

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18657

研究課題名(和文) 高感度・高分解能イメージング法によるイネ植物体中における微量元素動態の解明

研究課題名(英文) The analysis of minor element dynamics in rice with high-resolution / high-sensitivity imaging technique

研究代表者

廣瀬 農 (Hirose, Atsushi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任講師

研究者番号：90708372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、放射性同位体トレーサー法と連続凍結切片法を組み合わせることにより、米内部における重金属および微量必須元素の三次元分布を網羅的に可視化することを目指した。カドミウムと亜鉛については開花から登熟完了までの種子内部における元素動態を可視化した。カドミウムと亜鉛はともに登熟中期に胚乳中央部に高濃度に集積するが、亜鉛濃度が登熟期に低下する一方、カドミウムが胚乳中に残留する現象が確認された。これら2元素に加え、ショ糖、鉄、マンガン、鉛、コバルト、ニッケルについても動態解析法を確立し、現在詳細な解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：In this research, it was aimed to visualize the three-dimensional distribution of the heavy metal and small amount indispensable element in rice grain comprehensively by combining serial freeze-sectioning with radioisotope radiotracer technique. The dynamics of elements inside rice grain from bloom to grain mature was visualized. Cadmium and zinc were piled up on an albumen central part with high concentration in growth of grain seed to full of nutrition middle term together, but zinc concentration fell in a ripening stage. On the other hand, cadmium stays behind in the albumen. In addition to these 2 elements, analyzing protocols were established about sugar, iron, manganese, lead, cobalt and nickel, and in-depth analysis is advancing.

研究分野：放射線植物生理学

キーワード：カドミウム アイソトープ 重金属 イネ トレーサー

1. 研究開始当初の背景

食物の重金属汚染は世界的な問題であり、国連環境計画(UNEP)は 2000 年代以降に水銀(Hg)、カドミウム(Cd)、鉛(Pb)等を対象とした重金属プログラムを開始している。米は日本を含むアジア地域における主食であり、その重金属汚染はかつて日本が経験した「イタイタイ病」のように住民の健康リスクに直結する。アジア地域は多くのレアメタル・レアアース鉱山および廃棄物の再資源化施設が存在することから環境中への重金属放出が懸念される地域でもある。以上の理由から米の重金属汚染の防止・軽減は農業上重要な課題であり、その基礎知見としてイネ植物体中における重金属動態の解明が強く望まれている。

重金属の中でも、Hg、Cd、Pb 等は植物に必須ではないことから、植物は必須元素と誤認して吸収・輸送すると考えられており、近年では分子生物学的手法によってカルシウム(Ca)、鉄(Fe)、マンガン(Mn)、亜鉛(Zn)等を通す輸送体が Cd の吸収・輸送に関わることが明らかにされている。ただし、篩管液を分析した研究からは、Cd と Zn は篩管液中で結合している有機物が異なることが示唆されており、米の画分ごとの金属含有率を測定した研究からは、Cd、Pb は Fe、Zn と比較して胚乳への分配率が高いことも報告されている。

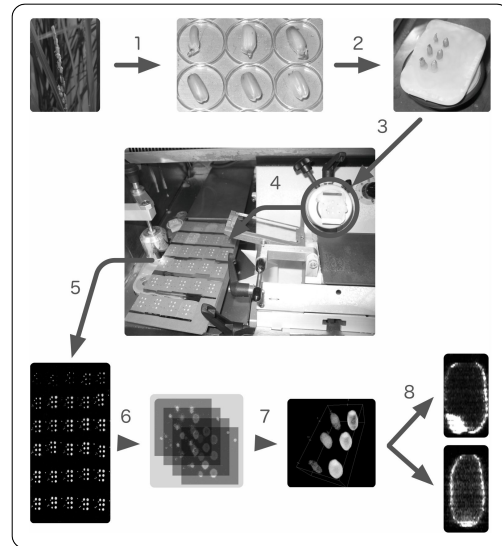
2. 研究の目的

前項で例示した研究はごく一部に過ぎず、イネ植物体中の重金属動態に関する研究は強い社会的要請を背景に盛んに行われて来た。にも関わらず、Hg、Cd、Pb 等の有害重金属および、重金属輸送と関係があると推測される Fe、Mn、Zn といった微量必須元素の米内部の分布を可視化・対比した報告は非常に少ない。近年では放射光蛍光 X 線分析(S-XRF)、あるいは二次イオン質量分析(SIMS)等の先端機器によって徐々に知見が増えているものの、登熟過程における動態がほぼ解明されているカリウム(K)等の多量元素と比較すると、断片的な情報に留まっている。

そこで本研究では、イネ植物体(特に可食部である米)における微量元素動態を、申請者が改良に取り組んできた高感度・高分解能イメージング手法を用いて網羅的に可視化し、代表的な微量元素の動態について詳細な基盤データを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

