

RI と蛍光イメージングで読み解く 師管輸送経路



相馬 愛
Soma-Kaiho Ai

1 はじめにー放射性同位体と蛍光イメージングー

イメージングは物質の空間分布を可視化する技術であり、生命科学分野において重要な役割を果たしている。特に放射性同位体（Radioisotope：RI）を用いたイメージングは高い感度と優れた定量性を有することから、植物生理学や医療分野において広く利用されてきた。一方で、安全管理や専門施設の使用制約があることに加え、近年の蛍光顕微鏡技術の発展により、蛍光イメージングの利用も拡大している。

RI イメージングは放射壊変に伴って放出される β 線や γ 線を検出することでシグナルを取得する。このため、標識した元素の化学形態が変化しても検出可能であり、トレーサとしての汎用性が高い。一方、蛍光イメージングは蛍光物質に特定の励起光を照射し、発せられる蛍光を CCD カメラ等で検出する手法である。光の吸収や散乱、蛍光の退色、プローブ濃度依存性等の影響を受けるために定量性には制約があるが、観察が容易であり、リアルタイム測定や波長の異なる複数の蛍光物質の同時検出が可能であるという利点を有する¹⁾。

それぞれの特徴を活かした多くのイメージング手法が用いられているが、今回筆者らは RI と蛍光プローブを組み合わせることで、植物体内における光合成産物の輸送経路を相補的に可視化した²⁾(図1)。本稿では、その具体的な手法について紹介する。

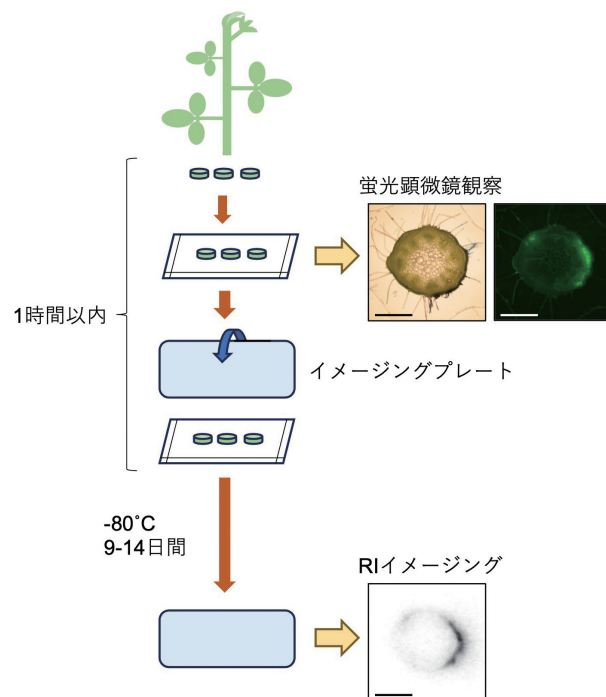


図1 蛍光顕微鏡と RI イメージングを組み合わせた実験の概略図

2 ダイズの光合成産物の輸送経路のイメージング

多くの高等植物では、維管束と呼ばれる通導組織が発達しており、維管束は水や無機養分を輸送する道管と、光合成産物等の有機物を輸送する師管から構成される。光合成産物は主にスクロース（蔗糖）の形態で輸送されるため、局所的に ^{14}C -スクロース

