

研究紹介

^{11}C を用いた光合成産物のイメージング[§]

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

鈴木 伸郎

1. はじめに

放射性同位元素 (RI) を用いたトレーサー実験は、生体内の様々な物質の代謝経路や局在位置を追跡する手法として古くから生命科学研究に用いられており、光合成の研究分野においては、カルビン・ベンソン回路の同定に β 崩壊核種である ^{14}C トレーサーが用いられたことはあまりにも有名である。RIトレーサーの検出法の一つであるオートラジオグラフィは、生体内のRIトレーサーの局在位置を視覚化する古典的な研究手法であるが、生体サンプルをX線フィルム (現在ではイメージングプレートに代替) に圧着させ、暗所で露光させるという「侵襲的」な放射線検出法であるため、特定の部位におけるトレーサー量の経時変化のデータを得ることは非常に困難である。一方、日本原子力研究開発機構 (原子力機構) では、ポジトロン放出 (β^+ 崩壊) 核種をRIトレーサーとして用い、positron-emitting tracer imaging system (PETIS) と呼ぶイメージングシステムを用いて、炭素^{1,2)}、窒素³⁾および金属元素^{4,5)}などの植物栄養の体内動態を「非侵襲的」に可視化する研究を行っている。本稿では、我々のグループが行っているPETISを用いたポジトロンイメージング研究のうち、炭素のポジトロン放出核種である ^{11}C を用いた光合成産物のイメージングに焦点を絞って、その概略と研究例を紹介したい。

2. ^{11}C を用いた光合成産物のイメージング

ポジトロンイメージングとは、 β^+ 崩壊により放出されるポジトロンの存在位置を非接触・非破壊で画像化することを指す。イメージングの原理は、1) ポ

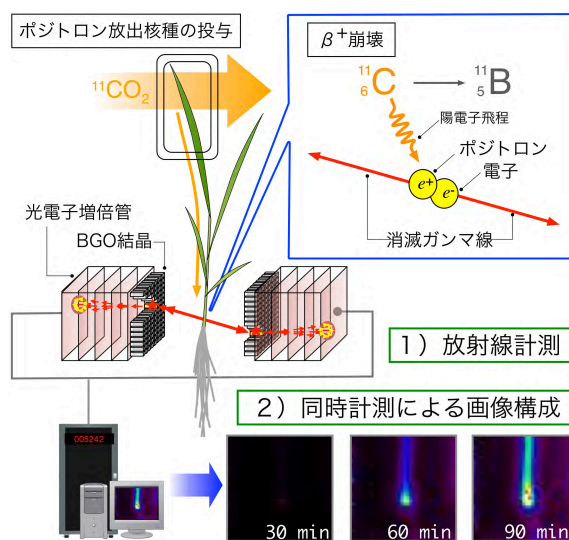


図1 ポジトロンイメージングの原理

検出器に入射したガンマ線はBGO結晶内でシンチレーション光を発生し、光電子増倍管により増幅され、計測される。一对の検出器で同時計測された放射線をポジトロン放出核種トレーサー由来の消滅ガンマ線とし、位置情報を処理することでトレーサーの分布図の画像を構成する。

ポジトロン放出核種に由来するポジトロン (陽電子) が電子と結合して消滅する際に 180° 反対方向に同時に発生する消滅ガンマ線を、対向配置した入射位置検出器で検出し (放射線計測)、2) それぞれの検出器上の入射地点を直線で結んだ中点がポジトロン放出核種の存在位置とし、この情報から画像を構築する (同時計測による画像構成)、という2つのステップに分けられる (図1)。現在我々が用いている平面型のポジトロンイメージング装置 (浜松ホトニクス製⁶⁾) は、有効視野が縦 19 cm × 横 12 cm、空間分解能が 2 mm 程度、時間分解能が 10 sec という性能

