

研究紹介

植物分子イメージングによる光合成機能の可視化

日本原子力研究開発機構 量子ビーム応用研究部門
 バイオ応用技術研究ユニット
 ポジトロンイメージング動態解析研究グループ
 河地有木

昨今の研究により光合成と光合成産物の輸送のメカニズムは分子レベルでの理解が日々進んでいます。しかしながら、地球環境の変化が植物個体の生産性に及ぼす影響といった農学的見地から発せられる問いに対して、分子レベルの知見が直接的に還元する例は多くは見られません。これを打破するため、分子メカニズムと個体の生理応答の中間レベルとして、ミリメートルオーダーの組織・器官レベルの生理機能の解明が有効だと考え、日本原子力研究開発機構（原子力機構）では放射性化合物をトレーサとして用い、植物体内の分子動態を可視化する、いわゆる植物分子イメージング研究を模索しています。中でもポジトロンイメージング技術（Positron Emitting Tracer Imaging System: PETIS）は、定量的かつ非侵襲的に生きた植物中での養分や環境汚染物質の動態を動画像として捉えることができ、養分などの輸送・分配・蓄積の仕組みや、環境変化やストレスに対する応答を明らかにする研究が進められています¹⁾。

ポジトロンイメージング技術とは加速器を用いた植物研究用ポジトロン放出核種トレーサの合成と、イメージング装置、それに付随する様々なトレーサ実験技術で構成されています。原子力機構の高崎量子応用研究所イオン照射研究施設（TIARA）では AVF サイクロトロン加速器を用いて（表 1）に示されるような、様々なポジトロン放射性核種をもとにした放射性核種化合物の合成を行っています。中でも ^{11}C や ^{13}N を用いた窒素栄養と炭素栄養²⁻⁴⁾、 $^{52}\text{Fe}^{3+}$ や $^{62}\text{Zn}^{2+}$ といった金属核種を用いた植物中ミネラル⁵⁻⁸⁾、 $^{107}\text{Cd}^{2+}$ を用いた環境汚染物質などの動態計測を目的とした農学・植物生理学の研究を実施するため、安全かつ迅速なイオン照射・分離・精製と植物への供与を可能としています。イメージング装置は医学分野で近年めざましい進歩を遂げ

表 1 原子力機構高崎量子応用研究所で製造される植物研究用ポジトロン RI トレーサ

nuclide	nuclear reaction	products
^{11}C	$^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$	CO_2 , methionine
^{13}N	$^{16}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$, $^{12}\text{C}(d,n)^{13}\text{N}$	NO_3^- , NH_4^+ , N_2
^{15}O	$^{15}\text{N}(p,n)^{15}\text{O}$	H_2O
^{18}F	$^{16}\text{O}(\alpha,pn)^{18}\text{F}$, $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$	F, FDG, proline
^{48}V	$^{45}\text{Sc}(\alpha,n)^{48}\text{V}$	H_2VO_4^-
^{52}Mn	$^{nat}\text{Cr}(p,xn)^{52}\text{Mn}$	Mn^{2+}
^{52}Fe	$^{nat}\text{Cr}(\alpha,xn)^{52}\text{Fe}$	Fe^{3+}
^{62}Zn	$^{nat}\text{Cu}(p,2n)^{62}\text{Zn}$	Zn^{2+}
^{105}Cd	$^{nat}\text{Ag}(p,3n)^{105}\text{Cd}$	Cd^{2+}
^{107}Cd	$^{nat}\text{Ag}(p,n)^{107}\text{Cd}$	Cd^{2+}

ているポジトロン断層法（Positron Emission Tomography: PET）と同じ検出技術を用いたプラナータイプ（二次元）のイメージング装置を用いています⁹⁾（図 1）。植物を測定対象とした場合、対象物が薄く平面であることが多いため、三次元画像取得が可能な PET よりも、植物の測定条件（温度・湿度・光量など）が適切に設定された環境で、トレーサ動態を感度良く撮像できることが重要になります。イメージング装置の有感領域はおおよそ縦 19 cm 横 12 cm で組織・器官レベルから 1 植物個体全体がその視野に入り、2 mm 程度の空間分解能を持ちます。比較的素早い動態を計測する場合は 10 秒おきの画像を撮像し、遅い動態を計測する場合は数日間連続して撮像を行う実験が可能です。この実験技術の最も重要なファクターは「植物実験」を念頭にデザインされている点です。測定環境条件の変動は大きく植物生理の変化を引き起こし、実験結果をミスリーディングしてしまいます。そのため、イメージング装置だけでなく RI 供与装置、RI カウンターなど、多角的な視点を持つための計測機器を大型

