

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04493

研究課題名(和文) 超高感度RIイメージング検出系を用いた植物生長調節物質の動態解析

研究課題名(英文) Imaging analysis of plant growth regulator using radioisotope imaging technique

## 研究代表者

田野井 慶太郎 (Tanoi, Keitaro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：90361576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物ホルモンであるオーキシンを放射性同位体で標識し、その分布様式をライブイメージング法および高解像度可視化法での検出を試みた。その結果、ライブイメージング法ではシロイヌナズナの根において、葉から根へ輸送されるオーキシンを経時的に捉えることに成功した。続いて、高解像度解析では、凍結切片を作成した後、ラジオルミノグラフィおよびオートラジオグラフィを用いてオーキシン分布を可視化し、維管束や維管束間組織のオーキシン分布を可視化することに成功した。以上の取り組みにより、植物ホルモンの分布情報を得るための手法として、放射性同位体を用いたイメージング解析が有効な方法の1つであることを示せた。

研究成果の概要(英文)：We applied two types of radioisotope imaging technique, live imaging technique and high resolution visualization technique to investigate auxin distribution in plant. As a result, our live imaging technique visualized  $^{14}\text{C}$ -auxin moving from the upper part of the plant to the root tip. The high resolution visualization technique visualized  $^{14}\text{C}$ -auxin at vascular bundle and vascular bundle organization. The present study showed that the radioisotope imaging techniques are able to obtain auxin distribute information.

研究分野：放射線植物生理学

キーワード：アイソトープイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

植物の成長、分化を調節している植物ホルモン等生理活性物質の機能を調べることは、植物の生長そのものの理解に必須であるのみならず、農薬や殺虫剤としての農業応用に欠かせない情報である。植物生長調節物質は微量で機能を発揮するが、微量であるがためにMALDI法を応用したイメージング装置などで物質分布を検出するのは容易でない。物質の分布そのものの情報がない現況、維管束を通っていることを想定したり、輸送体の位置からの推察をしているのが現状である。なんとかして実際の植物生長調節物質の分布を知ることが、この分野の発展に必須なことである。

本研究グループは、これまで植物におけるRIイメージングの技術開発を実施してきた。その際のターゲットは、無機元素であった。これまで、多くの核種で可視化が可能となってきた。その中でも<sup>14</sup>Cの可視化が成功していることから、今回、極微量で機能する植物ホルモンの可視化を計画するに至った。

### 2. 研究の目的

RIイメージング法で植物ホルモン(オーキシン)の可視化を、(1) ライブイメージング、および(2) 組織レベルの高解像度で可視化することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 寒天培地で6日間生育させたシロイヌナズナにおいて、<sup>14</sup>Cで標識したインドール-3-酢酸(IAA)を子葉に添加した。その後、寒天培地を金属の台に貼り付けた後、縦置きとし、その金属台をライブイメージングに供した。ライブイメージングは、当研究室で開発しているreal-time radioisotope imaging system (RRIS)を用いた。1時間ごとに15分間の積算時間で画像を取得し、24時間撮像を行った。

(2) バーミキュライトで栽培したシロイヌナズナにおいて、抽苔後の花茎を20mm切り出し、エッペンドルフチューブ内で茎頂側から1.8 mMの<sup>14</sup>C-IAAを投与し、6時間後に、凍結切片法により凍結したまま薄切片を作成した。その後、凍結状態で、radioluminography(RLG)をBAS IP TR (Fuji Film)を用いて、またmicroautoradiography(MAR)を原子核乳剤を塗布したガラススライドを用いて行った。

(3) 上記(2)と同様の実験を播種後4日目のダイズの根で実施した。

(4) 播種後5日目のイネにおいて、根端より2-3cm上部に<sup>3</sup>H-IAAを20分間投与し、2時間水耕栽培の後、根端付近を凍結切片MAR法で解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 根におけるIAA動態のライブイメージング

あらかじめ、通常のオートラジオグラフィを用いた予備実験で、10 μMの<sup>14</sup>C-IAAを葉に添加の後、4時間後に根で<sup>14</sup>Cのシグナルが見え始めることを確認した。その上で、ライブイメージングの取得を目指したが、根においてシグナルが得られなかった。そこで、生理学的な考察を一時保留とし、<sup>14</sup>Cの検出を最優先とし添加する放射能を高めることとした。その際、<sup>14</sup>Cを増やすとその分IAA濃度も高まることとなり、最終的には10mMで添加して初めてわずかに根で<sup>14</sup>Cの検出が可能となった。その様子を見ると、根の基部側のシグナルが強く、根端に向かって弱くなるプロファイルであり、その傾向はシグナルが見え始めた<sup>14</sup>C-IAA投与後12時間から実験終了の24時間後まで、同様であった。一方で、比較対象として<sup>14</sup>C-sucroseで撮像したところ、根端に最も強いシグナルが得られ、基部側はほとんどシグナルが得られなかったことから、sucroseとIAAの動きは全くことなることがわかった。一方で、IAAの濃度を考えた時10mMの処理では生理学的議論をするのは困難であった。

