

研究終了報告書

「炭素栄養の転流の自由自在な制御に向けた研究」

研究期間：2020年12月～2023年3月

研究者：三好 悠太

1. 研究のねらい

本研究のねらいは、植物体内の光合成産物の輸送(転流)をリアルタイムに追跡できるポジトロンイメージング技術(positron emitting tracer imaging system: PETIS)を駆使して、栽培環境等の変化によって転流が変化する組織や器官、およびそのタイミングを特定し、そこで発現し機能する遺伝子群を明らかにすることである。これによって、植物体内における炭素栄養の輸送(転流)を自由自在に制御し可食部へ集中させ、作物生産に投入したエネルギーの回収効率を極限まで高める究極的な栽培技術の確立に繋がる知見を取得する。

近年、世界的な人口増大と地球環境の悪化が進行する中、生活の質の向上が求められている。食に対する要求も大きな変革期を迎えており、収量・品質の持続的かつ大幅な向上を目的とした作物生産の実現が求められている。これを実現するため、高度な栽培技術開発の取り組みが行われている。作物の可食部に炭素栄養を効率的に蓄えることによって投入エネルギーの回収効率を向上させることは、栽培技術を模索する上での重要な指針であり、例えば光合成促進や植物のストレス低減策等を行う栽培管理によって高収量を目指す方法が普及してきた。その中で研究代表者は、光合成促進によって同化された炭素栄養の大部分は葉に蓄えられたままであり、こうした栽培管理法には“エネルギーロス”が生じていることを見出した。つまり、同化した炭素栄養を可食部に集中的に転流させることができれば、投入エネルギーの回収効率を極限まで高めた作物生産を実現できるとの着想を得た。このためには、栽培環境を整えることに加え、植物が本来持つ生長バランスを根本から覆すような処理が必要であり、転流を支配する遺伝子の発現やその機能制御に関する知見の取得が必要不可欠である。そこで本研究では、環境条件等を変えながら植物全身の転流動態を PETIS で追跡し、転流が変化した組織・器官、およびそのタイミングをピンポイントに特定する。そこで発現し機能する遺伝子群を解析することで、特定の環境下に特定の部位で発現した遺伝子群が植物全身の転流過程をどのように調節するのか明らかにする。転流のメカニズムを遺伝子群の発現という観点から解明する。

2. 研究成果

(1) 概要

植物体内の光合成産物の動き(転流)を可視化できるポジトロンイメージング技術(PETIS)とポジトロン放出核種 ^{11}C を駆使し、代表的な園芸作物の一つであるイチゴを対象に、特定の組織・器官で発現した遺伝子群が植物全身の転流をどのように調節するか、全体像の解明に挑戦した。

第1年次は、植物全身における転流の変動を捉える解析システムを構築した。PETIS、多点型ポジトロン検出器(PMPS)、ポジトロン断層撮影装置(PET)を融合活用し、植物全身の転流動態の一体的な解析、および立体的な器官(果実等)での三次元的な転流動態解析を可能とするシステムを構築した。本システムは、 ^{11}C の半減期の短さのため(約 20.38 分)、同一個体を繰り返し供試して撮影試験を行える特徴を持つ。そこで、連続撮影による明期の経過が転流動態に及ぼす影響を評価した。次に、転流に関わる遺伝子群を探索する際に、植物体内の転流動態を意図的に変化させる手法の構築に取り組んだ。植物近傍の温度制御によって植物体内の転流を促進/抑制する転流制御システムを構築した。

第2年次は、前年度に構築した転流解析システムとX線CT装置とを融合活用し、地中の根への光合成産物の転流動態と根の形体を同時に解析する実験システムを構築した。また、転流制御システムを用いてイチゴ果実への転流を抑制し、転流動態を解析した。転流が変化するタイミングで植物組織をサンプリングし、トータルRNAを抽出してRNA-seq解析を行った。

第3年次は、転流抑制時のRNA-seq解析を第2年次に引き続き行った。転流の抑制/促進に係る遺伝子群の候補を特定した。特定した遺伝子群のノックダウン個体作成に向けて、滅菌状態でイチゴ苗を栽培するための栽培条件検討を開始した。