[§] 第9回日本光合成研究会シンポジウム ポスター賞受賞論文

* 連絡先 E-mail: suzui.nobuo@jaea.go.jp

表1 PETISで利用可能な植物研究用ポジロン放出核種標識トレーサー

Nuclide	Half life	Chemical forms for plant studies
^{11}C	20 min	$[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, $[^{11}\text{C}]\text{methionine}$
^{13}N	10 min	$[^{13}\text{N}]\text{NO}_3^-$, $[^{13}\text{N}]\text{NH}_4^+$, $[^{13}\text{N}]\text{N}_2$
^{15}O	2.0 min	$[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$
^{18}F	110 min	$[^{18}\text{F}]\text{F}^-$, $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, $[^{18}\text{F}]\text{proline}$
^{22}Na	950 day	$^{22}\text{Na}^+$
^{48}V	16 day	$[^{48}\text{V}]\text{H}_2\text{VO}_4^-$
^{52}Mn	5.6 day	$^{52}\text{Mn}^{2+}$
^{52}Fe	8.3 hour	$^{52}\text{Fe}^{2+}$, $^{52}\text{Fe}^{3+}$
^{62}Zn	9.2 hour	$^{62}\text{Zn}^{2+}$
^{64}Cu	12.7 hour	$^{64}\text{Cu}^{2+}$
^{107}Cd	6.5 hour	$^{107}\text{Cd}^{2+}$

を持つ。有効視野は資金次第でさらなる拡大が可能であるが、空間分解能については、RIからポジロンが放出される位置と電子に結合し消滅ガンマ線を発生する位置との間に数ミリオーダーの空間的なズレ（陽電子飛程）が存在するため、今以上の向上は原理的に不可能とされている。よってポジロンイメージングは、細胞レベルではなく、組織・器官レベルでの物質動態の可視化に適していると言える。

PETISとは、植物研究に特化したポジロンイメージング技術の総称であり、ポジロン放出核種標識トレーサーを製造する技術、トレーサーを生きた植物体に投与し、体内での動きを非侵襲的・定量的に画像化する技術、そして生物学的な知見を得るために動画データの数理的解析を行う技術の三つの柱から成る⁷⁾。現在のPETISでは十数種類のポジロン放出核種標識トレーサーが利用可能であり（表1）、現在も更なるトレーサーの開発を進めている。 ^{22}Na 以外のトレーサーは半減期が数分から数時間と非常に短いため、原子力機構・高崎量子応用研究所内のサイクロトロン加速器を用いて、自ら製造している。

二酸化炭素のポジロン放出核種標識トレーサーである $^{11}\text{CO}_2$ は、窒素ガスにプロトンビームを照射することで生じる原子核反応 ($^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$) を利用して製造する（図2）。微量の $^{11}\text{CO}_2$ を含む窒素ガスを照射室から精製室まで遠隔操作で輸送し、液体窒素で冷却して $^{11}\text{CO}_2$ のみを凝固させた後、イメージングを行う実験室まで人力で輸送する。1回のイメージング

に用いる $^{11}\text{CO}_2$ の放射エネルギーは 10~100 MBq (30~300 fmol に相当) であり、通常大気と混合し、流量が制御可能なサーキュレーションシステムとアクリル製セルを介して供試植物に投与する。 $^{11}\text{CO}_2$ が葉内に取り込まれ、光合成により同化され、 ^{11}C 標識の糖となって転流する過程を、ポジロンイメージング装置を用いて最短で10秒毎に撮像する。

^{11}C を用いた光合成産物のイメージングの利点の一つとして、同一個体を用いた繰り返し測定が可能である点が挙げられる。 ^{11}C は半減期が20.4分と短いため、 $^{11}\text{CO}_2$ を投与して約2時間の間イメージングを行った後、1時間程度のインターバルを置くことで、最初に投与した $^{11}\text{CO}_2$ 由来の放射線はほぼ無視して良い程度にまで減衰する。イメージング装置は温度・湿度・光強度が制御された人工気象器内に設置されているので、これらの外的環境の変化や、薬剤等の人為的な処理によって生じる炭素動態の応答を追跡することが可能である。