人工気象器内で 1/2 木村氏 B 液を用いて水耕栽培したイネ(日本晴)を供試植物とした。登熟期間全体における元素動態を解析する試験では出穂直前から各種の放射性トレーサーを含む水耕液に切り替えて栽培を継続し、開花後特定の日数が経過した種子を採取した。また、特定時期における元素流入経路を解析する試験では、出穂後の特定時期に止め葉節に木綿糸を貫通させ、放射性トレーサーを含む水耕液を吸収させた。採取した種子試料からは連続凍結切片を作製し、放射線感



光体としてイメージングプレートを用いて切片中の放射能分布を画像化した(図1参照)。

図1：種子試料内部の放射性トレーサー可視化手順 採取した種子(1)を凍結包埋・薄切(2・3・4)し、全切片に対し同時に放射線像を取得した(5・6)。さらに計算機上で画像処理を行うことで、種子内部における三次元分布像を得た(6・7・8)。

さらにこの画像を解析ソフトウェア ImageJ を用いて処理することで、登熟過程の各段階における種子中の元素分布を3次元画像として再構築し、解析を行った。

4. 研究成果

(1) 既に予備的結果を得ていたカドミウムと亜鉛に関し、登熟期間における詳細な動態を解明した。

カドミウムと亜鉛はともに、登熟中期に胚乳中央部に高濃度に集積する特徴的な挙動を示す。ただし、カドミウムでは登熟完了まで胚乳への集積が継続するのに対し、亜鉛では登熟末期に胚乳中央部への集積が解消さ

れることが観察された（図2、3参照）。また、亜鉛が集積部位内の濃度が比較的均一であるのに対し、カドミウムではドーナツ状、もしくは二重円状の集積構造を持つという差異も認められた。

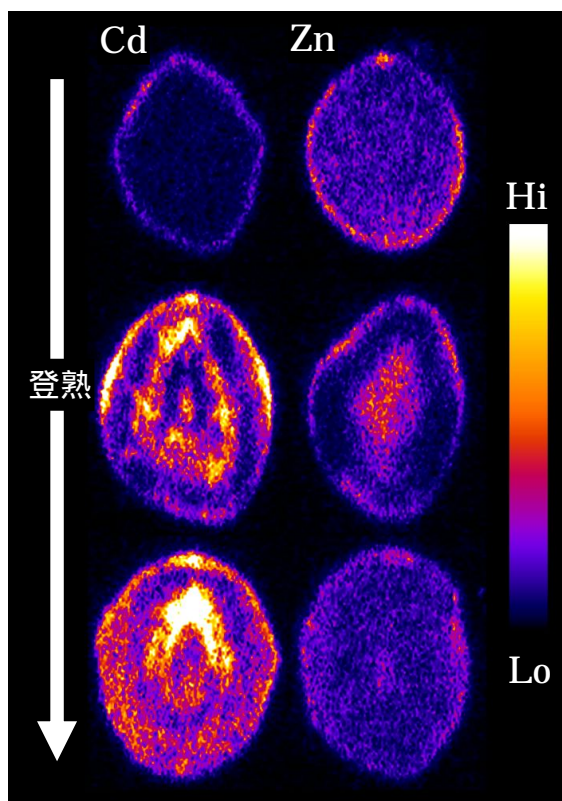


図2：登熟過程におけるカドミウムと亜鉛の種子横断面内分布の変化 双方ともに登熟初期の胚乳内では目立った濃淡は無いが、登熟中期になると胚乳中央部に集積が認められる。登熟末期の段階では、カドミウムでは胚乳中央部への局在が残るのに対し、亜鉛では再び濃淡に乏しい状態に戻る。

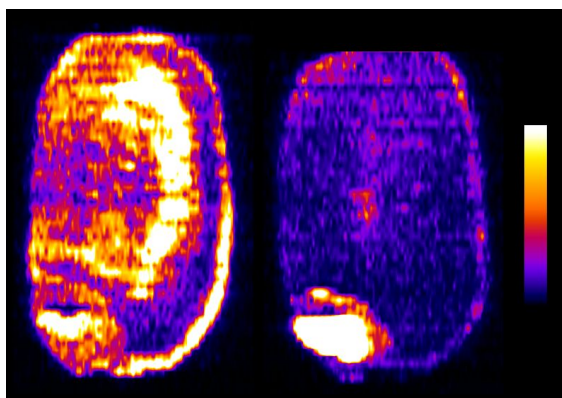


図3：登熟末期のカドミウムと亜鉛の種子縦断面内分布 亜鉛の大部分が画像左下の胚に局在している一方、カドミウムは胚乳内にも相当量が残留している。

これらの図が示す通り、登熟完了時点では亜鉛は胚に強く局在し、胚乳における濃度が低下していることから、登熟末期に胚乳から胚への亜鉛移行を促す何らかのメカニズムが存在することが強く示唆される。

なお、亜鉛と同じく登熟中期と末期で局在がダイナミックに変化する元素であるカリウムの場合、登熟中期は胚乳内に遍在してデンプン合成に寄与し、デンプン合成終了後にアリーロン層へ集積されると考えられている。このことから、亜鉛も登熟中期に胚乳で何らかの役割を果たしており、それが終了した後に胚へと輸送されている可能性がある。

