

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	アイソトープイメージング技術基盤による作物の油脂生産システム向上に向けての基礎研究
研究機関・部局・職名	東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
氏名	中西 友子

【研究目的】

地球環境問題やエネルギーの安定供給に資するためバイオマス資源、特にクリーンエネルギー源として期待される植物資源の生産性向上が農業現場で大きな課題となってきた。そこで我が国の風土に馴染んできたナタネを例にとると、世界のナタネ生産は生育環境の改良、つまり施肥法や作物管理法の向上で増加してきたことが示されている。そして、これからの新しい農業を考え、今まで以上の生産性を実現する上では、農業現場における科学、すなわち、どのように作物を育てていくことがどう油脂生産向上につながるかという情報が重要になると考えられるが、実際にはそのような科学的知見は非常に少ない状態にある。そこで、本研究では施肥法の最適化によって油脂生産の向上を図る手法を検討することを目的とした。具体的には、まず、シロイヌナズナを用いて、種子中の油脂生産と各元素動態との関係を調べることにした。そのためには私たちが独自に開発してきているアイソトープを用いたリアルタイムイメージング装置を用い、定量的な画像解析を基盤として各々の養分元素の吸収・移行動態を調べる。具体的な項目としては、(1) 各養分元素ごとの定量的な利用効率の算出と、作物体内、土壌内での各養分元素動態の可視化および定量的解析。(2) ^{14}C 標識ガスが葉ならびにサヤのどこからどのように光合成によって固定されていくかを調べるためのイメージング装置の改良。(3) ^{14}C の化学形を分析し、固定された炭素がどのような代謝産物を経て種子中の油脂へと変化し蓄積されるかの解析。を挙げた。また、本研究の大きな特徴としては、まず、放射線計測を基盤とするため光照射条件下でも測定可能、かつ定量的な RI イメージング技術を世界に先駆けて構築すること、ならびに炭酸ガス固定の可視化とそれに続く代謝分析系を確立することを掲げた。

【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
	優れた成果が得られている
○	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】

① 総合所見

本研究課題は、植物の栄養状態と油脂生産との関係を明らかにすべく、以下の3つの項目が達成目標として計画されていた。①養分元素についての定量的な利用効率ならびに作物体内、土壌内での動態を可視化、定量的解析を行う。② ^{14}C を用いて、葉ならびに鞘のどこからどのように呼応合成によって固定されていくかを調べるために、イメージング装置を改良する。③イメージングされた ^{14}C の化学形を分析し、代謝経路と輸送経路を解析して、どのような代謝産物を経て種子中の油脂へと変化し蓄積されるかを化学的分析により解析する。また、申請時点において、P, Ca, S, Cd, Feについてもイメージングできるめどが立っていることが述べられている。

イメージング装置の改良と放射性元素の動態の可視化については、シロイヌナズナの光合成による ^{14}C の吸収・移行の可視化に成功するとともに、光学画像（蛍光画像）とRI分布画像を同時に取得する技術が確立されるなど順調に進展し、優れた成果を上げた。さらに、本来の植物中における動態解析に加え、福島原子力発電所での事故により環境中に放出されたセシウム等の動態調査にも応用され、社会的貢献も認められる。

一方、本研究課題では、課題担当者が、「定量的な解析が行えるからこそ油脂生産との関係を求めることができる」、と述べているように、油脂生産と関連づけるために、イメージングされた ^{14}C 化合物を動的、定性的、定量的に分析することが重要な意味を持っている。

油脂生産システム向上への応用を目指す基礎技術開発という点からすると、栄養素の吸収移動とともに、同化産物の植物体内動態、すなわち代謝産物の定性的、定量的分析も不可欠である。研究期間前半においては、イメージング技術の改良が順調に展開されたのに対し、植物の油脂生産と養分元素吸収との解析は著しい遅れが認められていたが、最終年度に精力的に取り組み、成果が集積されつつあるものの、今後の検証を待つ必要がある。ここで重要となる同化産物の植物体内動態、代謝産物の定性的、定量的分析はその手法の確立とともに、今後の課題として残されている。

本課題の評価は、イメージング技術の開発という点では、特に優れていると言える成果が上がっていると認められる一方、油脂生産システムの向上に向けた成果という側面では、依然として大幅に遅れており、一定の成果が得られたという評価にならざるを得ない。

