

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22880009

研究課題名（和文）リアルタイム RI ミクロイメージングを利用した植物のリン酸輸送機構の研究

研究課題名（英文）Phosphate transportation study by Real-time RI micro imaging system

研究代表者

菅野 里美 (KANNO Satomi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任研究員

研究者番号：20586010

研究成果の概要（和文）：本研究は、植物体内のイオンや化合物を非破壊に顕微鏡レベルで解析するためのシステムの構築を目指し、放射性同位体トレーサ、板状シンチレータ、正立顕微鏡の組み合わせた実験系により 40 倍に拡大した植物組織内のトレーサ分布をイメージングできるようにしたものである。このシステムにより植物の根端 500 μ m リン酸吸収移行の様子を画像として取得し、根組織によるリン酸吸収の違いを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To understand that ion and chemical element transportation system in plant, we developed new imaging analysis system by using radioisotope tracer, scintillator and microscopy. The system could obtain image of radioisotope tracer movement in living plant tissue in microscopy level (magnified 40 times). Imaging analysis by this new system revealed that root cells in 500 μ m had different phosphate absorption and transportation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：植物栄養学・土壌学

キーワード：イメージング、植物、リン

1. 研究開始当初の背景

地球環境の悪化や人口の爆発的増加が進行する中、農業生産性を高く保つことは、人類にとっての課題である。遺伝子組み換え技術によるストレス耐性付加など植物の環境適応能力を高めるための効果的な研究・育種が行われているが、植物体内の生理分子機構

は複雑であり特定の遺伝子機能を強化させても効果を望めないことも多い。そこで遺伝子資源を有効に活用していくためにも、植物のストレス環境応答時の生理分子機構を明らかにしていくことが重要である。遺伝子の発現と機能を GFP により非破壊で解析する

ように、植物体内のイオンや化合物を非破壊で解析することができれば植物のストレス環境応答の理解に活かせるのではないかと考えたことから、これまでの研究において非破壊での物質イメージング解析を行う実験系の確立および分子生物学的知見と結び付けた総合的な解析を目指し研究を進めてきた。

2. 研究の目的

これまでの研究で開発を進めてきたシステムのイメージング原理を応用し、(1)非破壊サンプルでの動態解析、拡大倍率の向上、明視野像、蛍光像も合わせて取得できるシステムへの改良、(2)植物のリン酸輸送機構解明への応用研究を行う。

2. 研究の方法

(1)機器の改良

既存の顕微鏡と高感度 CCD カメラを基本に、明視野像、蛍光像取得のための光路を確保し、同ステージ上で 3 つの像 (RI 像、明視野像、蛍光像) を取得できるようにする。分解能の向上には、放射線のシンチレーション反応時と可視光変換後の像の拡大の二案を考えた。

① コリメータの利用

サンプルから 360 度すべてに放射される放射線のうち直線のものだけを選抜し、シンチレーション反応させ、これにより、サンプル内で拡散してしまったシグナルによるノイズを防ぎ、サンプル内の RI 局在を明確にすることができる可能性がある。そのためにサンプルとシンチレータ面の間にコリメータ (金属格子 $\phi 10 \mu\text{m}$ 程度) を置き、格子を通過した β 線と金属で遮蔽される β 線に分ける。コリメータの素材検討については、放射線計測を専門とする東京大学大学院原子力国際専攻の高橋研究室との共同研究を行う。

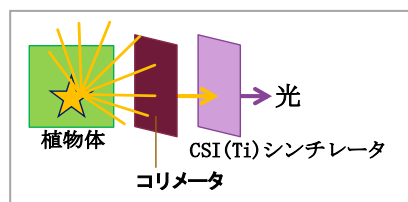


図 1 コリメータによる画像向上のイメージ

② 板型シンチレータの利用

ファイバーオプティックプレート、もしくはガラスに蒸着したシンチレータをサンプル上に置き、RI を可視光へと変換させたのち、レンズによって拡大して像を得たい (図 2)。また、このとき改良案 1 によりコリメータの効果が確認できた際には、シンチレータにコリメータを接着させる予定である。拡大のためのレンズの種類、枚数や焦点距離の計算については、現在使用している顕微鏡の ZEISS 社の協力を得る。

