レタスの葉を粉末状シンチレータでコーティングを行い、根に RI を添加した後、RRIS にて 24h 撮影を行った。

感度の不均一性の改善

シンチレータを均一にコーティングし、感度のバラつきを改善する方法を検討した。具体的には、パウダースプレーを用いて粉末状のシンチレータを葉に吹き付けることを試行した。その際、シンチレータの前に接着剤を葉に吹き付けることで、シンチレータを保持させることを検討した。前述と同様に、様々な接着剤を試した結果、PEG が最も優れていた。この方法で ³²P 及び ⁴⁵Ca のライブイメージング画像を取得した。吹き付けの方法でも、レタスが RI を吸収していく様子を経時的にイメージングすることができた (図 2)。これにより、葉にコーティングするシンチレータ厚の均一性、つまり定量性において、シンチレータを PEG 溶液に練り込んで塗布する方法と比べて吹き付ける方法が適切である。

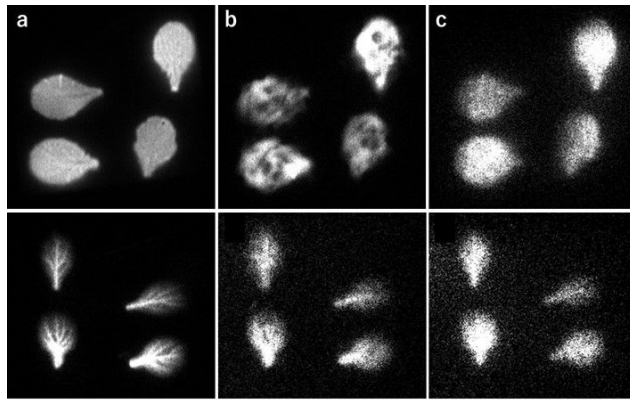


図2 異なる接着剤における ^{32}P 及び ^{45}Ca でラベルされたレタスの葉の解像度の違い

- (a) 板状シンチレータ、
 (b) PEG 溶液に練り込んで塗布、
 (c) PEG を葉に塗布した後、粉末状シンチレータを吹きかけて撮影した。

一方で、撮影期間中に植物が動く点においては、対象となる植物組織とカメラとの距離および角度が変化することで、定量性は3割ほど低下することがわかった。この問題点においては、植物への塗布方法を変更する程度では解決できないように思われた。そこで、植物の根からシンチレータを吸収させて、植物体内全体にシンチレータを行き渡らせる手法を試したが、粉末状のシンチレータの粒径が数 μm あるため、根から吸収させることができなかった。そこで、根から吸収が可能なシンチレータの探索を行った。液体状のシンチレータなど、既存の様々なシンチレータを試したが、根から吸収できるようなシンチレータはなかった。

新規シンチレータの探索

前述のとおり、既存のシンチレータでは植物体内に取り込ませることが不可能であった。そこで、植物が根から吸収できるシンチレータの探索を目指した。名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所が所有する、25,000種の有機化合物を集めたケミカルライブラリを利用し、各化合物、およびRIを96穴プレートで混合させることで、多様な化合物からハイスループットで発光する物質を探索できる手法を構築した。放射線自身によるチェレンコフ光との同時検出を防ぐため、理論上水中においてチェレンコフ光を放出することのない低エネルギー線を放出する核種である ^{35}S を用いた。溶媒は、植物に無害であるDMFを用いた。その結果、一般的なシンチレータとして知られるアントラセンやDPOのカウントを超える化合物を多数発見した(図3)。なお、発光量の多い化合物の上位群は多環芳香族炭化水素であった。本研究で発見した新規シンチレータによる新たな検出器の開発などの可能性が生まれた。

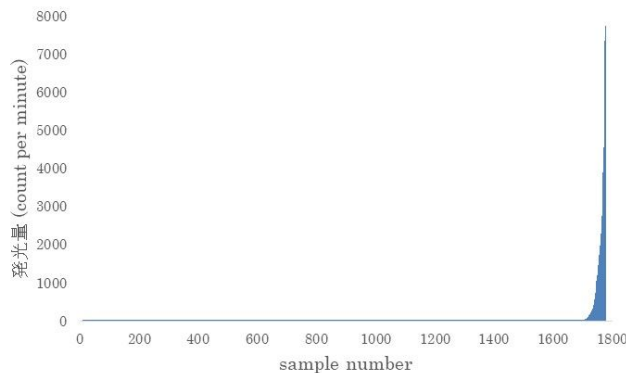


図3 1,777種の化合物の発光量。全化合物の発光量(1分間のカウント)を昇順に並べたものを示す。

発光波長

本研究で発見した新規シンチレータにおいて、発光量の多い化合物の一部において発光波長を調べた結果、440nmであった。CCDカメラ等の検出器の最大感度域が400-450nmであることが多く、非常に検出効率が高い特徴を有することがわかった。一方で、発光の減衰時間は8-12 nsであり、一般的な有機シンチレータ(減衰時間1-10 ns)と比較すると遅い点においては、新たにRI検出器を開発する際には留意する必要がある。