② 目的の達成状況

・所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

本プロジェクトでは、農業現場での技術向上を図るため、植物の養分吸収活動を調べることを基にどのように作物の油脂生産収量を向上できるかについて調べてきた。また、本研究を展開するに当たっては、 β 線や γ 線を放出するアイソトープを用いるリアルタイムイメージング技術の開発が必須であると考え、植物の養分吸収や光合成と密接に関係する元素のアイソトープを用いるイメージング技術の開発にも力を注いだ。

まず、その生育と収量について調べるため、シロイヌナズナを用いて、養分変化に

よる、分枝・莢数・種子数・種子中の油脂含量変化と養分吸収量などの変化を徹底的に調べた。養分元素吸収量は莢数とは必ずしも連動せず、播種後 40 日から複数の養分吸収量が減少に転じた。当初は油脂収量に大きな影響を与える要素は種子の数の増加と質であると考えていたが、まず着莢数が重要な要素であり、それは分枝を増やすことが鍵であることが示された。そして個体あたりの種子収量を増やすためには分枝数を増やすことが重要であることが判った。養分元素濃度によって茎の単位長さあたりの莢数が大きく異なり、養分元素の投与法次第で種子収量を保ったまま背丈を低くできる可能性も示された。つまり背丈が低い方が環境の変化に強く、丈夫な作物として育成ができることになる。

油脂を含めて植物体の主要成分は炭素 (C) であることから、当初適切な施肥は光合成活性の促進から C の体内配分促進に至る成長プロセスに正の連鎖反応を起こし、質・量の両面から油脂収量を増大させると考え、それに応じて養分元素の吸収量も変動すると予想していた。しかし実験結果から判ったことは、収量に直結する「分枝の発生」や「分枝上の莢の形成」という要素が顕在する時期において、各養分元素の吸収量は異なるものの、その吸収分布様式には特徴的な変化は検出されず、さらに、莢の形成が決定すると、その莢の中で成長する種子の質は意外なほど維持されることも判った。これは光合成産物や各栄養元素の種子への輸送量を栽培時の養分条件によらず一定に保とうとする機構が存在することを強く示唆するものであった。

従って、生育段階ごとにどの器官が成長中であるのか、吸収された養分元素がどの器官に分配されるのか、という視点に立って収量と養分元素の関係を解析することこそが植物の生長戦略を解く鍵であり、施肥の効果の理解のために必要な基礎データであると考えられた。生育プロセスごとに必要な養分元素量が異なることは、各養分元素を適時に投与することで収量増加に繋がる生育様式が実現される可能性が示されたことになる。このことは、油脂の生産量とは、単なる養分との関係という従来の捉え方ではなく、現場の作物生育状況に合わせた養分元素供給についての新しい科学的知見の方向性を提供することになった。

植物の生育における養分元素ならびに二酸化炭素の吸収動態の可視化については、 β 線や γ 線を放出するアイソトープを用いるリアルタイムイメージング技術が国の内外を通して初めて構築され、多種類のラジオアイソトープの定量的イメージングが可能になった。さらに組織ごとの定量性や定量性に向けてのシミュレーションも行った。また撮影中に試料が生育していくことから写真撮影と放射線像の重ね合わせ法、間欠照明法による試料撮影などシステムの改良も行った。 ^{14}C 標識炭酸ガスの固定の可視化も可能となり、様々な器官から吸収させた標識炭酸ガスをトレースすることにより、シンク・ソース組織の関係が解析できる見通しが立ってきたところである。これらの結果から油脂生産の向上を図るためには、まず植物の生育様式をきちんと見極めて、その特徴的な生育段階時に施肥量を変化させることが鍵となることを初めて見出すことができた。そこでその結果をダイズの生育に応用して検討したところ、種子収量が飛躍的に増加したので、現在特許申請を準備している最中である。

本研究課題では、研究代表者が、「定量的な解析が行えるからこそ油脂生産との関係を求めることができる」、と述べているように、油脂生産と関連づけるために、イメージングされた ^{14}C 化合物を動的、定性的、定量的に分析することが重要な意味を持っている。イメージングによって動的解析は可能になっているが、どの部位で、い

かなる化合物がどれだけの量が生産されているか、という質的面での解析が十分に進められたとは言い難い。

本研究課題の最終的な目標は養分元素の動態と分布から油脂生産の効率化を向上させる手法を提供することにある。その観点からすると、シロイヌナズナで得られた結果の施肥情報を大豆に応用し、種子重量の増加を認めたこと、この件について特許申請を準備中であることは成果として評価できる。

