

外98-53

早稲田大学大学院理工学研究科

# 博士論文概要

## 論文題目

NMR イメージングによる  
植物組織の生理活性の  
解析に関する研究

申請者

小泉 美香

Mika Koizumi

1998 年 12 月  
(西暦)

Nuclear Magnetic Resonance (NMR; 核磁気共鳴)は、1980年代後半になって超伝導磁石やコンピューターの発達により急速に感度を増し、高い安定性を得るようになった。NMRは、生物の重要な構成要素である核種の情報を非破壊的に得られることから、医学の研究に広く用いられている。中でも $^1\text{H}$ -NMRイメージングは、生体反応にとって重要な水の状態に関する情報を、非破壊的に形態画像として与えるために注目されているが、植物を対象とした研究例は多くない。本研究は、近年急速に発展しているNMRイメージングによって植物の発生過程やストレスに対する反応を非破壊的に明らかにすることを目的としたもので、植物生態学の研究に新しい手法を導入するものである。

第一章では、本研究の目的と、全体の概略を述べた。近年広がり続ける塩害を受けた圃場や海浜の荒廃した土地を緑化して、植物の生態系を保全することは重要である。そのためには生体情報を計測し、それを基に植物の生育をコントロールする必要がある。本研究では、このような生体情報を得る手段としてのNMRイメージングの可能性を検討した。NMRイメージングは植物生態学に新たな研究手法を導入する可能性を持っていた。例えば耐塩性植物の代謝活性が特異な状態にあることを形態と関連付けて捉えることが可能であり、発生過程における組織の代謝活性の経時的変動や、分化した組織間における生理的役割の違いを可視化して捉えることが可能であった。さらに、これらの研究を進める過程で、根から吸収された化合物や代謝産物の体内における分布と移動を把握することが重要であると考えられ、新しい測定技術を開発した。

第二章では、NMR、及び、NMRイメージングの原理を概説し、NMRイメージングの植物生理研究への応用の可能性について論じた。 $^1\text{H}$ -NMRイメージングは非破壊的に組織の自由水分分布をマッピングし、形態的イメージを構成する。そのシグナルは自由水の量と運動性の情報を含み、医学における診断で解るようにガン細胞のような代謝が活発で成長が速い組織は、 $^1\text{H}$ -NMRイメージングでは強いシグナルを与える。これは、代謝反応部位への基質と酸素の輸送、反応部位からの代謝生産物と炭酸ガスの除去、そして、代謝熱の細胞外への排出などが細胞の水の動きによって行われていて、細胞の生理作用全体が水の物理的な性質の上に反映されるためである。この考え方は、植物組織においてもそのまま成り立つと考えられることから、植物の生理生態学的研究に有用な生体情報を与える可能性を示した。

第三章では、熱帯、及び、亜熱帯のマングローブ林構成種であるオヒルギ(*Bruguiera gymnorrhiza* Lam.)の気根、枝、胎生種子における水の分布を $^1\text{H}$ -NMRイメージングで調べた。オヒルギの当年枝は、表皮と維管束周辺の組織でのみ $^1\text{H}$ -NMRイメージのシグナルが強く、代謝活性が強かった。一方、皮層と髓のシグナルは弱く、代謝が抑制されていることを示した。これは、髓が高い活性を示す温帯の常緑樹であるアオキ(*Aucuba japonica* Thunb.)とは異なるところである。オヒル

ギのこのような特徴は、胎生種子の発芽、及び、母樹を離れた後の着根の過程においても同様であった。また、オヒルギでは代謝の抑制されている髓に $\text{Na}^+$ を集積することが、新しく開発した $^{23}\text{Na}$ -NMRイメージングによって明らかになった。

第四章では、耐塩性作物と言われているサトウデシヤ(*Beta vulgaris* L. var. *Rapa Dumort.*)の根に対する $\text{Na}^+$ の影響を調べた。ここでは、 $^1\text{H}$ -NMRイメージング、及び、 $^{23}\text{Na}$ -NMRによる水と $\text{Na}^+$ の分布の観察の他に、リン酸代謝に対する $\text{Na}^+$ の影響を $^{31}\text{P}$ -NMRで、また糖蓄積に対する影響を $^{13}\text{C}$ -NMRを用いて検討した。 $^1\text{H}$ -NMRイメージによると、比較のために観察した耐塩性の弱いニンジン(*Daucus carota* L. var. *sativa* DC.)では、 $\text{Na}^+$ 処理により水の少なかった篩部に多量の水が存在するようになり代謝の高まりを示したが、組織切片の観察からそれは異常代謝であると考えられた。サトウデシヤの肥大根では、表皮と維管束周辺のみが強いイメージシグナルを与えて高い代謝活性を示したが、柔組織は代謝が抑制されていた。培養液中に $\text{Na}^+$ を添加すると、表皮と維管束周辺の代謝も抑制された。この結果は、コハク酸脱水素酵素活性の強い細胞を染色するTNBTによる染色結果と一致した。180mMの $\text{Na}^+$ を含む培養液中で生育させると根中の $\text{Na}^+$ 濃度は9.2mMに達し、 $^{31}\text{P}$ -NMRスペクトルにおいて、液胞中のリン酸シグナルの線幅が広がった。さらに、耐塩性植物では $\text{Na}^+$ 存在下で細胞に蓄積すると言われているベタインやグルタミンより、はるかに多量のショ糖が柔組織に蓄積されることが、 $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルにより明らかとなった。