本研究で発見した新規シンチレータは、特許申請を行ったことに加え、RI測定機器メーカーや化学合成メーカーなどの興味を示した民間企業と製品化を目指して共同研究を進めているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kurita Yuko, Kanno Satomi, Sugita Ryohei, Hirose Atsushi, Ohnishi Miwa, Tezuka Ayumi, Deguchi Ayumi, Ishizaki Kimitsune, Fukaki Hidehiro, Baba Kei'ichi, Nagano Atsushi J., Tanoi Keitaro, Nakanishi Tomoko M., Mimura Tetsuro	4. 巻 45
2. 論文標題 Visualization of phosphorus re translocation and phosphate transporter expression profiles in a shortened annual cycle system of poplar	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant, Cell & Environment	6. 最初と最後の頁 1749 ~ 1764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pce.14319	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 Suetsugu Kenji, Sugita Ryohei, Yoshihara Akiko, Okada Hidehito, Akita Kae, Nagata Noriko, Tanoi Keitaro, Kobayashi Koichi	4. 巻 238
2. 論文標題 Aerial roots of the leafless epiphytic orchid Taeniophyllum are specialized for performing crassulacean acid metabolism photosynthesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 932 ~ 937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.18812	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 Kurita Keisuke, Sakai Takuro, Suzui Nobuo, Yin Yong-Gen, Sugita Ryohei, Kobayashi Natsuko I., Tanoi Keitaro, Kawachi Naoki	4. 巻 60
2. 論文標題 Autoradiography system with phosphor powder (ZnS:Ag) for imaging radioisotope dynamics in a living plant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 116501 ~ 116501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/ac2b50	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 Noda Yusaku, Sugita Ryohei, Hirose Atsushi, Kawachi Naoki, Tanoi Keitaro, Furukawa Jun, Naito Ken	4. 巻 72
2. 論文標題 Diversity of Na ⁺ allocation in salt-tolerant species of the genus Vigna	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 326 ~ 331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.22012	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 Huang Chaokun, Kurotani Ken-ichi, Tabata Ryo, Mitsuda Nobutaka, Sugita Ryohei, Tanoi Keitaro, Notaguchi Michitaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Nicotiana benthamiana XYLEM CYSTEINE PROTEASE genes facilitate tracheary element formation in interfamily grafting	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Horticulture Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hr/uhad072	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 Nagatoshi Yukari, Ikazaki Kenta, Kobayashi Yasufumi, Mizuno Nobuyuki, Sugita Ryohei, Takebayashi Yumiko, Kojima Mikiko, Sakakibara Hitoshi, Kobayashi Natsuko I., Tanoi Keitaro, Fujii Kenichiro, Baba Junya, Ogiso-Tanaka Eri, Ishimoto Masao, Yasui Yasuo, Oya Tetsuji, Fujita Yasunari	4. 巻 14
2. 論文標題 Phosphate starvation response precedes abscisic acid response under progressive mild drought in plants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-40773-1	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 Hiruma Kei, Aoki Seishiro, Takino Junya, Higa Takeshi, Utami Yuniar Devi, Shiina Akito, Okamoto Masanori, Nakamura Masami, Kawamura Nanami, Ohmori Yoshihiro, Sugita Ryohei, Tanoi Keitaro, Sato Toyozo, Oikawa Hideaki, Minami Atsushi, Iwasaki Wataru, Saijo Yusuke	4. 巻 14
2. 論文標題 A fungal sesquiterpene biosynthesis gene cluster critical for mutualist-pathogen transition in Colletotrichum tofieldiae	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-40867-w	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 杉田亮平, 中西友子, 田野井慶太郎
2. 発表標題 シンチレーション光で植物体内を動く養分を見る
3. 学会等名 第65回放射線化学討論会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉田亮平、小林奈通子、廣瀬 農、岩田 錬、鈴木 寿、田野井慶太郎、中西友子
2. 発表標題 リアルタイム RIイメージングを用いた光の変化がイネの元素動態に与える影響の解析
3. 学会等名 第58回アイソトープ・放射線研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉田亮平、小林奈通子、中西友子、田野井慶太郎
2. 発表標題 放射性トレーサーを用いた植物体内イオンの可視化技術の開発
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会（招待講演）
4. 発表年 2020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〕

-

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
研究協力者	泉水 征昭 (Sensui masaaki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------