#### (2) シロイヌナズナ花茎における<sup>14</sup>C-IAAの高解像度検出の試み

① RLGによる<sup>14</sup>C-IAAの検出では、維管束および維管束間組織を結ぶリング上に<sup>14</sup>Cが検出された。しかし、RLG像の解像度では組織レベルの議論が難しかった(図1)。

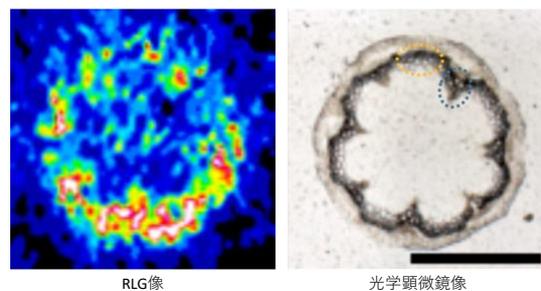


図1 Radioluminography(RLG)によるシロイヌナズナ花茎の<sup>14</sup>C像。切り出した花茎の茎頂側から<sup>14</sup>C-IAAを投与した。スケールバーは500μm。維管束を青点線、維管束間組織を黄色線で表した。

② RLGよりも解像度が高い検出方法が求められたため、技術的には大変に難しい凍結下MARに挑戦した。その結果、MARでは、RLGよりも高い解像度で<sup>14</sup>Cを検出することができた(図2)

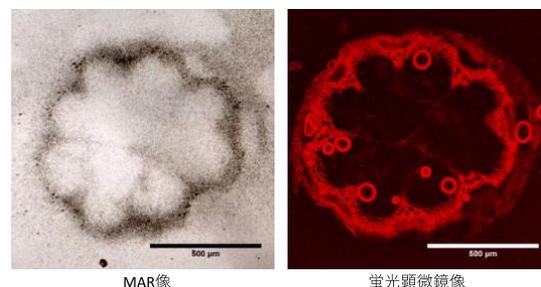


図2 microautoradiography(MAR)によるシロイヌナズナ花茎の<sup>14</sup>C像。切り出した花茎の茎頂側から<sup>14</sup>C-IAAを投与した。スケールバーは500μm。維管束を青点線、維管束間組織を黄色線で表した。

### (3) $^{14}\text{C}$ -IAA の根における分布

当初、シロイヌナズナの根において  $^{14}\text{C}$ -IAA の検出をさまざま試みたが、画像を得るに至らなかった。そこで、より太い根で検証することとし、ダイズを用いることにした。

$^{14}\text{C}$ -IAA を投与したダイズの根について凍結切片を作成し RLG により可視化を試みたところ、図3に示すように画像を得ることができた。 $^{14}\text{C}$ -IAA と同様の方法で  $^{14}\text{C}$ -sucrose を投与した場合の可視化と比較すると、IAA は sucrose に比べて、その輸送される過程で維管束のみならず、皮層にも分布することがわかった。一方で、sucrose は、維管束から漏れることがほとんどなく輸送されることがわかった。尚、この後 MAR でのより高解像度での可視化にも挑戦したが、残念ながら画像を得ることはできなかった。

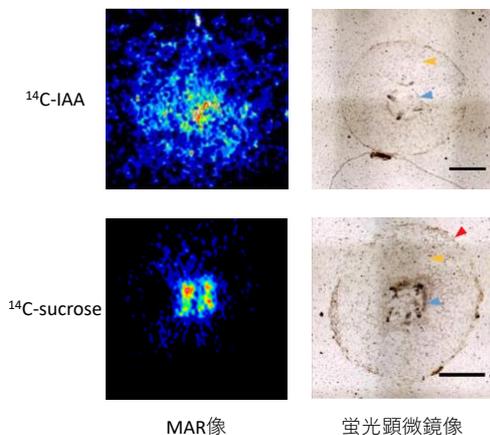


図3 microautoradiography(MAR)によるダイズ根の $^{14}\text{C}$ 像。ダイズ子葉から $^{14}\text{C}$ -IAAもしくは $^{14}\text{C}$ -sucroseを投与した。スケールバーは500 $\mu\text{m}$ 。維管束を青点線、維管束間組織を黄色線で表した。

### (4) $^3\text{H}$ -IAA を利用した高解像度可視化

イネの根端において  $^3\text{H}$ -IAA を検出するにあたり、今回は縦断面で切片を作成し観察した。その結果、中心柱および表皮にシグナルが観察される一方で、皮層ではほとんど検出されなかった。