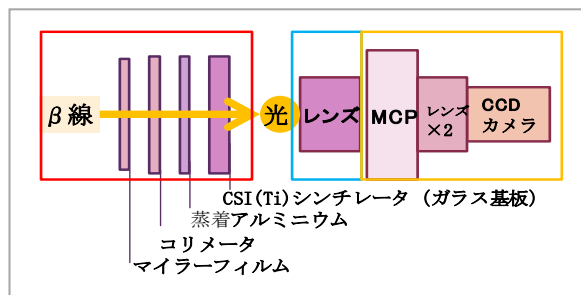


図 2 板状シンチレータとレンズの組み合わせによる画像取得イメージ

(2) リン輸送機構への応用

植物はリンを根のどの部位から吸収するのか? および、吸収したのちどのように導管や篩管へ輸送するのか? の二点に注目し、根に ^{32}P もしくは ^{33}P トレーサを与え、動態解析を行う。シロイヌナズナの根をモデルにし、根のリン酸吸収部位、導管や篩管とその周辺細胞での輸送経路を調べる。

① シロイヌナズナ根での解析

根に一時的にリン酸 (^{32}P 、 ^{33}P) を施与し、その動態をイメージング解析する。(エネルギーの違う ^{32}P 、 ^{33}P のうち、より画像取得に

適した方を用いる) この実験から、根から吸収されたリン酸の導管への移行経路を解明する。

② リン酸輸送変異体の利用

リン酸動態に関する多様な変異体株を分譲して頂き、①と同様のイメージングを行う。この実験から、導管や篩管への輸送におけるトランスポーターの機能を考察する。リン酸輸送体の発現が異なる変異体株は、シロイヌナズナを用いてリン酸輸送体の研究を進めているフランス CNRS/CEA/Univ Aix-Marseille の Nussaume 博士より分譲していただく。

4. 研究成果

(1) コリメータの検討

システムの分解能の向上のため、サンプル内部から 360 度すべてに放射する放射線のうち検出器に直進するもののみをコリメータにより選抜した場合の効果について検討を行った。具体的には、サンプル (^{32}P) とシンチレータ面の間にコリメータ (金属格子 $\phi 10\mu\text{m}$ 程度) を置き、格子を通過する β 線と金属で遮蔽される β 線に分けてノイズを防ぐことを試みた。

その結果、アルミニウム製、厚さ $50\mu\text{m}$ 、 $\phi 10\mu\text{m}$ を用いた実測実験では、コリメータによる効果が得られなかった。核種のエネルギーの強さとコリメータの材質、厚み、シンチレータの材質、ピッチなどの条件検討が必要なことから、シミュレーションを用いたところ、シンチレータ内やコリメータ内部において ^{32}P の放射する電子線が迷走することが、低分解能の原因であることが判明した。また、シンチレータの素材がプラスチック、コリメータの素材が比重の大きな金属の場合ではわずかな効果が望めることが分かった。しかし、コリメータの効果は、電子線よりも光子線、低エネルギー核種 (^{55}Fe や ^{73}As) で大きいこ

となど、放射線の性質によりその効果は異なり、コリメータの導入については望むほどの効果は得られなかった。(図 3)

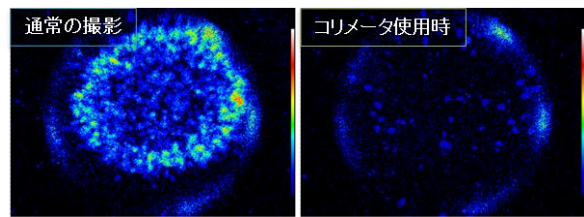


図 3 コリメータの有無とシグナルの違い
円型のシグナルでの実測 (外側の円は視野の淵) シグナル全体が弱くなり、位置情報は改善されなかった。

(2) 板状シンチレータの検討

板状のシンチレータとレンズの組み合わせによる像の拡大を検討した。まず、正立顕微鏡を基本とし、板状の FOS と対物レンズの組み合わせにより微細な組織 ($100\mu\text{m}$ 幅の根) 内の RI シグナル (^{33}P) を検出できることを確認した (図 4)。次に、FOS の表面保護材のアルミニウムを透明な保護材に変更したものを特別注文により作成したことにより、顕微鏡での明視野像を容易に取得できるようにし、植物組織の部位を RI トレーサの位置情報を正確に解析できるようにした。さらに対物レンズの倍率、RI トレーサ量の検討を行った結果、最大 40 倍までに拡大した組織内の RI トレーサの検出に成功した。また、数分間の画像取得を連続的に行うことにより、RI トレーサの動態を動画として取得出来るようにした。また、同一のカメラで明視野と蛍光像も取得できるようにした。

