

研 究 報 告 書

「植物体内物質動態に関する表現型の定量評価基盤技術の構築」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 12 月～2019 年 3 月

研 究 者: 田野井 慶太郎

1. 研究のねらい

本研究では、植物体内の放射性物質を非破壊で可視化する技術の対象を作物に拡大すること、および作物中の物質動態の解析に数理モデルを導入し定量評価する基盤技術を創出することを目的とした。

作物生産を考える上で水・肥料は基本的な事項であり、植物は物質として無機物(CO₂を含む)と水のみで成長する。これらの存在量に関連した環境ストレスは多く、そのため食料安定供給に向けての耐性植物の選抜や耐性・感受性機構の解明が進められている。これまでは、無機栄養素や有害元素に対する植物の耐性・感受性を評価する際、バイオマス量や地上部全体での元素濃度が示されることが一般的であり、その植物のどこがどの程度の欠乏・過剰状態なのか等、対象元素や物質の体内分布・濃度・移行の詳細が示されていないことが多かった。この状況下では、生理学的応答の大枠を捉えることができる一方、局所的な応答解析の感度が下がった研究となりがちである。ある無機栄養素やある物質の分布・動態とともにその物質に関与がある生理現象を解析することが、詳細な生理メカニズム解析の上で不可欠であると考えた。

そこで本研究では、作物としてイネを材料とし、物質動態・分布解析の高度化に焦点をあてた。最初に、(1)放射性同位体を用いた可視化技術について、作物用にシステムを再構築することにより、物質動態・分布という重要な「表現型」を把握する技術とすることを目指した。その際、放射性同位体のイネへの投与方法について、経根・経導管に加えて、師管への直接投与方法を目指した。次に、(2)こうして得られた画像情報に対して、数理モデルとシミュレーションを組み合わせることで、物質動態を構成する因子(師管・導管輸送中の輸送体の機能等)の抽出を目指した。さらに、(3)物質分布が明らかとなった画像データを元に、物質動態・分布において特徴のある箇所を画像取得したサンプルそのものから採取し、網羅的遺伝子発現解析等を行うことで、その箇所で行っている物質動態イベントが担う植物の生理現象の解析を目指した。具体的には、CO₂およびその光合成産物、また無機栄養素としてマグネシウムおよび多量にあると有害であるナトリウムを解析対象とした。

2. 研究成果

(1)概要

研究テーマ (1)「RI 可視化撮像装置の改良と RI イメージングの作物研究応用」

本研究の基礎となるイメージング装置の改良については、作物を解析対象とできること、植物の生育環境をコントロールできる状態でイメージングできることの 2 つを目標とした。その前段階として、シロイヌナズナの花茎においてイオン種により移行の様式が大きく異なる

ことをライブイメージングで示した(Sugita et al. 2016)。続いて、視野拡大の改良において、放射線を光に変換する素材(シンチレータ)を、加工の容易さや価格の低さからプラスチックを採用して行うこととした。様々なプラスチックシンチレータの中から効率のよい素材・厚さを選択し、さらに植物から出てくるバイオフィトンで遮光しつつ放射線は透過させる素材を選定した結果、60cm×60cmの視野で作物を撮像できる装置を作製することができた(Sugita et al. 2018)。この装置は、光や温度、CO₂濃度の制御ができる大型チャンバーを元に組み立てたことから、環境制御可能な作物用イメージング装置となった。続いて、植物へのアイソトープ投与方法を様々検討する中で、師管から直接アイソトープを導入する挑戦を行ったが、残念ながら成功しなかった。一方、植物におけるアイソトープイメージング技術を用いた共同研究を複数行い、それぞれのプロジェクトにおいて直接的エビデンスが得られるアイソトープトレーサー実験の利点を活かした成果を得ることができた。