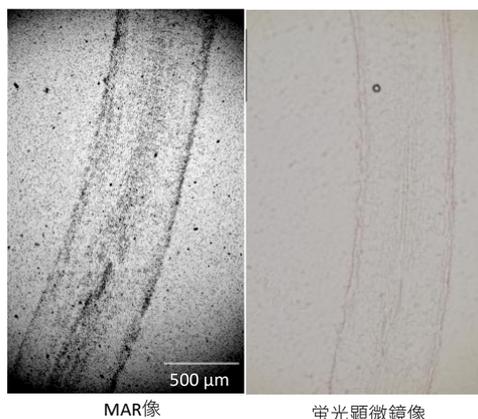


図4 microautoradiography(MAR)によるイネ根の $^3\text{H}$ 像。イネの根端上部から $^3\text{H}$ -IAAを20分間投与し、洗浄後2時間水耕栽培した後、根端において縦面切片を作成し、MARに供した。

### (5) アイソトープを用いたイメージング手法の適用

その他、共同研究にてアイソトープを用いた実験を行い、花が成長を停止して果実を作る際のオーキシンの役割解析 (Yamaguchi et al., 2017) を実施した。また、生理活性物質ではないが、 $^{14}\text{C}$ -酢酸を植物に投与し、植物体内の分布解析を行うとともに、ヒストンのアセチル化を  $^{14}\text{C}$  検出で実施した (Kim et al. 2017)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Sugita, R.; Kobayashi, N.I.; Hirose, A.; Iwata, R.; Suzuki, H.; Tanoi, K.; Nakanishi, T.M., “Visualization of how light changes affect ion movement in rice plants using a real-time radioisotope imaging system”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 312 717-723 (2017) 査読有
- ② Kim, J.M., Kim T.T., Matsui A., Tanoi, K., Kobayashi, N.I., Matsuda, F., Habu, Y., Ogawa, D., Sakamoto, T., Matsunaga, S., Bashir, K., Rasheed, S., Ando, M., Takeda, H., Kawaura, K., Kusano, M., Fukushima, A., Endo, T.A., Kuromori, T., Ishida, J., Morosawa, T., Tanaka, M., Torii, C., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Ogiyama, Y., Saito, K., Shinozaki, K., Devoto, A. & Seki, M., “Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants”, *Nature Plants* 3 17097 (2017). 査読有
- ③ Yamaguchi, N.; Jiangbo Huang.; Yifeng Xu.; Tanoi, K.; Ito, T., “Fine-tuning of auxin homeostasis governs the transition from floral stem cell maintenance to gynoecium formation.”, *Nature Communications* 8, 1125 (2017). 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① 木下慶生; 根岸辰成; 廣瀬農; 小林奈通子; 中西友子; 田野井慶太郎, “凍結切片法による植物根における  $^{45}\text{Ca}$ 、 $^{35}\text{S}$  の分布解析”, 第53回アイソトープ・放射線研究発表会 (東京大学弥生講堂) 1 a-III-03 (2016, Jul. 6).
- ② 根岸辰成; 廣瀬農; 田野井慶太郎; 中西友子, “凍結切片作製による植物

根端の<sup>3</sup>H標識オーキシン分布の可視化”,  
第 52 回アイソトープ・放射線研究発表  
会 (東京大学弥生講堂) 2a-III-03  
(2015, Jul. 9).

研究者番号 : 30124275

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田野井 慶太郎 (TANOI, Keitaro)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教  
授  
研究者番号 : 90361576

### (2) 研究分担者

矢崎 一史 (YAZAKI, Kazufumi)  
京都大学・生存圏研究所・教授  
研究者番号 : 00191099

高梨 功次郎 (TAKANASHI, Kojiro)  
信州大学・先鋭領域融合研究群山岳科学研  
究所・助教  
研究者番号 : 10632119

小林 奈通子 (KOBAYASHI, Natsuko)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助  
教  
研究者番号 : 60708345

広瀬 農 (HIROSE, Atsushi)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特  
任講師  
研究者番号 : 90708372

杉田 亮平 (SUGITA, Ryohei)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特  
任助教  
研究者番号 : 60724747

### (3) 連携研究者

浅見 忠男 (ASAMI, Tadao)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教  
授  
研究者番号 : 90231901

中村 英光 (NAKAMURA, Hidemitsu)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助  
教  
研究者番号 : 40724191

岡田 憲典 (OKADA, Kazunori)  
東京大学・生物生産工学研究センター・准  
教授  
研究者番号 : 20312241

中西 友子 (NAKANISHI, Tomoko)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特  
任教授