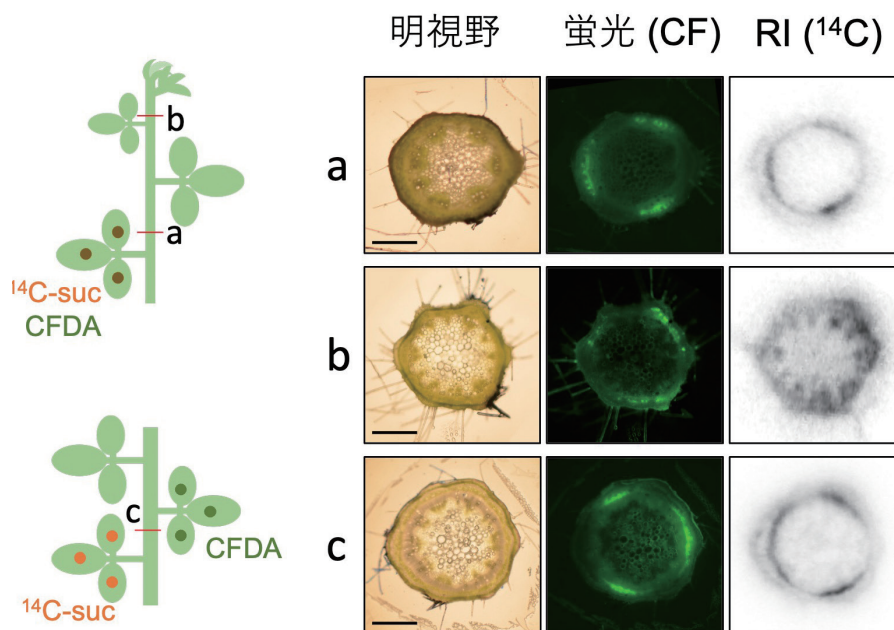


図2 ダイズ茎横断切片におけるCFと ^{14}C の分布比較（参考文献2を改変）

左に模式図、右にイメージング画像を示す。模式図中の文字は切片の位置を示す。右図は明視野像、蛍光像（CF）、及びRI像（ ^{14}C ）から構成される。

a：同一部位にトレーサを添加（成熟茎）b：同一部位にトレーサを添加（未成熟茎）c：異なる部位にトレーサを添加（成熟茎）

スケールバー：1 mm

を投与することで輸送経路の解析が可能である。一方、蛍光プローブとしてはカルボキシフルオレセイン（Carboxylfluorescein：CF）が師管マーカーとして知られている³⁾。CFは膜透過性を持つ前駆体であるカルボキシフルオレセインジアセテート（Carboxylfluorescein diacetate：CFDA）として組織に添加され、細胞内でエステラーゼにより加水分解されて蛍光性のCFとなる。生成したCFは細胞膜を透過しないため細胞外空間（アポプラスト）には移行せず、細胞同士をつなぐ原形質連絡を介した細胞内経路（シンプラスト）を通じて移動する。この性質により、CFは師管輸送を反映する指標として利用されている。

本研究では、 ^{14}C -スクロースとCFの輸送挙動を比較することにより、ダイズにおける光合成産物の輸送経路の特徴を明らかにすることを目的とした。紙やすりでダイズの葉の表面を軽く削り、 ^{14}C -スクロースとCFDAを同一又は異なる部位に添加した。4時間後に茎の徒手切片を作製し、それぞれの輸送経路を可視化した。切断に伴う内容物の流出や乾燥の影響を抑えるため、切断面の滲出液を除去した後、試料をポリフィルムで包んで保持した。まずCFの

蛍光観察を行い、その後同一試料についてイメージングプレートを用いたオートラジオグラフィによりRIを検出した。切片中の放射能は微量であったため、 -80°C で数日間のコンタクトを行うことで検出感度を確保した。切断から凍結までの操作は1時間以内に行い、物質分布の変化を最小限に抑えた（図1）。なお、師管は篩板によって区切られており、損傷時には篩板孔の閉塞により内容物の流出が抑制されるとされている。しかし、薄片片では切断の影響が大きく、内容物の保持が困難となる場合がある。そのため、本研究では比較的厚みのある徒手切片を用いることで、より実際の分布に近い状態を保持できると考えた。

^{14}C -スクロースとCFDAを同一部位に同時に添加した場合、成熟した茎においてはCFと ^{14}C のシグナルは同一の師管領域で検出された（図2a）。一方で、未成熟な部分では ^{14}C -シグナルが師管領域に加えて道管や表皮付近にも観察された（図2b）。CFは原形質連絡を通じて拡散的に広がるのに対し、スクロースは植物体内で必要とされる部位へ優先的に運ばれる性質を持つと考えられている。また、その過程では細胞間隙を通る経路（アポプラスト）も関

与する可能性がある。このような違いにより、両者の分布に差が生じたと考えられる。

更に、CFと ^{14}C -スクロースを異なる部位に添加することで、それぞれの輸送起点と経路を区別して可視化した(図2c)。この結果から、ダイズでは光合成産物の輸送経路が個体内で細かく分かれていることが示唆された²⁾。このような輸送経路の構造により、各器官は、複数の葉から栄養供給を受けることが可能となり、特定の供給源が失われた場合でもその影響が緩和される可能性がある。

3 おわりに

本手法は既存のRIイメージングと蛍光イメージングを組み合わせたものであり、特別な装置を必要とせず比較的簡便に実施可能である。師管輸送の解

析には他にも複数の蛍光プローブが報告されており⁴⁾、異なる輸送様式を反映するプローブとRIを組み合わせることで、物質輸送の経路や制御機構をより詳細に解析できると考えられる。本稿で示した手法が、植物体内における物質輸送の理解を深めるための一助となれば幸いである。

参考文献

- 1) 古川高子, *et al.*, *Radioisotopes*, **58**, 487–497 (2009)
- 2) Kaiho-Soma, A., *et al.*, *Plant Signal. Behav.*, **20**, (2025)
- 3) Grignon, N., *et al.*, *Am. J. Bot.*, **76**, 871 (1989)
- 4) Knoblauch, M., *et al.*, *Plant Physiol.*, **167**, 1211–1220 (2015)

(福島国際研究教育機構 (F-REI) 植物イメージング研究ユニット)