研究全体としては、計画した3つの項目のうち、イメージング技術の開発にかかわる2つの項目については、十分に目標を達成しているものの、3番目の「イメージングされた¹⁴Cの化学形を分析し、代謝経路と輸送経路を解析して、どのような代謝産物を経て種子中の油脂へと変化し蓄積されるかを化学的分析により解析する。」については、ほとんど進展が認められない。

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

本研究ではシロイヌナズナを用いて、まずその生育と油脂収量の関係を把握するため、水耕液中の養分を変化させ、分枝数・莢数・種子数・種子中の油脂含量変化、および養分吸収量などの変化を徹底的に調べた。その結果、以下に記述するような各生育プロセスの数値化から油脂生産向上に対する養分変化の影響が初めて明らかになった。

① 種子の数と質

油脂収量の構成要素を数的要素と質的要素とに大別し、それぞれに対するN、P、K投与量の影響を詳細に検討した。数的要素としては、莢中種子数と植物個体あたりの莢数を計測した。質的要素としては、種子の1粒重量と油脂含有率、およびタンパク質含有率(CN含有率)を測定した。これにより、油脂収量の決定に重要な油脂生産過程を洗い出し、油脂生産向上につながる基礎的データを整えることを目指した。

その結果、まず、個体あたりの油脂収量は個体あたりの着莢数によってほぼ置き換えられることが判った。さらに、N、P、Kのなかで施肥量の増減に対する莢数の変化が最も大きかったのはNO₃⁻濃度調整時であり、濃度を10倍に上げると莢数は25%減少、濃度を1/10に下げると莢数は50%減少した。このことは莢の形成に対するN量の根本的な重要性を明示するものである。一方、質的要素のうち、1粒重量の施肥条件に応じた変化は小さく、個体あたりの油脂収量が1/4になる場合(NO₃⁻濃度を0.01倍にした場合)においても、1粒重量は2割程度の減少にとどまった。油脂含有率にも水耕液濃度の違いは影響せず、いずれの条件で得られた種子でも油脂含有率は約40%という結果であった。既往の研究では、種子1粒の性質に差が生じるほど栽培条件を広く取ったものは少ない。本プロジェクトの中で捉えられた、1粒重量やN含有率など、種子の質にも養分元素の施肥量の違いに応じて多少なりとも差異が生じるという事実は、養分元素の重要性や機能性を

理解する上で、極めて有用な情報である。

② 着莢数

個体あたりの油脂収量は個体あたりの着莢数によってほぼ置き換えられることが判ったので、莢の形成について詳細な検討をおこなった。

②-1 背丈と着莢数

まず背丈と主茎の着莢数について調べたところ、養分元素濃度によって茎の単位長さあたりの莢数が大きく異なることが判った。つまり茎を伸長させながら開花・着莢が繰り返されるが、花の形成速度に対して茎の伸長が少なくなることが示された。近年、シロイヌナズナの茎の伸長を司る分子メカニズムも明らかになりつつあるが、本実験結果は、栄養元素の投与方法次第で種子収量を保ったまま背丈を低くできる可能性もあるということを示していると言えよう。

②-2 着莢数の主茎/分枝比

莢には主茎と分枝に由来するものがある。1本目の主茎由来の莢数は50-60個の範囲であったが、主茎から発生した分枝に由来する莢の数は施肥条件によって大きく変化した。特に、2次分枝の着莢数は、10-140個の範囲で変化し、これが、個体あたりの種子収量に決定的な影響を与えた。つまり、種子収量を増加させるためには、まず着莢数が重要な要素であり、それは分枝の発達を促すような栽培を検討することが鍵であることが示された。この点、N、Pの濃度を適性に保つことが主茎から発生する分枝数の増加、ひいては莢数増加に直結すること、そして、分枝数の変化は播種後34日目に見られることが確認された。一方、K濃度の変化が分枝数に与える影響は少なく、むしろ分枝あたりの着莢数が変化することが判り、また、K濃度条件の違いによって個体あたりの着莢数に違いが見られ始めるのは播種後40日目よりも後であった。この結果は、生育プロセスごとに必要な養分元素量が異なっていること、そして、それぞれの養分元素を適時に投与することで、収量増加につながる生育様式が実現される可能性を示している。

③ 栄養元素吸収量

油脂を含めて植物体の主要成分は炭素（C）であることから、当初適切な施肥は光合成活性の促進からCの体内配分促進に至る成長プロセスに正の連鎖反応を起こし、質・量の両面から油脂収量を増大させると考え、それに応じて養分元素の吸収量も変動すると予想していた。しかし養分吸収量の測定結果は、植物個体の大きさや収量（莢数）と栄養元素吸収量は必ずしも連動しないことを示していた。具体的には、播種後40日頃を境に、莢数は増加傾向を保ちつつもCaとKの吸収量は減少に転じること、Pの吸収量については、播種後40日目頃にはマイナスの値、つまり、吸収量よりも根からの排出量が多くなる結果となった。