研究テーマ (2) 「RI イメージングと数理モデルによるイオン動態解析」

RI イメージングで得られる画像を基にイオン輸送を担う因子を理解する解析系の構築を目指し、イネにおけるナトリウムイオンの導管内輸送に焦点をあてて解析を行った。導管の中の Na⁺イオンが葉鞘を通過する際に Na⁺イオンを導管から排除し葉身に到達しないように働く作用を発見し、OsHKT1;5 がその機能を担うことを RI イメージングで示すことができた(Kobayashi et al. 2017)。この知見を参考に、OsHKT1;5 の植物体内での Na⁺イオン排除輸送に関する親和性や速度を数理モデルで算出することを目指した。イネ葉鞘の細胞配列に基づく cell データを構築し、輸送体による能動輸送を考慮した単純核酸方程式による数理モデルでイオン輸送をシミュレーションするとともに、そのシミュレーション結果を RI イメージングによる実際のイオン動態に近似するよう、輸送体の能力や細胞間輸送に関する因子を決定していく解析を試みた。

(2) 詳細

研究テーマ (1) 「RI 可視化撮像装置の改良と RI イメージングの作物研究応用」

本システムは、10cm×10cm で市販されている CsI シンチレータを用いて構築した。まずは、当概シンチレータを2枚利用することで視野を10cm×20cmとし、シロイヌナズナの花茎における各イオンの輸送動態を非破壊で24時間ライブイメージングした。その結果、多くの核種において可視化が可能であり、さまざまなイオンがそれぞれの輸送様式において花茎に分布していく様子を経時的に観察することができた(図1)。

続いて、本システムを作物の大きさでも対応可能にするための大型化を試みた。光、温度に加えて CO₂ 濃度もコントロールできる大型チャンバーを準備し、放射性同位体イメージングを取得するためのフォトンカウンティングカメラを設置する加工を行い、さらに光漏れがなくなるよう、大型チャンバー全体を暗幕で囲った。次に、視野拡大を目指し、シンチレータを改良した。安価かつ加工が容易なプラスチックシンチレータを複数入手し放射線-光変換効率や解像度を評価すること

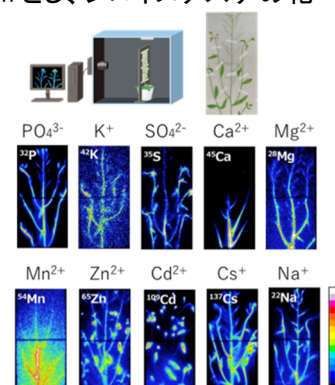


図1 各イオンの24時間後の分布像。Sugita et al. 2016 PCP より改変。

で、効率のよい素材および厚さを選定した。選定したシンチレータにおいて、植物由来の生物発光を遮光する一方で植物中からの放射線はできるだけ遮蔽しない工夫を施した結果、視野およそ 60cm×60cm での撮像系を構築することができた。 $^{14}\text{CO}_2$ を投与したイネおよびトウモロコシを 24 時間測定したところ、ソースである各葉から ^{14}C 標識光合成産物が流出する様子を観察することができた(図 2)。

RI ライブイメージングを用いて、環境中の無機栄養が根から吸収し葉に到達するまでの過程において、蒸散が寄与する割合についてイネを用いて解析した結果、マグネシウムやカルシウムといった無機栄養素は蒸散速度によらず一定の速度で葉まで到達することが分かった。一方、リン酸については、葉鞘までは蒸散速度によらないが、葉鞘から葉身に移行する際には蒸散が駆動力であることを示すことができた(図 3)。この現象は非破壊かつ経時的な観察系だからこそ見出せた知見であると言える。

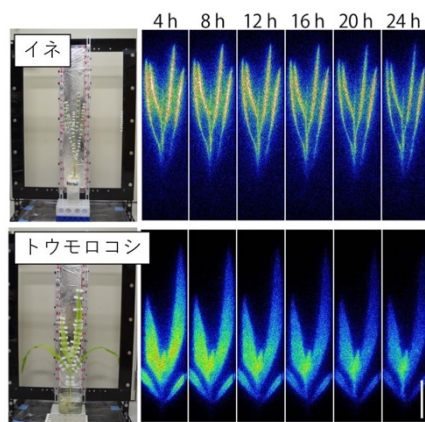


図 2 $^{14}\text{CO}_2$ を投与したイネおよびトウモロコシにおける光合成産物動態のライブイメージング。図中の bar は 10cm を表す。Sugita et al. 2018 JRNC より改変。