(2) 詳細

研究課題1: 転流動態解析システムの構築

i) 植物全体における転流動態を一体的に解析する手法の確立

炭素栄養の転流動態を解析する上でPETISは非常に強力なツールであるが、撮像視野が190 mm × 120 mmの範囲に限られる。そこで、20 mm × 20 mmの検出範囲内において植物体内の ^{11}C 標識光合成産物の転流動態を定量評価できる8台のPMPSを融合活用し、PETIS撮像視野外の植物器官の転流動態をPETIS撮像と併せて解析するシステムを構築した。次に、PETを融合活用し、PETISで撮像した果実等の立体的な器官で転流の変化を、PETで三次元的に可視化する実験システムを構築した。PETは径97mm × 長さ140mmの範囲に円筒状の撮像視野を持つ。PETISやPMPSでは評価できない植物体内部における立体的な ^{11}C 標識光合成産物の転流動態について、解析可能であることを確認した。本システムを用いて土壌中の根への光合成産物の転流動態の評価にも成功した。さらに、X線CTを融合活用することにより、土壌中の根の構造情報と転流機能譲歩を同時に取得するシステムの構築を試みた。しかし、イチゴ培地中に含まれるヤシ殻等の繊維がX線CTによる根の抽出のノイズとなり、イチゴの根の構造解析には至っていない。現在X線CT撮像に適したイチゴ栽培培地の検討を進めている。またイチゴとは別に、X線CT撮像に適した多孔質セラミックや珪砂で生育するイネを供試し、根の撮像試験を行った。PET撮像と融合活用することにより、

光合成産物が土壌中のイネの根へ不均一に転流し、さらに土壌環境が変化すると根への転流動態も変化することを明らかにした。以上より、PETIS、PMPS、PET、X線CTを融合活用することで、植物全身の転流動態を一体的に解析する実験システムを構築した。

上記システムに、植物体内の蒸散流速を測定するサップフローセンサ、土中水ポテンシャルを測定する土壌水分センサ、葉での光合成や蒸散等のガス交換速度を測定するCO₂濃度センサ・温湿度センサを組み込み、転流に関連する植物体内の水分動態や光合成速度、蒸散速度を測定する実験システムを構築した。

ii) 転流を制御する手法の確立

転流制御に関わる遺伝子群を探索する過程で、転流動態を意図的に変化させるための手法を構築した。以下の研究項目に取り組んだ。

(a) 明期の経過に伴う積算受光量の増加がイチゴ果実への転流動態へ及ぼす影響の評価

本研究で用いる¹¹Cの製造にはAVFサイクロトロンを利用する。研究代表者の所属機関では、サイクロトロンの1日の利用可能時間(マシンタイム)は最大8時間である。したがって3時間のPETIS撮像を実施する場合、¹¹Cの製造タイミングを考慮し、1日最大で3回の撮像試験が可能となる。転流制御に関わる遺伝子群を探索するために、3回のPETIS撮像でそれぞれ環境条件等を変化させ、転流が変化する器官の特定をする。本項目では、まず、PETISの繰り返し撮像による明期の経過が、光合成産物の転流動態へ及ぼす影響について評価した。葉の光合成にとって十分な光環境下では、明期の経過によって葉の積算受光量が増加すると、葉内の光合成産物の蓄積量が増え、葉から果実への光合成産物の転流も促進されることが明らかになった(図1)。一方で光補償点付近の弱光環境下では、明期が経過しても転流動態はほとんど変化しないことを明らかにした。

(b) 温度環境の変化がイチゴ果実への転流動態へ及ぼす影響の評価

転流動態を変化させるための手法として、温度環境の制御に着目した。本研究項目では、温度環境がイチゴ果実への転流動態へ及ぼす影響について評価した。同一個体を繰り返し供試して、2.5時間のPETIS撮像を4回実施した。1回目と3回目の撮像では気温を20℃に設定し、2回目と4回目の撮像では気温を30℃に設定した。得られた画像より、20℃から30℃へ温度を上昇させることで、果実への転流も大きく促進されることが確認された。また30℃から再び20℃へ温度を低下させることで、転流が抑制され1回目撮像時と同様の転流動態を示

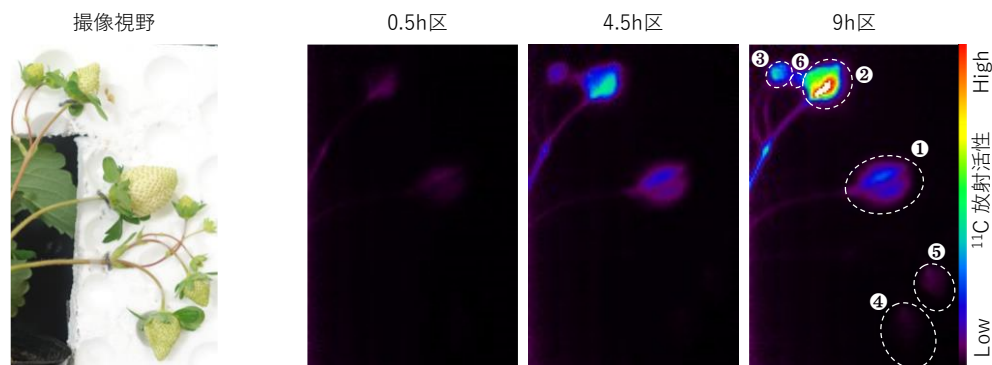


図1 明期の経過(0.5h経過、4.5h経過、9h経過)に伴う光合成産物転流動態の評価
すことが確認された。一方で、3回目と4回目の撮像を比較すると、温度を再び20℃から30℃