3. 動画データの数理的解析

以上の方法で得られる ^{11}C の動画は、言わば「連続したオートラジオグラム」であるが、これらのデータを数理的に解析することで、動画から植物の様々な生理パラメーターを抽出することが可能である。具体的には、動画内に関心領域 (region of interest; ROI)を設定し、ROI内の放射エネルギーの経時変化のグラフ (time-activity curve; TAC) を作成し（図3）、このTACを様々な数理モデルに当てはめ、生理

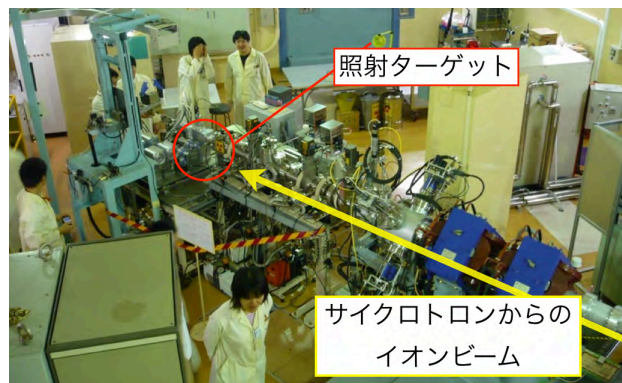


図2 RIを製造するイオンビーム照射室の様子

サイクロトロンで加速されたイオンビームは真空ラインを通してRI製造用の照射室（照射中は入室禁止）に輸送される。ビームラインの末端に照射ターゲットを設置し、原子核反応によりRIを製造する。

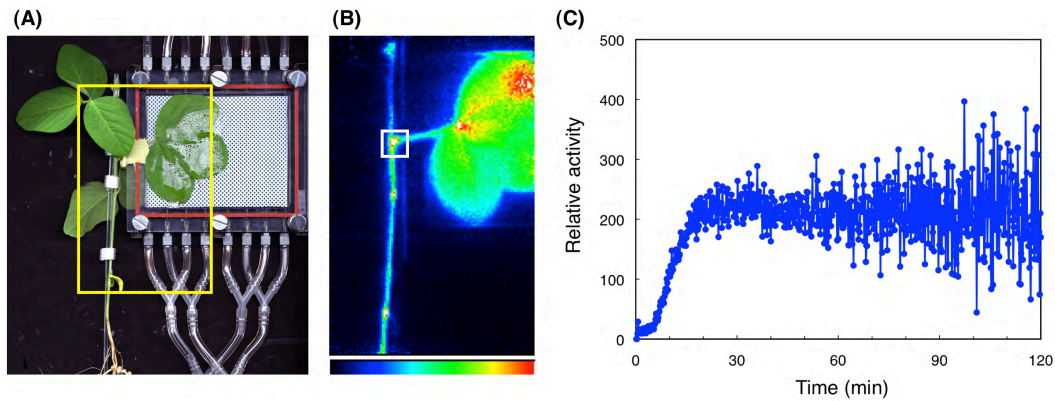


図3 PETISで得られるデータの解析例

(A) イメージングに用いた植物の写真。本例では播種後20日のダイズを用い、第1本葉に20 MBqの ^{11}C を投与した。黄色枠はPETISの視野を示す。(B) PETISで撮像した ^{11}C シグナルの分布画像。白枠は第1本葉の葉柄の節部分に設定した関心領域 (ROI)。(C) ROI内の放射エネルギーの経時変化のグラフ (TAC)。

