

作物生理研究法

$^1\text{H-NMR}$ による作物の温度応答モニタリング法

井上眞理

(九州大学大学院農学研究院)

作物はハウスで栽培されることの多い園芸植物と異なり、気温や降雨など野外環境の影響を直接受ける。温室効果ガスの影響は北アジアで最も大きく、日本における環境ストレス耐性の作物の作出は急務である。ストレス耐性品種の選抜法のひとつである収穫後の収量・品質調査には膨大な時間を要してきたが、近年の著しい環境変動に対応するための効率のよい選抜法が望まれる。本稿では、作物学の分野ではこれまであまり注目されていなかった水分子の運動性に焦点をあてた研究について紹介する。温度ストレスを受けた作物における水分子の動的情報は生理活性をどのように反映しているのか、またストレス傷害の「早期発見」の応用の可能性について解説する。

1. NMR の観測対象核と試料の準備

核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) 現象は、1946年に米国の Bloch と Purcell によりそれぞれ独立して同時に発見された。NMR は原子の核スピンを観測する機器であり、原子核を構成する陽子数および中性子数のうち、いずれかまたは両方が奇数の場合には核スピをもつため、観測が可能となる。一般に用いられる観測核は、 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{19}F 、 ^{31}P などである。例えば、水素原子核の場合、 ^1H では陽子数 1、中性子数 0 で、このため ^1H はプロトンと呼ばれる。生体内に多く含まれる対象核の同位体の天然存在比は、 ^1H 核は 99.98%、 ^{31}P は 100% であるため感度が高い。これに対し、 ^{13}C は 1.1%、 ^{17}O は 0.037% しか存在しないが、共鳴を繰り返して NMR シグナルを積算することにより観測できる。

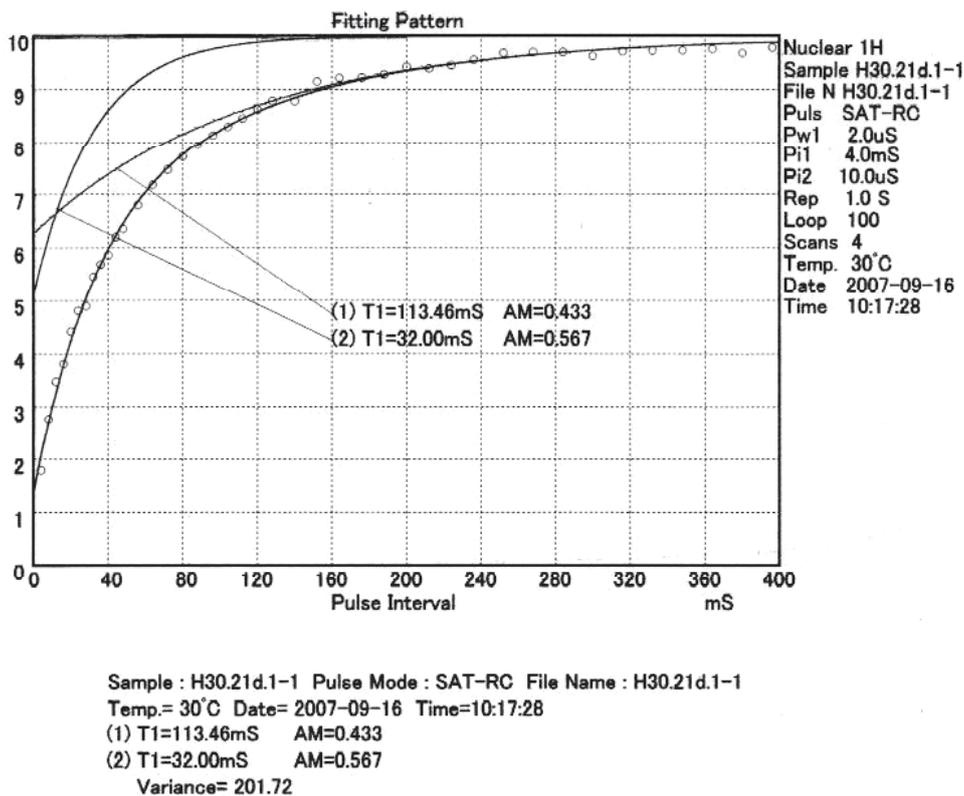
これら核スピをもつ原子核は一種の磁石 (磁気モーメント) をもち、コマのように自転している。この原子核の運動は固有の周波数を持っており、外部からそれと同じ周波数の磁場を与えた時に共鳴し、外部エネルギーを吸収することから核磁気共鳴という。NMR は、波長 1 m~1 km のラジオ波のエネルギー (1 neV~1 meV) レベルであり、X 線 (波長は 1 pm~10 nm で、エネルギー 2~20 keV) に比べ、著しくエネルギーレベルが低い観測域であるのが特徴である。このため、NMR は非常に微弱なエネルギー変化を検出しなければならず、生体に優しい非破壊 (非侵襲) 的計測手法といわれるゆえである。