一方、カドミウムも胚に集積する傾向はあるものの、亜鉛と比べるとその傾向は弱い。この理由を説明する仮説としては、

- カドミウムは亜鉛と誤認されて胚乳まで輸送されるものの、登熟末期における胚乳から胚への輸送メカニズムには認識されず、結果的に胚乳に残留している。
- カドミウムの持つ毒性から胚（幼芽・幼根）を守るため、カドミウムを胚乳に留めるための独自のメカニズムが存在する。

等が考えられる。

カドミウムと亜鉛の挙動の違いを説明する要素の一つとして、従来から植物中の有機物（例えばグルテリン）との化学結合性の違いが着目されている。しかし、既往の報告に有るグルテリンの種子内局在と今回観察されたカドミウムの局在には若干の差異も認められるため、現段階ではメカニズムの詳細は依然不明である。

ここまで述べた成果については日本土壌肥料学会 2016 年度佐賀大会にて発表した。

- (2) カドミウム・亜鉛の動態を解明する手がかりとするため、鉄、マンガン、炭素(シヨ糖)、水素(水)についてトレーサー試験を実施した。

カドミウムと亜鉛の動態を解明する手掛かりを得るため、一部のトランスポーターがカドミウムと共通していることが知られている鉄、マンガン、さらに登熟時における物質移動のマーカとなるシヨ糖、水についてトレーサー試験を行ない、鉄、マンガン、シヨ糖について動態を可視化する系を確立した。

現在はトレーサー添加試験およびその後の試料採取まで完了し、冷凍保存した種子試料について順次データ解析を進めている段階である。

- (3) 種子内動態に関する既往の知見がほとんど無い重金属(鉛、コバルト、ニッケル、ヒ素、水銀)についてトレーサー試験を試みた。

既往の知見がほとんど無い鉛、コバルト、ニッケル、ヒ素、水銀についても、放射性トレーサー法による動態解析系の構築を試みた。これらの元素のうち鉛、コバルト、ニッケルについては実験系を確立し、開花から登熟までの各段階における種子試料を得た。

これら元素についても解析を進めており、日本土壤肥料学会 2017 年度仙台大会での発表を予定している。

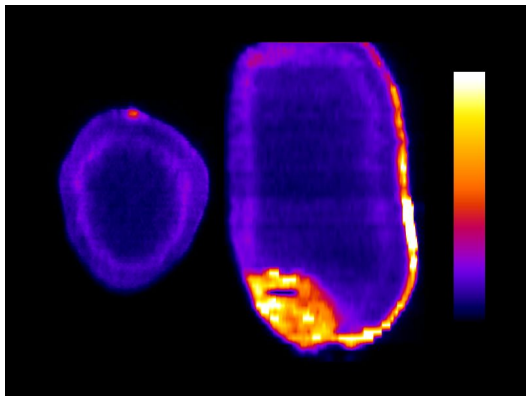


図4：ニッケルの完熟種子内分布（検証中）

今回新規に検討した元素の中で、ニッケルはこの図が示す通り、胚乳に比較的多く留まる傾向を示した。現在は再現性を確認している。

なお、水銀を用いた試験では、画像データ（図5）は得られたものの、放射性水銀（Hg-203）の溶液に共存する安定水銀の濃度が高く、添加後に植物が枯死する等の問題が生じた。このため、得られた分布が正常な植物体中の分布を示しているとの確認が得られていない。

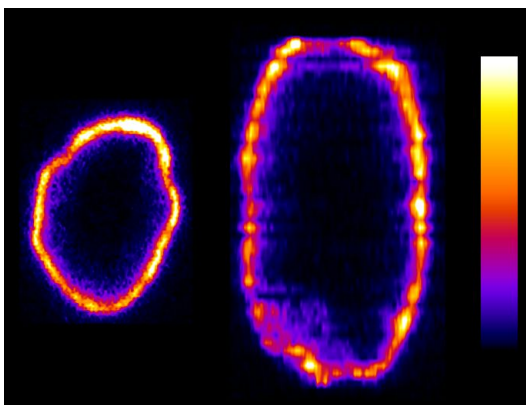


図5：水銀の種子内分布（参考） 画像データが得られることは確認できたが、この分布が本来の分布を示しているか否かの確認が取れなかった。

ヒ素に関しては画像化に十分な量の放射性ヒ素（As-73）を植物に投与する系を構築できなかった。(2)で可視化できなかった水素を含め、今後の課題である。

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)

〔学会発表〕(計 1 件)

廣瀬 農、田野井 慶太郎、登熟中のイネ種子内部における亜鉛とカドミウムの動態比較、日本土壤肥料学会佐賀大会（佐賀大学本庄キャンパス、2016.9.20-22）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 農 (HIROSE, Atsushi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任講師

研究者番号：90708372