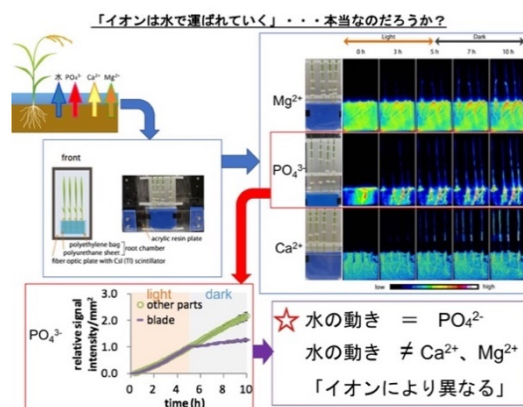


図 3 イオン輸送における蒸散の寄与, Sugita et al. 2017JRNC より改変。

研究テーマ (2) 「RI イメージングと数理モデルによるイオン動態解析」

本研究テーマでは、RI イメージングで得られる情報を基に数理モデルを活用してイオン輸送を担う因子を理解する解析系の構築を目指した。すなわち、特定の細胞において輸送体による能動輸送を考慮した上での単純拡散方程式による数理モデルによりイオン輸送をシミュレーションする時、そのシミュレーション結果を RI イメージングによる実際のイオン動態に近づくように、輸送体の能力や cell to cell 輸送速度に関する因子を決定していく解析を試みた。この際、それぞれの因子の数値は、可能性のある範囲内をランダムに発生させ、それぞれランダムに発生させた数値セット毎にシミュレーションを実施し、実際の RI イメージング像に近いセットの抽出を試みた。今回は、イネの葉におけるナトリウムの輸送に着目した。大量のナトリウムは有害であることから、植物は光合成の場である葉身に到達する前に導管から排除する機能を有する。その排除は主に根で行われるとされていたが、イネ葉鞘にお

いても排除機能があることが示された(Kobayashi et al, 2017 Plant J)。ここで葉鞘から $^{22}\text{Na}^+$ を投与し、葉身に到達するまでに導管から排除される様子について RI イメージングにより観察し、さらに葉鞘の組織観察から葉鞘組織を構成する細胞や細胞間連絡を模倣した細胞列情報を構築し、それぞれの細胞間およびアポプラスト輸送において単純拡散方程式で Na^+ 輸送を表現した。研究期間内では完結しなかったものの、現在取り組んでいる、導管から Na^+ の排除を担う OsHKT1;5 が null である変異体を得た後は、上記 RI イメージング実験およびシミュレーションを行い、OsHKT1;5 が担う寄与度について数値的情報を得ることができると考えている。

本課題では、RI イメージングを行ったサンプルにおいてオミクス解析を行うことが当初の狙いとしてあったが、RI 投与サンプルはたとえ核酸を抽出しても放射線管理区域から持ち出すことが出来ないため、nanopore の Minion を導入することとした。