水素原子核を対象とした $^1\text{H-NMR}$ では、生体内の水の信号を捉えることができる。米国の Damadian (1971) は NMR 緩和時間が悪性腫瘍組織では正常な組織より長くなることを見出し、この現象を応用した医療診断法として Magnetic Resonance Imaging (MRI) が広く利用されている (Weishaupt 2003)。植物を対象とした MRI 研究においてもすぐれた総説がある (Ishida ら 2000)。作物では、イネ子

実の吸水過程や (Horigane ら 2006)、イネ、オオムギ、ダイズの登熟過程 (Kano ら 1990, Horigane ら 2001, Glidewell 2006) の子実の画像を見ることができる。MRI は、導入にあたり設備費や寒剤などランニングコストがかかるのが難点であるが、本稿で紹介する装置では 2 次元情報は得られないものの緩和時間を観測することにより、水の動態を知ることができる。装置は、磁場強度 0.59 テスラ (1 テスラ = 10^4 ガウス) の永久磁石を内蔵した 25 MHz-NMR (Mμ25 A, JEOL 社製) で、 ^1H の共鳴周波数は 25 MHz である。NMR は温度に敏感であるため室温をコントロールできる部屋に設置する必要があるが、本装置では磁場をシールドするための隔離施設は不要である。試料は直径 10 mm の NMR 管に約 15 mm の高さまでゆるく詰め、



第 1 図 NMR 測定の実際。NMR 管に詰められた籾のプロープへのセット (田中浩平)



第2図 ヒノヒカリ開花21日目(30°C区)の籾のNMR緩和時間(T_1)の測定例(飽和回復法)。

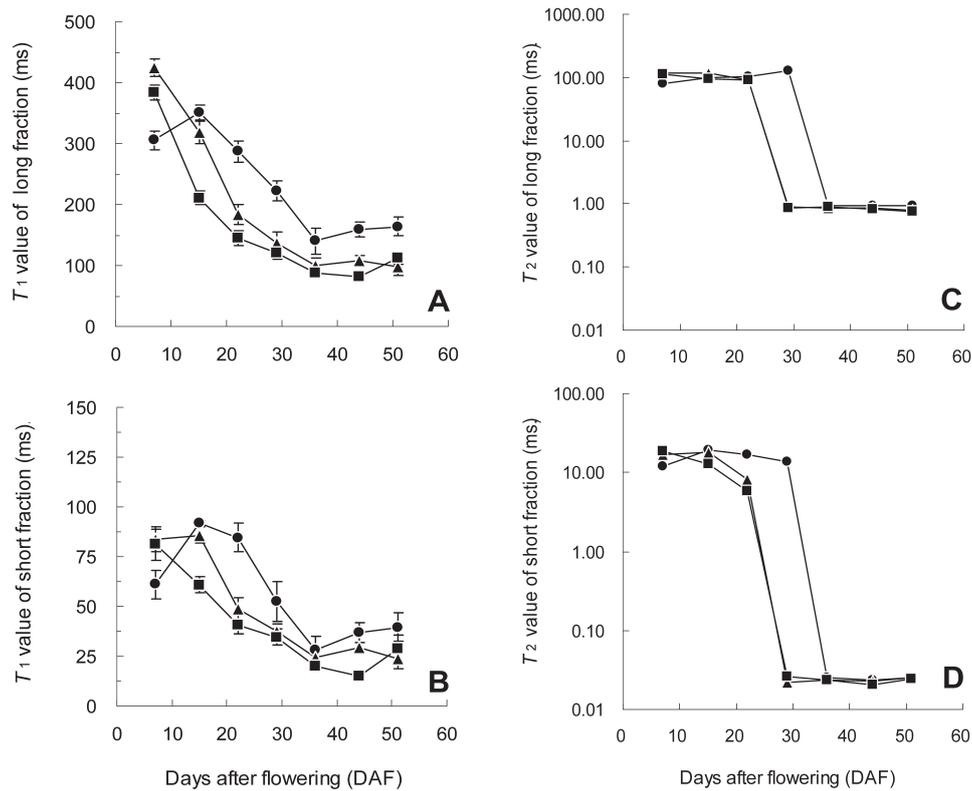
NMRプローブにセットする(第1図)。NMRの最大の利点は試料の前処理が不要なことである。このため、本稿では、測定に際して必要なパラメータの設定とデータ解釈に重点をおいて解説したい。