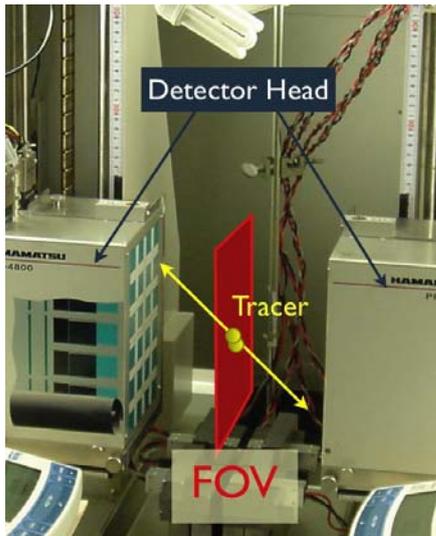


図1 PETIS プラナーイメージング装置。2 対の検出器で視野 (FOV) 内のトレーサ分布を可視化する。

の植物育成庫内に配し、計測による植物生理の変化を極力排除した実験系を構築しています。

このようにポジトロンイメージング技術を駆使することで、植物研究においても様々なトレーサが植物体内を移行分布していく、分子の様子を可視化する植物分子イメージングが可能となり、多様な研究において成果を上げ始めています。ただ、確かに静止および動画データは、植物が持つさまざまな生理機能を定性的に映し出してくれますが、植物研究者が真に必要とするデータは、可視化されたトレーサの体内分布ではなく、生体の生理機能の分布であるはずで、「トレーサ由来の放射線を計測する」という意味では高い定量性を持つ体内分布画像データには、生体内の分子メカニズムに起因する生理的あるいは生化学的な機能を定量

できる情報が内包されています。従って、トレーサ動態解析により植物生理機能の定量評価が可能になります。これは、生体内分子メカニズムを表現可能な数理モデルで記述し、撮像されたトレーサの動態を解析して植物生理機能を数値化する手法です。今回研究紹介させていただく内容も、光合成機能を定量評価するため、そのメカニズムをコンパートメントモデル法¹⁰⁾で記述して炭素動態を数理解析する手法を用いています。

私の研究では、植物個体の光合成を構成する機能のそれぞれをイメージングすることを目的としました。¹¹C で標識した二酸化炭素 (¹¹CO₂) で、光合成時の炭素動態を Positron Emitting Tracer Imaging System (PETIS)で撮像し、葉内での炭素動態をモデル解析し、光合成時の主要な生理機能である「二酸化炭素固定」および「光合成産物送り出し」の定量と機能画像の構築を試みました。光合成産物の動態は、食料生産など農学的見地からも重要なファクターであり、環境に応答する生理機能の数値化は植物生理学分野への展開が可能であると期待しています。

光合成は放射性炭素 (¹¹C など) をトレーサとして用いることで、その反応の過程をはじめ、合成産物の輸送、移行や分布が可視化できることが知られています。また、¹¹C は半減期が約 20 分と非常に短いため、同一個体を用いた繰り返し測定や異なる環境下での測定が可能です。この炭素動態を解析するために、各器官を箱で、トレーサ分子の移動を矢印でそれぞれ表す、コンパートメントモデル法で光合成を数理モデル化しました (図 2)。コンパートメント内の ¹¹C トレーサ濃