これらの結果は、今まで単に養分吸収の増加と転流が油脂生産増大に直結すると考えてきたことが、植物の持つ生長のメカニズム、あるいは環境応答機構とは少し異なることを意味した。植物はさまざまな元素や濃度条件下においても均質な種子を作ることができるよう、栄養条件に応じて種子数を戦略的に減少させたり、莢形成のタイミングを調整している可能性がある。例えば、N濃度を変化させた場合は、生育期間中に一旦莢の生産が停止し、数日後にはまた再度莢が作られはじめた。このことから、植物体は莢の生産を止めている間は、根から吸収し

た養分を葉などのソース器官に蓄積し、一定量の養分が蓄えられた後に再度生長し始める、という可能性も想定される。したがって、生育段階ごとに、どの器官が成長中であるのか、吸収された養分元素がどの器官に分配されるのか、という視点に立って、収量と養分元素の関係を解析することこそが、植物の生長戦略を解く鍵であり、施肥の効果の理解のために必要な基礎データであると考えられる。

④ 養分元素のリアルタイムイメージング

④-1 イメージングシステムの開発と改良


養分元素のリアルタイム吸収動態と蓄積を可視化解析するためラジオアイソトープイメージングシステムの開発を行った。マクロイメージングシステムでは、 ^{14}C 、 ^{22}Na 、 ^{28}Mg 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^{42}K 、 ^{45}Ca 、 ^{54}Mn 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs の吸収動態の可視化を検討し、組織ごとの定量性や定量性に向けてのシミュレーションも行った。また撮影中に試料が生育してそのサイズが大きくなっていくことから写真撮影と放射線像の重ね合わせ法、間欠照明法による試料撮影などシステムの改良も行った。

特に ^{28}Mg については半減期が21時間と短いため、定期的に放射線医学総合研究所の加速器を用いたトレーサーの調製を行った。具体的には、アルミニウム箔にヘリウムを照射した後、ターゲット中にトレース量生成する ^{28}Mg を放射化学的に分離して用いた。 ^{28}Mg をトレーサーとして植物試料に使用した例はまだ報告されておらず、植物の吸収動態について詳細に解析することができた。また ^{42}K も半減期が12時間であることから殆ど入手できない核種であるが、 ^{42}Ar ジェネレータを整備し、定期的に ^{42}K をミルクキング法により取得できるようになった。

また、イメージングシステム (RRIS) は、下図に示したように第1世代から第3世代へとシステムの向上が図られた。

マクロイメージング装置の進化

第1世代RRIS



遮光と照明を両立できず、暗条件のため、植物の生育ができず、短時間の実験しかできなかった。

第2世代RRIS



暗箱の中に植物育成用のチャンパーを設置し、チャンパー内のみを照明することにより植物の育成に照明できるようになった。ただし、遮光に50 μm厚のアルミ板をつかっているため、透過性の高い放射線を出す同位体 (^{32}P ・ ^{109}Cd ・ ^{137}Cs など)しか検出できなかった。


第3世代RRIS

照明On / カメラOff




植物育成用LED

照明Off / カメラOn

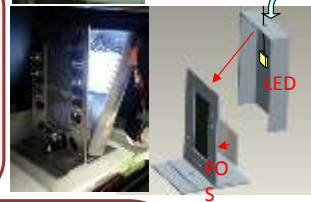


可視光


コンピュータ制御により、高感度カメラの撮影中は照明Off、撮影していない時はOnに自動制御。遮光板が不要なため、弱い放射線しか出さない放射性同位体 (^{14}C ・ ^{35}S ・ ^{45}Ca など)も検出できるようになった。



湿度制御
温度制御



AED
FO
S



Test plant
or
Hydroculture + radioisotope
 $^{14}\text{CO}_2$ gas

④—2 養分元素の植物体内動態

イメージングシステムを用いて、様々な元素が吸収された後にどの器官へ分配されるのかを調べた。その結果、元素の分配には、おおまかに3つの様式があることが示された。P（リン酸）は、S（硫酸）やK、Naと同じく植物体全体に広く分布する元素の一つだった。根からのP吸収量よりも排出量が多い時期（播種後43日目）と、吸収量のほうが多い時期（播種後35日目）のPの吸収動態を比較したところ、いずれの時期においてもPは特に生長中の花組織や若い分枝と、成熟した茎に多く分配されていた。さらに、この分配様式は主茎においても分枝においても同じように見られた。このことは、Pの吸収はPの分配とは連動していないこと、また、Pの分配には強いホメオスタシスが働いていることを示すものである。つまり、植物生長と栄養元素の関係を知るためには、やはり養分元素の植物体内での分配を個々に調べる必要があり、本研究によってその手法が確立されたと言える。