パラメーターを算出している。以下、過去に我々のグループから報告した数理的解析の2例を紹介する。

光合成産物の輸送速度と分配割合

通常大気中濃度 (350 ppm) よりも高い濃度 (1000 ppm) の CO_2 を植物の葉に与えた際の光合成産物の輸送の変化を解析した。 ^{11}C トレーサーをソラマメの葉に投与し、葉から茎を介して根へと向かう ^{11}C 標識の光合成産物の動態をPETISにより撮像した。茎部分にROIを複数設定して作成したTACに対し、数理的モデリング法の一つである伝達関数解析法を適用することにより、茎を通る光合成産物の輸送速度の分布と茎の組織への分配の割合を定量的に算出した。その結果、高濃度条件下では通常条件下と比べ、茎中の輸送速度が一様に上昇し、根側に分配される割合 (茎全体で積み下ろされる炭素の量を100とした) の値が24%から34%へと増加することが明らかとなった⁸⁾。

二酸化炭素の固定速度と光合成産物の送り出し率

二酸化炭素の固定から光合成産物の送り出しまでの生理反応を、外界・葉・葉柄の3つの箱に分けたコンパートメント解析法によりモデル化し、「二酸化炭素固定速度」および「光合成産物送り出し率」の生理パラメーターを設定した。本モデルから ^{11}C トレーサー濃度を推定する数式を構築し、PETISによる実測値と比較することでモデルの妥当性を検証したところ、推定値と実測値が非常に良く一致した。このことから、上記の二つの生理パラメーターをPETIS

の動画データを用いて算出することが可能となった⁹⁾。

さらに最近では、数センチ角のオーダーであったROIの範囲を、PETISの画素1ピクセル (1.1 mm^2) にまで狭め、二酸化炭素の固定速度などの生理パラメーターの値をピクセル毎に算出し、画像化する試みを行っている。こうして得られる「Functional Image (機能画像)」により、従来の計測法では見えなかった植物の新たな生理現象を捉えることを期待している。

4. おわりに

現在のところ、 ^{11}C 標識の光合成産物のイメージングが実施可能である国内の施設は原子力機構のみであるが、海外では、ドイツ・Research Centre JülichにおけるPlanTIS (plant tomographic imaging system)¹⁰⁾ および米国・Duke UniversityにおけるVIPER (versatile imager for positron emitting radiotracers)¹¹⁾の2つのシステムにより ^{11}C 標識の光合成産物のイメージング研究が行われている。また、東京大学・中西友子教授の研究室において、植物研究用の非破壊的 β 線イメージング装置が開発され¹²⁾、 ^{14}C -アラニンのイメージングが行われている¹³⁾ことから、 ^{14}C 標識の光合成産物のイメージングにも期待が持てる。

近年、生命科学において「脱アイソトープ」の流れがあり、RIの利用自体が敬遠されがちである。一方で、本稿で紹介したポジトロンイメージングを含むRIイメージングは、GFPに代表される蛍光イメージングと共に、分子イメージング研究のツールとして医学薬学分野で盛んに用いられている¹⁴⁾。我々は、生体

内の物質動態を「非侵襲的、高感度、高定量的」に検出可能なRIの利点を最大限に活かし、植物科学における新たな発見ができればと考えている。サイクロトロンを用いてRIを製造するという都合上、イメージング実験の回数が非常に限られている状況ではあるが、皆様の貴重なご助言・ご協力を賜りながら、植物における分子イメージング研究を推進していきたい。

Received November 11, 2009, Accepted November 16, 2009, Published December 31, 2009