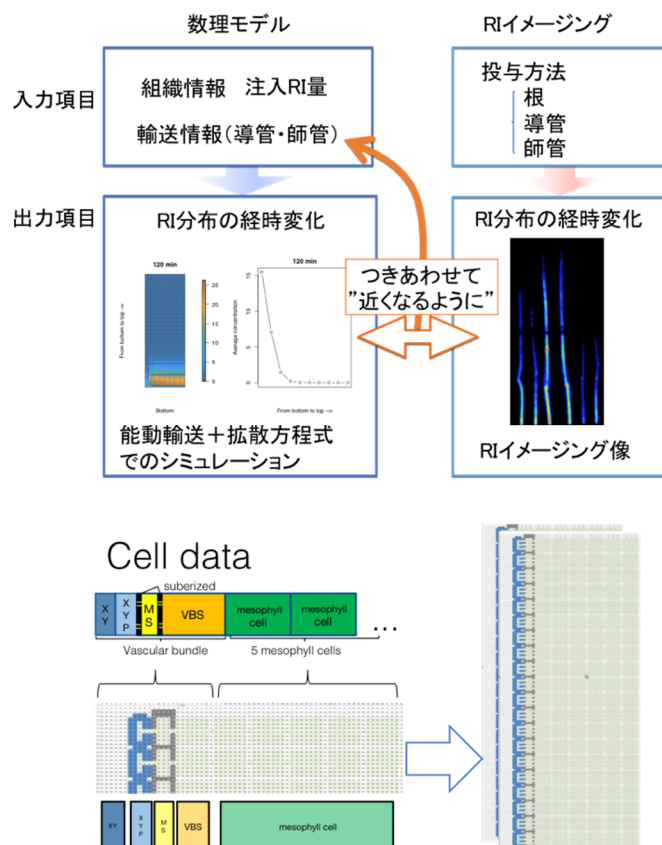


図4 植物組織観察から作成した cell data をもとにイオン輸送のシミュレーションをした結果を、実際の RI イメージング結果と付き合わせることで、輸送を担う輸送体の能力を数値化する試み。

3. 今後の展開

本研究により、60cm × 60cm という大きな視野により植物体内の物質動態をライブイメージング解析することができるようになった。この実験系は、乾燥や高温、高 CO_2 、アルカリ土壌など気候変動により問題となる要因が作物の栄養や生理に与える影響全般について活用することができる。今後、広く研究者にこの実験環境を開放し、イオンや光合成産物の動態を追跡しながら気候変動時代の植物生理学的諸問題に取り組んでいく所存である。本さがけや関連CREST研究者と既に一部はスタートしており、今後はネットワークを広げていきたい。

このライブイメージング装置で物質動態を解析する際、生じた生理学的応答を理解する上で、観察した組織そのものでRNA-seqできる環境は必須不可欠なものであると考えている。RIラベルしたサンプルを管理区域から持ち出せない壁があったが、RI管理区域内でRNA-seqでき

る技術を導入することができた。今後は、イオンや光合成産物の動きを捉えるとともにその組織でのRNA-seqを早々に行いたい。

様々なライブイメージングデータを数理モデルで解析する場合については、汎用的な解析方法の難しさを学んだので、今回取り組んだ輸送体による能動輸送と単純拡散を仮定したモデルを基本としつつ、それぞれのケースに合わせた解析をすることとしたい。

本研究では視野の拡大を行った。次は高解像度化がターゲットであると考えている。高解像度化には、現在の方式には限界がある。可視化手法の原理から変更する必要があると考えており、新たなイメージング技術の構築を目指したい。

4. 自己評価

（研究目的の達成状況、研究の進め方） 当初の研究目的は、主に、①作物での撮像系の開発 ②数理モデルを駆使した輸送機構の解析技術の確立 ③撮像データに基づく特定組織でのオミクス解析の3つであった。①については、フィールド植物として作物を想定し、作物における物質動態解析ができる実験系を組み立てることができた。一方で、②については計画通りには進まなかった。当初、汎用性の高いシステム構築を目指していたが、実験ごとにケースバイケースの対応が必要であることなど、作業を進める過程で、汎用性を高めることが困難であることを認識した。③についても計画通り進まなかった。当初はアイソトープの動態を元にした組織でのオミクス解析、特に網羅的発現解析を目指していたが、アイソトープを投与した植物における核酸を放射線管理区域外へ持ち出すことの難しさがあった。幸い、アドバイザーの先生からどこでもRNA-seqができるチップの紹介をいただいたので、さきがけ研究の期間内に技術を得ることが出来た。これら当初の目的に加えてウンカの嘴を利用したアイソトープの植物への師管への直接投与方法について挑戦したが、結果として師管液を得ることはできたものの、その師管を逆流させてアイソトープを流し込む実験技術の確立は困難であった。しかし、師管液を採取する技術やそもそもウンカを測定することで師管中のアイソトープ量の評価ができることから、今後活用できる装置が得られたものと考えている。