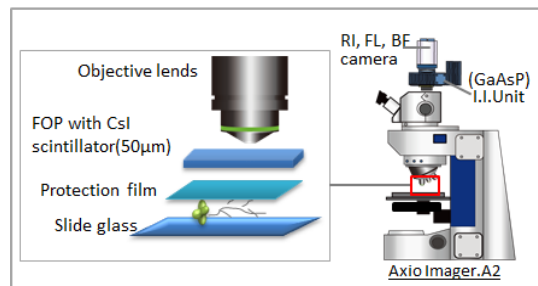


図 4 改良したシステムの仕組み
微弱光観察用の対物レンズを使用

(3) 植物の根からの吸収

植物サンプル（シロイヌナズナ）のリン酸動態解析実験を行った。まず、シロイヌナズナ野生型株の根を用いて、栽培時のリン酸栄養環境の違いにより生じる根のリン酸吸収分布を調べた。これにより、リン酸欠乏条件下で栽培したサンプルでは、根端約 200 μ m 領域での蓄積が見られ、リン酸潤沢な条件下では見られず、リン酸条件により根端の機能の違いが生じることが示された。さらに、パルス的に吸収させた ^{32}P の挙動解析では、根端への蓄積が数 10 分後に生じていたことから、根端に蓄積しているリン酸は、培地からの吸収のみではなくその他の組織から根端への輸送によっても生じることを確認した。（図 5）

次に、フランス CNRS/CEA/Aix-Marseille univ. の Nussaume 博士より提供を受けた 6 つのリン酸トランスポーター機能を制御した形質転換体と野生型株の根のリン酸吸収を連続画像として取得し解析を行った（図 6）。GFP により示されるリン酸トランスポーターの分布とリン酸吸収分布について 4 つのラインで相関が見られた。本システムの解析によりリン酸吸収において根の細胞が異なる機能を持つことを新たに示すことができた。

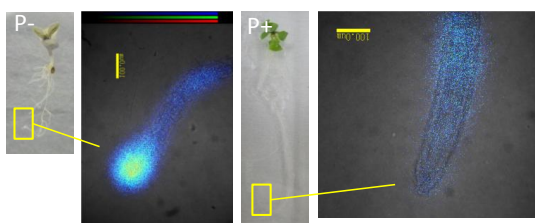


図 5 リン酸欠乏の有無とリン酸集積の違い



図 6 シロイヌナズナ野生型株の根端 500 μ m のリン酸吸収移行のイメージ スケールバーは 200 μ m

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

(1) Satomi Kanno, Masato Yamawaki, Atsushi Hirose, Hiroki Ishibashi, Natsuko Kbayashi, Keitaro Tanoi, Laurent Nussaume, Tomoko M. Nakanishi
“Development of Real-Time radioisotope Imaging Systems for Plant Nutrient Uptake Studies” 査読有
Royal Society, Philosophical Transaction B, Vol. 367, 2012, pp1501-1508
DOI:10.1098/rstb.2011.0229

(2) Laurent Nussaume, Satomi Kanno, Helene Javot, Elena Marin, Nathalie Pochon, Amal Ayadi, Tomoko M. Nakanishi and Marie-Christine Thibaud
“Phosphate import in plants: focus on the PHT1 transporters” 査読有
Frontiers in PLANT SCIENCE, Vol. 2, No. 83, 2011, pp. 1-12, 2011
DOI:10.3389/fpls.2011.00083

〔学会発表〕（計 2 件）

(1) 菅野里美、山脇正人、中西友子
「リン酸の吸収部位の違いから見る植物体内でのリン酸輸送解析」
第 52 回日本植物生理学会年会、
仙台、2011 年 3 月 18 日

(2) 菅野里美、山脇正人、中西友子
「リアルタイム RI イメージングシステムを用いたリン酸吸収時の根圏イメージング」
日本土壌肥料学会 2010 年大会、
札幌、2010 年 9 月 7 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/radio-pl antphys/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 里美 (Kanno Satomi)

東京大学大学院・農学生命科学研究科・特任研究員

研究者番号：2056010

(2) 研究協力者

Laurent NUSSAUME

CNRS/CEA/Aix-Marseille univ.

Professor, Head of laboratory