参考文献

1. Kikuchi, K., Ishii, S., Fujimaki, S., Suzui, N., Matsuhashi, S., Honda, I., Shishido, Y., and Kawachi, N. (2008) Real-time Analysis of Photoassimilate Translocation in Intact Eggplant Fruit using ^{11}C and a Positron-emitting Tracer Imaging System, *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 77, 199-205.
2. Suwa, R., Fujimaki, S., Suzui, N., Kawachi, N., Ishii, S., Sakamoto, K., Nguyen, N.T., Saneoka, H., Mohapatra, P.K., Moghaieb, R.E., Matsuhashi, S., and Fujita, K. (2008) Use of positron-emitting tracer imaging system for measuring the effect of salinity on temporal and spatial distribution of ^{11}C tracer and coupling between source and sink organs, *Plant Sci.* 175, 210-216.
3. Ishii, S., Suzui, N., Ito, S., Ishioka, N.S., Kawachi, N., Ohtaka, N., Ohyama, T., and Fujimaki, S. (2009) Real-time imaging of nitrogen fixation in an intact soybean plant with nodules using ^{13}N -labeled nitrogen gas, *Soil Sci. Plant Nutr.* 55, 660-666.
4. Tsukamoto, T., Nakanishi, H., Kiyomiya, S., Watanabe, S., Matsuhashi, S., Nishizawa, N.K., and Mori, S. (2006) ^{52}Mn translocation in barley monitored using a positron-emitting tracer imaging system, *Soil Sci. Plant Nutr.* 52, 717-725.
5. Tsukamoto, T., Nakanishi, H., Uchida, H., Watanabe, S., Matsuhashi, S., Mori, S., and Nishizawa, N.K. (2009) ^{52}Fe translocation in barley as monitored by a positron-emitting tracer imaging system (PETIS): evidence for the direct translocation of Fe from roots to young leaves via phloem, *Plant Cell Physiol.* 50, 48-57.
6. Uchida, H., Okamoto, T., Ohmura, T., Shimizu, K., Satoh, N., Koike, T., and Yamashita, T. (2004) A compact planar positron imaging system, *Nuclear Inst. and Methods in Physics Research, A* 516, 564-574.
7. Fujimaki, S. (2007) The Positron Emitting Tracer Imaging System (PETIS), a Most-advanced Imaging Tool for Plant Physiology, *ITE Lett. Batter. New Technol. Med.* 8, 403-413.
8. Matsuhashi, S., Fujimaki, S., Kawachi, N., S.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.
9. Kawachi, N., Sakamoto, K., Ishii, S., Fujimaki, S., Suzui, N., Ishioka, N.S., and Matsuhashi, S. (2006) Kinetic Analysis of Carbon-11-Labeled Carbon Dioxide for Studying Photosynthesis in a Leaf Using Positron Emitting Tracer Imaging System, *IEEE Trans. Nucl. Sci.* 53, 2991-2997.
10. Jahnke, S., Menzel, M.I., van Dusschoten, D., Roeb, G.W., Buhler, J., Minwuyet, S., Blumler, P., Temperton, V.M., Hombach, T., Streun, M., Beer, S., Khodaverdi, M., Ziemons, K., Coenen, H.H., and Schurr, U. (2009) Combined MRI-PET dissects dynamic changes in plant structures and functions, *Plant J.* 59, 634-644.
11. Kiser, M.R., Reid, C.D., Crowell, A.S., Phillips, R.P., and Howell, C.R. (2008) Exploring the transport of plant metabolites using positron emitting radiotracers, *HFSP J.* 2, 189-204.
12. Rai, H., Kanno, S., Hayashi, Y., Ohya, T., Nihei, N., and M. Nakanishi, T. (2008) Development of a Real-time Autoradiography System to Analyze the Movement of the Compounds Labeled with β -ray Emitting Nuclide in a Living Plant, *Radioisotopes* 57, 287-294.
13. Nihei, N., Masuda, S., Rai, H., and M. Nakanishi, T. (2008) Imaging Analysis of Direct Alanine Uptake by Rice Seedlings, *Radioisotopes* 57, 361-366.
14. 佐治英郎 (2008) 分子イメージングの概念と国内外における研究体制, 遺伝子医学MOOK 9, 37-40.

Non-invasive Imaging of Photoassimilate Flow using Carbon-11

Nobuo Suzui*

Quantum Beam Science Directorate, Japan Atomic Energy Agency