第五章では、熱帯の海浜に自生するソナレシバ(*Sporobolus virginicus* Kunth)の根における $\text{Na}^+$ の吸収過程と、そのリン酸代謝への影響を検討した。ソナレシバの根端は、 $^{23}\text{Na}$ -NMRによれば細胞内と外液の濃度勾配に逆らって良く $\text{Na}^+$ を吸収した。自作した灌流システムを用いて $^{31}\text{P}$ -NMRスペクトルに対する $\text{Na}^+$ の影響を検討すると、 $\text{Na}^+$ は高エネルギーリン酸化合物には著しい影響は与えなかったため、代謝に一義的な阻害を与えるわけではない。一方、液胞の無機リン酸シグナルは $\text{Na}^+$ の添加後、5分以内にブロードになって消失し、耐塩性に液胞が大きな役割を果たしていることを示した。液胞膜成分のリン酸化によって、液胞内への $\text{Na}^+$ の取り込みが促進されると推測された。

第六章では、常磁性金属イオンの $\text{Mn}^{2+}$ をトレーサーとして、トウモロコシ(*Zea mays* L. cv. *Ushiku*)芽生えの根から茎への水の移動過程を経時的に測定した。造影剤として用いられる $\text{Mn}^{2+}$ イオンは、水と相互作用して水の緩和時間(スピン-格子緩和時間 $T_1$ 、及び、スピン-スピン緩和時間 $T_2$ )を著しく短くする。このため、 $T_1$ -強調イメージ法を用いると、特定の $\text{Mn}^{2+}$ 濃度となった部位のみを強調することができた。これにより、 $\text{Mn}^{2+}$ は第一本葉の維管束で最初に検出され、第一本葉全体に広がるとともに第二本葉の中肋周辺と子葉鞘の維管束に検出された。ついで、第三本葉の中肋で検出されるとともに子葉鞘全体に広がる様子を経時的に追跡できた。

この  $Mn^{2+}$  の取り込み過程は、 $T_1$ -強調イメージを顕微鏡写真にスーパーポジションすることによって 1 本の維管束を通過する  $Mn^{2+}$  を明確に捉えることが可能であった。

第七章では、トウモロコシの種子に存在するショ糖と脂質の分布を NMR イメージングで解析し、脂質組成を  $^{13}C$ -NMR シグナルの波形解析によって測定した。糖は植物においては蓄積量が少ない場合が多い上に、 $^1H$ -NMR シグナルが巨大な水のシグナルに近いことから、ケミカルシフトイメージングで比較的容易に検出できる脂質とは異なり、新しい検出法の開発が必要であった。そこで、局所スペクトルイメージ法を開発した。これによりトウモロコシの種子では、胚と果皮に脂質が蓄積し、胚乳に糖が蓄積していることを示した。 $^{13}C$ -NMR スペクトルによれば、糖はショ糖であった。また、 $^{13}C$ -NMR スペクトルを波形分割シミュレーションすることによって、脂質組成は飽和脂肪酸 10%、オレイン酸 35%、リノール酸 55%であることが判明した。

第八章では、局所スペクトルイメージ法により、発芽オオムギ (*Hordeum vulgare* L. cv. New golden) の胚乳の異化過程と糖の蓄積、及び、転流過程を追跡した。 $^{13}C$ -NMR スペクトルによれば、可溶化された胚乳に存在する糖の大部分はマルトースで、発芽後 6 日目まで増加して、その後急激に低下した。 $^1H$ -NMR イメージによると胚乳は外穎側より可溶化して、糖は可溶化した胚乳全域と内穎側の珠心、及び、維管束に 7 日目まで認められ、9 日目には胚乳より消失した。糖はシュートにおいては維管束に高濃度で認められたが、胚盤より 7mm 以上離れた位置では検出されなかった。これは葉の成長点が基部にあり、糖が基部の細胞に活発に取り込まれて成長に使われたためである。シュートにおける物質の移動は、 $Mn^{2+}$  の場合でも糖の場合でもおもに維管束によって行われるが、それと同時に活発に周囲の柔細胞に取り込まれることが明らかとなった。

第九章では、本研究の結果をまとめ、今後の展望を述べた。NMR イメージングによって組織の形態との関連の上で代謝活性の変動を非破壊的に計測して、種による特異性や、発生過程、及び、塩ストレスによる代謝活性の変化を観測することができた。 $^1H$ -NMR イメージングは  $^1H$ -NMR、 $^{13}C$ -NMR、 $^{23}Na$ -NMR、 $^{31}P$ -NMR と組み合わせることによって細胞の代謝、エネルギー代謝、及び、 $Na^+$  などイオンの吸収、移動などの生体情報を非破壊的に可視化して観測することを可能とした。これは生態学的立場より見た生体情報科学において、他に代わるもののない手法であり、新しい方向性を示した。一方、NMR イメージング、及び、NMR は元素分析や蛍光分析など他の測定法より感度が劣るため、使用範囲が限定されているという問題がある。この点について、今後、測定技術の開発のみならず、他の研究手法との連携を取り入れて、より多くの生体情報の採取が可能となるように努力したいと考えている。