（研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果） 本研究で確立した技術が科学技術に貢献するには至っていない。一方で、アイソトープを利用することによる直接的アッセイ手法は未だ求められることが多く、多くの共同研究によりアイソトープイメージング技術がそれぞれの研究をサポートする事ができたと考えている。このさきがけ研究でのサポートにより、 $^{14}\text{CO}_2$ を含むアイソトープ標識化合物やイオンを用いる実験を適正に実行できる環境を整えることができたのは、多くのバイオサイエンス研究の下支えにつながったものと考えている。

（今後の見込み） 今回のさきがけ研究により手がけた挑戦はどれも道半ばであるが、それぞれ確立した後は植物体内の物質動態解析技術において世界でも例を見ないプラットフォームを築けるものと考えている。現在手がけているRI投与サンプルでのRNA-seq解析や数理モデルによる物質動態解析技術を完遂することを目指すとともに、新たなアイソトープ可視化技術の開発や異分野との連携を図っていききたい。岡田研究総括から、「田野井さんの場合はマッチングが重要だね」とコメントいただいたことが心に残っている。学術の発展にどのような協働により貢献ができるのか、常に考えていきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Sugita R, Kobayashi NI, Hirose A, Saito T, Iwata R, Tanoi K, Nakanishi TM. Visualization of Uptake of Mineral Elements and the Dynamics of Photosynthates in Arabidopsis by a Newly Developed Real-Time Radioisotope Imaging System (RRIS). *Plant Cell and Physiology*. 2016, 57(4):743–753.
2. Sugita R, Kobayashi NI, Hirose A, Iwata R, Suzuki H, Tanoi K, Nakanishi TM. Visualization of how light changes affect ion movement in rice plants using a real-time radioisotope imaging system. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2017, 312(3):717–723.
3. Kim J-M, To TK, Matsui A, Tanoi K, Kobayashi NI, 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 TA, Kuromori T, Ishida J, Morosawa T, Tanaka M, Torii C, Takebayashi Y, Sakakibara H, Ogihara Y, Saito K, Shinozaki K, Devoto A, Seki M. Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants. *Nature Plants* 2017, 3(7):17097.
4. Kobayashi NI, Yamaji N, Yamamoto H, Okubo K, Ueno H, Costa A, Tanoi K, Matsumura H, Fujii Kashino M, Horiuchi T, Nayef MA, Shabala S, An G, Ma JF, Horie T. OsHKT1;5 mediates Na⁺ exclusion in the vasculature to protect leaf blades and reproductive tissues from salt toxicity in rice. *Plant Journal*. 2017, 91(4):657–670.
5. Ogura T, Kobayashi NI, Suzuki H, Iwata R, Nakanishi TM, Tanoi K. Magnesium uptake characteristics in Arabidopsis revealed by ²⁸Mg tracer studies. *Planta*, 248(3):745–750.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Tanoi, K.; Sugita, R.; Hirose, A.; Kobayashi, N.I.; Nakanishi, T.M., “Tools for analysing a long transport system in plant using radiotracer.”, The 17th International Workshop on Plant Membrane Biology (IWPMB2016) (Maryland, USA) T1p-6 (2016, Jun. 5–10).
2. 田野井慶太郎, “放射性トレーサーを用いた植物における物質分布の可視化技術の開発”, 第 12 回トランスポーター研究会年会(JTRA12) (2017, Jul. 9). (招待講演)
3. 田野井慶太郎, 杉田亮平, 小林奈通子, “植物体内物質動態に関する表現型の定量評価基盤技術の構築” 第 60 回日本植物整理学会年会、名古屋大学、2019 年 3 月 13 日