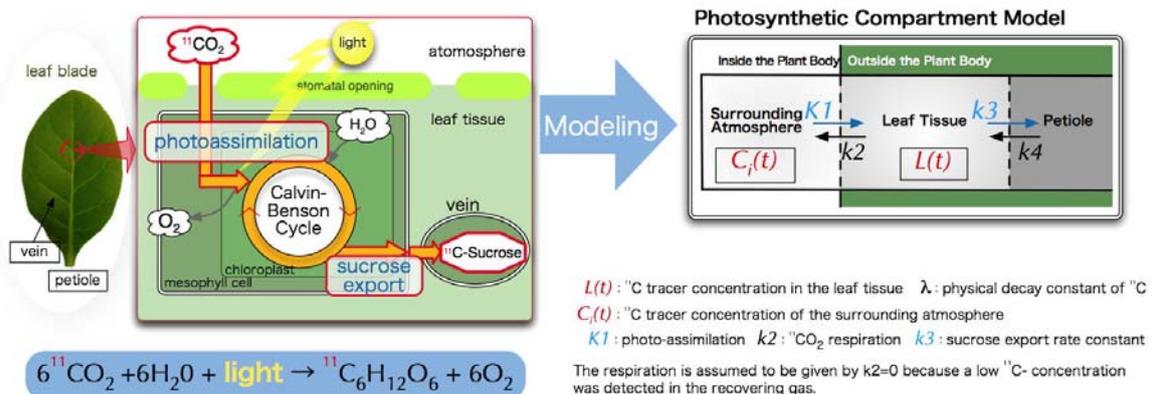


図2 光合成の過程 (左側) を炭素の動きに注目したコンパートメントモデルで簡略化し (右側)、これを微分方程式で表して解析解を得ます。

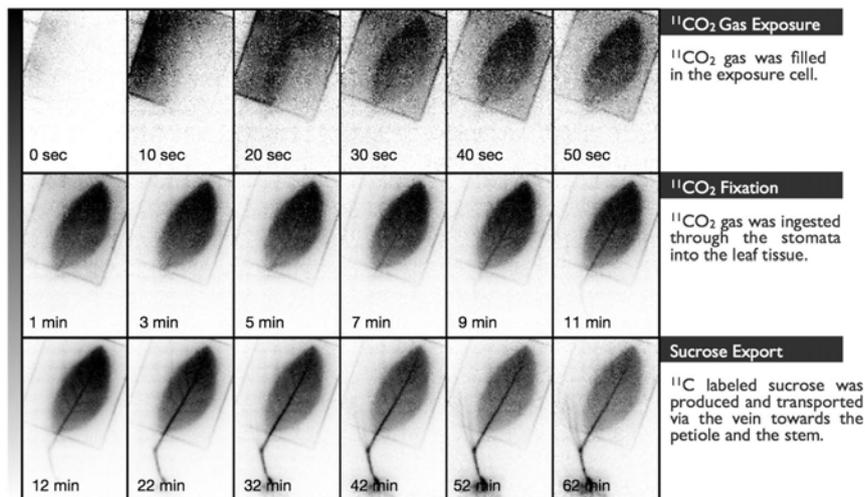


図3 葉における炭素動態の経時変化

度に対しては、次の時間微分方程式が成り立ち、

$$\frac{L(t)}{dt} = K_1 \cdot C_i(t) - (k_2 + k_3 + \lambda) \cdot L(t)$$

大気への $^{11}\text{CO}_2$ の最放出が検出されなかったため $k_2=0$ としてこの式を解き、次式に示される解析解が得られます。

$$L(t) = K_1 \cdot C_i(t) \otimes e^{-(k_3+\lambda) \cdot t}$$

この式は、葉における炭素の放射能濃度時間変化の実測値を基に、この解析解を用いた数値解析により、「二酸化炭素固定」および「光合成産物送り出し」の二つの植物生理機能の定量が可能となることを示しています。

ここで構築した光合成コンパートメントモデルの妥当性についての検証実験を PETIS で行いました。タバコの葉に約 10 MBq の $^{11}\text{CO}_2$ を吸収させ、1 時間撮像しています。この撮像で、葉を封入したセル内に進入した $^{11}\text{CO}_2$ が葉内に取り込まれ、光合成によって ^{11}C がラベルされたショ糖を合成、 ^{11}C -ショ糖が葉から植物体全体へと送り出される炭素動態を可視化しています(図3)。ここで得られた動画データの動態解析は、① 動画像に関心領域を取り、葉が吸収した炭素動態を示す放射能濃度時間変化を葉の応答関数データとして

抽出、② 葉に供給した $^{11}\text{CO}_2$ の入力関数データを抽出、③ 光合成コンパートメントモデルより導いた解析解に対して、二つの関数を非線形最小自乗法でフィッティング、④ 二酸化炭素固定速度および光合成産物送り出し率という二つの生理パラメータを算出、という手順で行いました。図4に見られるように、モデルが示す推定曲線と実測値は良く一致しており、モデルが妥当であることを示しています。つまり、 $^{11}\text{CO}_2$ と PETIS による非侵襲的かつ定量的な葉の光合成機能の評価法を構築し、従来困難であった光合成産物の送り出し率の数値化にも成功した、と言えます。また、さ