へ上昇させても果実への転流は1から2回目の撮像時ほど促進されなかった。一度温度の上昇を経験すると、その後は温度変化に対する転流の応答が鈍くなる現象を確認した。また、植物周辺の温度を20℃から10℃付近まで低下させることで、植物体内の転流が抑制されることが示された。

研究課題2: 転流制御遺伝子の探索

i) 植物全身の転流動態の解析、転流が変化した部位からトータル RNA を抽出

夾雑物の多いイチゴの葉、茎、果実等の器官からトータル RNA を収量・品質良く抽出するための独自のプロトコルを作成した。これを用いて、以下の研究項目に取り組んだ。

(a) 冷却による炭素栄養転流の抑制に関わる遺伝子群の探索

植物周辺の温度冷却時の転流抑制に機能する遺伝子群の探索を目的とし、冷却処理を施さない植物(対照区)、冷却後の植物(転流抑制区)より独自に作成したプロトコルを用いてトータル RNA をサンプリングした。

(b) 培地加温による根への炭素栄養転流の促進に関わる遺伝子群の探索

イチゴ栽培ポットの培地温度を約20℃の適温環境下から約30℃に加温すると、根への炭素栄養の転流が促進される現象を見出した。加温による転流促進を引き起こす遺伝子群およびタンパク質の探索を目的とし、培地適温下および培地加温下の根から独自に作成したプロトコルを用いてトータル RNA をサンプリングした。

ii) RNA-Seq 解析によって遺伝子発現量の変化を解析、転流制御因子の同定

RNA-seq 解析にあたり、リファレンスゲノムとして配列が公開されているイチゴ品種 Reiko や Camarosa を用いたところマッピング効率がそれぞれ約50%と70%であった。そこで de novo assembly を行い、RNA-seq 解析を行った。冷却試験における RNA-seq 解析から、冷却後の転流抑制に関わる遺伝子群の候補を特定した。

研究課題3: 遺伝子機能の解析

a) 探索した遺伝子群のノックアウト、ノックダウン個体の作成

研究課題2で特定した遺伝子群のノックダウン個体作成に向けて、滅菌状態でイチゴ苗を栽培するための試験を開始した。イチゴは親株からはランナーと呼ばれる枝の一種が地面を這うように伸び、先端に子苗が育つ栄養生殖の形態をとる。ランナー先端を消毒し、滅菌処理した寒天培地で育てるための栽培条件を検討した。ノックダウン個体はランナー先端部へ RNAi 法を導入することで作成を予定している。

b) ノックアウト、ノックダウン個体における転流動態の解析

候補遺伝子群のノックアウト、ノックダウン個体における転流動態評価のためのシステムを研究課題1で構築済みである。

3. 今後の展開

本研究により、光合成産物の転流動態の環境応答を解析および、それらの応答を左右する遺伝子群の発現および機能解析を行う一連の実験システムを構築した。本システムを用いて、種々の環境条件(植物周辺の光強度、温度、湿度、CO₂濃度、培地の養水分など)の変化に対する転流応答のメカニズム解明を進める。各種の環境応答の解析から遺伝子発現・機能の解析までおよそ2年のサイクルで取り組むことを構想している。得られた知見



に基づき、果実への光合成産物の転流を活性化するような栽培手法の探索を進める。ここで得られた知見に基づき、転流動態に基づく新たな栽培システムの一例を構築する。およそ7年での新規栽培システムの構築を想定する。

4. 自己評価

研究目的の達成状況は概ね順調である。研究課題1、2を達成し、「研究課題 3: 遺伝子機能の解析」は第3年次途中で未達であるが、遺伝子ノックダウン個体を作成するための栽培条件検討を進めている。ノックダウン個体における光合成産物の転流動態を解析するための実験環境は既に整えており、ノックダウン個体を作成次第すぐに転流試験を実施可能である。研究代表者は、様々な分野の研究者が集まる本研究領域の研究者間ネットワークを最大限に活用し、ACT-X内外の研究者との交流によって助言を貰いながら、これまでほとんど経験の無かった分子生物学的、遺伝子工学的手法による研究を実施してきた。これにより、PETISを用いて光合成産物の転流動態を解析し、得られた知見から転流動態を左右する遺伝子群の発現解析を行うといったような、光合成産物の転流メカニズムの全体像の解明に資する世界に類を見ない一連の実験システムを構築した。これはACT-Xを通じた異分野の研究者との相互触発を最大限に活かすことで成し得たものである。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 4件