⑤ ¹⁴C 標識炭酸ガス固定のイメージング

¹⁴C 標識炭酸ガス固定の可視化も可能となり、様々な器官から吸収させた標識炭酸ガスをトレースすることにより、シンク・ソース組織の関係が解析できる見通しが立ってきたところである。また種子への光合成産物の移動の可視化ができるよう、シンチレータとしてアントラセンを種子に塗布する手法の開発も目途が立った。

これらの結果から油脂生産の向上を図るためには、まず植物の生育様式をきちんと見極めて、その特徴的な生育段階時に施肥量を変化させることが鍵となることを初めて見出すことができた。プロジェクト終了後、その結果をダイズの生育に応用して検討したところ、種子収量が飛躍的に増加することが認められた。本件については、現在特許申請を準備している最中である。

先進性・優位性

従来、植物の根からの栄養成分の吸収、体内移動、蓄積の挙動（動的な応答）を把握するのは困難であったが、開発されたRI イメージング装置は、いろいろな元素のアイソトープを用いて、植物を非破壊で、栄養イオンの挙動を画像処理技術で可視化しているので、解析が大幅に進むと思われる。これらの技術には先進性・優位性がある。

ブレイクスルーと呼べる成果については、本装置を利用して植物の生理、代謝、生産等の解析が進めば、ブレイクスルーと呼べる何らかの新しい知見が得られる可能性がある。今後、さらにデータを積み重ねて、検証を進めることにより、真にブレイクスルーと呼ぶにふさわしい結果に到達することを期待したい。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が
(■見込まれる ・ □見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が
(■見込まれる ・ □見込まれない)

本研究課題における大きな成果として、以下の3点があげられる。①多くのRI核種でシロイヌナズナの吸収・移行動態をリアルタイムに可視化することに成功している、また、②弱いβ線放射核種である¹⁴C等の定量手法の確立し、さらに、③マイクロRRISのスーパーインポーズ技術により微小元素の動態を明示する技術を開発している。これらの技術開発は研究事例がなく新規性が高いこと、農学、薬学、医学分野へと応用範囲も広く、関連分野への波及効果が期待される。

すでに、リアルタイム養分吸収のイメージングシステムについては、樹木も含め、他の植物での養分吸収や植物ホルモンの動態を調べるための共同研究が多く提案されてきており、それらは本プロジェクト終了後から共同研究として進められ始めており、今後さらに波及していくことが期待される。

また、食品への化学物質の浸透や残留農薬の挙動等についても、本イメージング技術を有用な手段として用いることが可能であり、既に具体的な計画が進行中である。

また、本プロジェクトが始まって間もなく、東日本大震災に伴う福島第一原子力発電所の事故が起こったが、農地や森林等地表に拡散した放射性セシウムの動態解析について、本研究のイメージング解析技術が大きく寄与しており、社会的課題の解決に向けた強力なツールの一つとなっている。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが（行われた ・ 行われなかった）

研究計画書に記載の計画に対し、「イメージングされた¹⁴Cの化学形を分析し、代謝経路と輸送経路を解析して、どのような代謝産物を経て種子中の油脂へと変化し蓄積されるかを化学的分析により解析する。」については、ほとんど進展が認められないこと等、不十分な点もあるが、イメージング技術の開発と施肥と種子収量の解析などについては、精力的に展開しており、研究マネジメントはおおむね適切に行われたと判断できる。

助成金の活用も、研究内容の一部変更に対応して、適切に行われている。

成果の公表については、下記の通り、おおむね適切に行われている。

雑誌論文：合計10件（全て査読有り）

会議発表：合計37件（専門家向け：20件、一般向け：17件）

知的財産権の出願・取得：0件（特許出願準備中。秋までに出願する。）

新聞・一般雑誌等の掲載：8件

国民との科学・技術の取り組み件数：合計17件

当初の植物材料選択における問題などの影響もあると考えられるが、雑誌論文数がやや少なめであるが、成果の公表、情報発信は、ホームページや所属機関の支援など、いろいろな機会を通じて積極的に取り組んでいる。