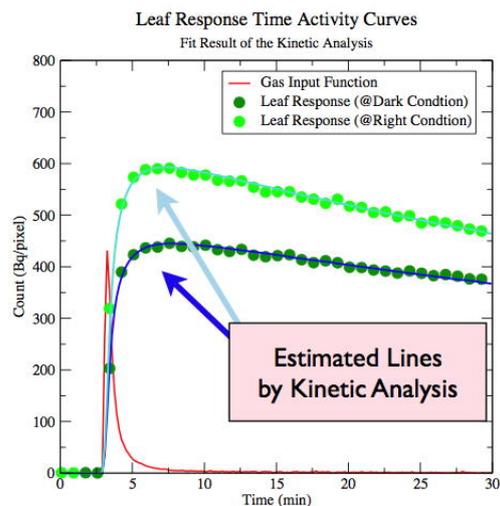


図4 コンパートメントモデル解析による推定。同一植物個体を用いた2回の計測値(強光●と弱行●)と推定曲線は良く一致しました。

らに解析法の改良を進めて炭素動態を画素毎に解析し (pixel-by-pixel analysis¹¹⁾)、光合成機能画像の作成、いわゆる光合成機能イメージング¹²⁾も可能となりました (図5)。これは画像上に非常に小さな関心領域を取り、その位置の植物生理機能を示す解析値で画像を再構成する方法です。これにより、二つの光合成機能の分布が可視化され、「葉上に一様に広がる炭素固定能」や「基部に比べ先端部に強い光合成産物送り出し能が分布している」ことなどが解ってきました。

定量性については、コンパートメントモデルの矢印に当たるファクターを率ではなく、測定中の環境因子をモデルに持ち込むことによって絶対定量、つまりモル数もしくは分子数レベルでの差異を明確に表現できることが示されます。これは、いわゆる分子イメージング¹³⁾であり、当研究グループの撮像法・解析法をもってすることで「生体内の分子メカニズムに起因する生理をイメージングする」、いわゆる植物分子イメージング研究が実現していること、が示されていると考えています。

今後はさらに測定の短時間化に取り組み、現在の3時間に一回しか供試植物の光合成機能を測定できない現状を改善する予定です。比較的短時間で応答する環境因子 (重金属ストレス、温度環境の変化、等) をパラメータとした植物分子イメージングを行い、光合成産物の輸送機能を解析する実験を計画しています。

私たちのグループでは、この計測技術の特長を活かした植物研究手法を開発し、個体レベルの植物中における様々な生理機能を定量的に解析・評価することに

より、食糧生産や環境保全に有用な植物機能を理解し、活用するための研究を進めています。この植物分子イメージングというアイデアを有効に活用し新たな光合成研究を展開していただける方、とにかく使ってみたい方、また今回紹介させていただいた内容へのご意見など、是非ご連絡いただければ幸いです。よろしくお願いたします。

参考文献

1. 大山卓爾、松橋信平 (2005) ポジトロンイメージングによる植物機能の可視化.放射線と産業, 108: 26-32.
2. Kawachi, N., Sakamoto, K., Ishii, S., Fujimaki, S., Suzui, N., Ishioka, N. S., and Matsushashi, S. (2006) Kinetic analysis of carbon-11-labeled carbon dioxide for studying photosynthesis in a leaf using positron emitting tracer imaging system, *IEEE Transact. Nucl. Sci.* 53, 2991-2997.
3. Matsushashi, S., Fujimaki, S., Kawachi, N., Sakamoto, K., Ishioka, N. S., and Kume, T. (2005) Quantitative Modeling of Photoassimilate Flow in an Intact Plant Using the Positron Emitting Tracer Imaging System (PETIS), *Soil Sci. Plant Nutr.* 51, 417-423.
4. Kiyomiya, S., Nakanishi, H., Uchida, H., Tsuji, A., Nishiyama, S., Futatsubashi, M., Tsukada, H., Ishioka, N. S., Watanabe, S., Ito, T., Mizuniwa, C., Osa, A., Matsushashi, S., Hashimoto, S., Sekine, and T., Mori, S. (2001) Real Time Visualization of ¹³N-Translocation in Rice under Different Environmental Condition