1. Yuta Miyoshi, Yuto Nagao, Mitsutaka Yamaguchi, Nobuo Suzui, Yng-Gen Yin, Naoki Kawachi, Eiji Yoshida, Sodai Takyu, Hideaki Tashima, Taiga Yamaya, Noriyuki Kuya, Shota Teramoto, Yusaku Uga. *Plant root PET: visualization of photosynthate translocation to roots in rice plant. Journal of Instrumentation. 2021, 16, C12018.*

植物研究に特化したOpenPETとX線CTを融合活用し、陸稲を対象として、土壌中の根の構造と転流機能の非破壊解析を試みた。得られた画像より、光合成産物は土壌中の根に不均一に転流することが明らかになった。根によって転流機能が異なることが確認された。土壌中で立体的に発達する根の構造と根によって異なる光合成産物の転流機能を、植物非破壊で解析することに成功した。

2. Yuta Miyoshi, Kota Hidaka, Yong-Gen Yin, Nobuo Suzui, Keisuke Kurita, Naoki Kawachi. *Non-invasive ^{11}C -imaging revealed the spatiotemporal variability in the translocation of photosynthates into strawberry fruits in response to increasing daylight integrals at leaf surface. Frontiers in Plant Science. 2021, 12, 688887.*

生きた植物体内の栄養元素の動態を可視化し定量的に解析できるポジトロンイメージング技術(PETIS)とポジトロン放出核種 ^{11}C を用いて、明期の経過に伴ってイチゴ葉の積算受光量が増加すると、果実への転流が促進されることを明らかにした。積算受光量の増加によって葉内における光合成産物の蓄積量が増えると、転流糖であるスクロースの合成および師管への能動輸送が促進され、果実への転流も促進されることが示唆された。

3. Yuta Miyoshi, Fumiyuki Soma, Yong-Gen Yin, Nobuo Suzui, Yusaku Noda, Kazuyuki



Enomoto, Yuto Nagao, Mitsutaka Yamaguchi, Naoki Kawachi, Eiji Yoshida, Hideaki Tashima, Taiga Yamaya, Noriyuki Kuya, Shota Teramoto, Yusaku Uga. Rice immediately adapts the dynamics of photosynthates translocation to roots in response to changes in soil water environment. Frontiers in Plants Science. 2023, 13, 1024144.

植物研究に特化した OpenPET と X 線 CT を融合活用し、陸稲を対象として、土壌中の根の構造と転流機能の非破壊解析を試みた。イネの根が干ばつ下に置かれた土壌環境と、水分が十分に存在する土壌環境下の光合成産物の動きを比較したところ、干ばつ下では下方方向に伸びる根に光合成産物を分配するのに対し、土壌中の水分が増えると地表近くの横方向に展開する根に分配することが分かった。水分状況に応じて栄養の分配先を選択的に切り替えるイネの干ばつを生き抜く戦略の一端が明らかになった。

4. *Yuta Miyoshi, Jens Mincke, Jonathan Vermeiren, Jan Courty, Christian Vanhove, Stefaan Vandenberghe, Naoki Kawachi, Kathy Steppe. Translocation of ^{11}C -labelled photosynthates to strawberry fruits depends on leaf transpiration during twilight. Environmental and Experimental Botany. 2023, 211, 105353.*

温室において明け方や薄明時に発生する低光強度かつ高湿度条件といった特殊環境下の転流動態を、陽電子放出断層撮影法(PET)とポジトロン放出核種 ^{11}C を用いて解析した。転流に影響する重要な環境要因として光強度に焦点を当て、弱光範囲内で異なる光強度の条件下を設定し、イチゴ果実への ^{11}C 転流動態を解析した。その結果、果実への転流速度と光強度の間には明確な関係は見られなかったが、葉の蒸散速度との間には強い負の相関があった。葉の水分状態を制御する蒸散が、明け方や薄明時の果実への光合成産物の転流動態に大きく影響する要因の一つとなることが示唆された。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 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)

(主要な学会発表) 9 件の学会発表(うち 3 件の国際学会)を実施。代表的な 2 件を示す。

- 31st International Horticultural Congress、「Non-invasive ^{11}C -imaging revealed the translocation dynamics of photosynthates into strawberry fruits in response to increasing daylight integrals at leaf」、2022 年 8 月、オンライン
- 日本土壌肥料学会 2022 年度東京大会、「イチゴ果実の着果によって変化する根への光合成産物の転流動態」、2022 年 9 月、東京

(受賞)

- 日本土壌肥料学会 2021 年度北海道大会、ポスター発表優秀賞
- 日本土壌肥料学会 2022 年度東京大会、若手ポスター発表優秀賞

(招待講演)

- 令和 4 年度 IoP 塾後期企画「農業振興と農学(研究・教育)の未来可能性」、2022 年 10 月