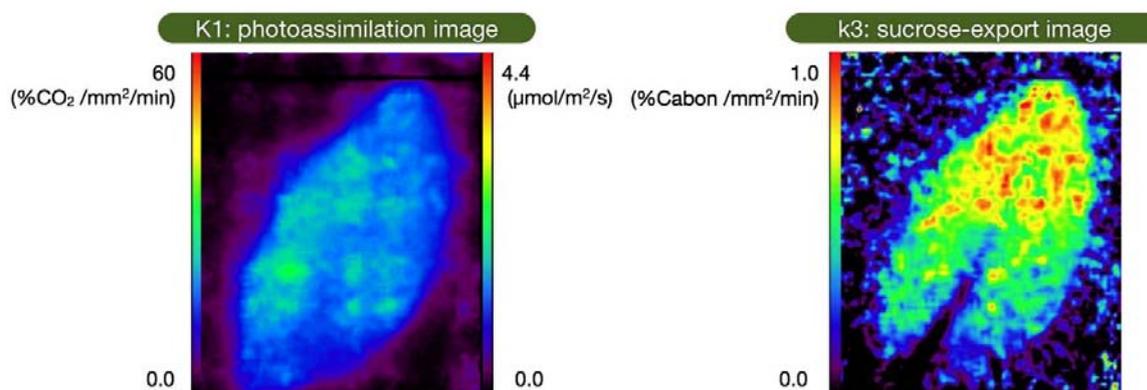


図5 光合成機能画像。(左)炭素固定速度分布と(右)ショ糖の送り出し強度の分布を示している。

- Using Positron Emitting Tracer Imaging System, *Plant Physiol.* 125, 1743-1754.
5. Ishimaru, Y., Kim, S., Tsukamoto, T., Oki, H., Kobayashi, T., Watanabe, S., Matsuhashi, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., and Nishizawa, N. K. (2007) Mutational reconstructed ferric chelate reductase confers enhanced tolerance in rice to iron deficiency in calcareous soil, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(18), 7373-7378.
 6. Tsukamoto, T., Nakanishi, H., Kiyomiya, S., Watanabe, S., Matsuhashi, S., Nishizawa, N. K., and Mori, S. (2006) ⁵²Mn translocation in barley monitored using a positron-emitting tracer imaging system, *Soil Science and Plant Nutrition* 52, 717-725.
 7. Suzuki, M., Takahashi, M., Tsukamoto, T., Watanabe, S., Matsuhashi, S., Yazaki, U., Kishimoto, N., Kikuchi, S., Nakanishi, H., Mori, S., and Nishizawa, N. K. (2006) Biosynthesis and secretion of mugineic acid family phytosiderophores in zinc-deficient barley, *The Plant Journal* 48, 85-97.
 8. Ishimaru, Y., Suzuki, M., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Nakazono, M., Kobayashi, T., Wada, Y., Watanabe, S., Matsuhashi, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., and Nishizawa, N. K. (2006) Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺, *The Plant Journal* 45, 335-346.
 9. Uchida, H., Okamoto, T., Ohmura, T., Shimizu, K., Satoh, N., Koike, T., and Yamashita, T. (2004) A compact planar positron imaging system, *Nucl. Instrum. Meth. A* 516, 564-574.
 10. Jacquez, J. A. (1965) *Compartmental Analysis in Biology and Medicine*, Elsevier/North Holland, Amsterdam.
 11. Watabe, H., Jino, H., Kawachi, N., Teramoto, N., Hayashi, T., Ohta, Y., and Iida, H. (2005) Parametric imaging of myocardial blood flow with ¹⁵O-water and PET using the basis function method, *J. Nucl. Med.* 46, 1219-24.
 12. Kawachi, N., Fujimaki, S., Ishii, S., Suzui, N., Ishioka, N. S., and Matsuhashi, S. (2006) A New Method for Parametric Imaging of Photosynthesis with C-11 Carbon Dioxide and Positron Emitting Tracer Imaging System (PETIS), *IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference Record* 3, 1519-1522.
 13. Herschman, H. R. (2003) Molecular Imaging, *Science* 302, 605-608.