2. 登熟過程の温度応答におけるイネ籾の緩和時間計測

水稻(*Oryza sativa* L.)の収量と品質を制限する大きな要因のひとつとして温度障害に関する古くからの研究の蓄積があるが(長戸・江幡1960, 村田1964, 日本作物学会2003), 籾の水分子応答によるアプローチは殆どなかった。私達は、西日本地区で広く栽培され、高温による品質低下がみられる水稻品種ヒノヒカリを材料とした。戸外で5000分の1aのワグネルポットに2本植えたヒノヒカリを、開花後に大型ファイトトロン(20, 25および30°C区にそれぞれ36ポットずつ搬入した。温度処理期間(51日間)にわたり、ワゴン内のポットの位置を均等に移動させることにより、日射量の影響による差を最小限に抑えた。籾の水分動態については、NMR緩和時間を調べることにより開花期から収穫期までの温度応答の推移を追い、さらに収穫後に品質調査を行った(Funabaら2006)。

緩和とは、強い磁場におかれた磁気モーメントの向きの違いを利用して、その差に相当するエネルギーの遷移により平衡状態に戻ることを意味する。開花後21日間30°Cで栽培したヒノヒカリの籾のスピン-格子(または縦)緩和時間(T_1)測定の一例を示す(第2図)。プローブ内の温

度はいずれの処理区も30°Cに設定して測定した。 T_1 は原子核の核スピンエネルギーがまわりの格子(分子を構成している他の原子核)に熱的に逃げる過程を表す。Saturation recovery法により、パルス系列は($90^\circ - \tau - 90^\circ$)で求めた。この方法では、 90° パルスを繰り返して磁化を飽和させ、一定の時間待ち(τ)した後、回復した磁化の大きさを次の 90° パルスで検出する。 T_1 は、 $M\tau = M_0 [1 - \exp(-\tau/T_1)]$ の式から求められ、各条件での $M\tau$ の値を計測してプロットする。 $M\tau$ は τ 時間後の巨視的磁化、 M_0 は平衡磁化を示す。第2図は、Pw1(RFパルス幅)= $2.0\mu\text{s}$ 、Pi1、Pi2(マルチパルス系列でのRFパルス間隔=各 4.0ms 、 $10.0\mu\text{s}$ 、Rep=1.0sec(パルス系列の繰り返し時間)Loop=100(RFパルスを連続して発生させる時の回数)、Temp.(プローブ内の設定温度)=30°C、Scan(信号の積算回数)=4を意味している。第2図では、これらのパラメータにより観測された籾の水分子中の水素原子核のシグナル強度をプロットしたものを示しており、最小二乗法によりその傾きを求めたものが T_1 値である。ここでは T_1 値の長い成分は、113.46ms、短い成分が32.00ms、AM(成分)は、それぞれ0.433、0.567という結果が得られたが、これは T_1 の長い成分と短い成分の和に対する割合を示している。純水のように均一の分子動態をもつものはひとつの成分で表されるが、生体ではふつう2種類以上の水の画分をもつため、緩和時間は複数の成分に分割される(Iwaya-Inoueら2004a, c)。



第3図 登熟過程の温度が水稲「ヒノヒカリ」籾のNMR緩和時間 (T_1 , T_2) に及ぼす影響 (Funabara 2006).

A, T_1 の長い成分; B, T_1 の短い成分; C, T_2 の長い成分; D, T_2 の短い成分; ●, 20°C; ▲, 25°C; ■, 30°C 処理をそれぞれ示す。

スピンスピン緩和時間 (T_2) は核スピン同士による磁場の不均一さを反映している。 T_2 は Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 法で、 $90^\circ x - \tau - 180^\circ y - 2\tau - 180^\circ y - 2\tau - \dots$ のパルス系列により、 180° の繰り返し回数 n を変量とし、 $M_{2nr} = M_0 \exp(-2n\tau/T_2)$ により求めた。また 1 ms 以下の著しく短い T_2 は Solid echo 法 ($90^\circ - \tau - 90^\circ$) により測定した。生体のような不均質系における複数の T_2 は、 $M(t) = \sum a_i \exp[-(t/T_2)_i^m]$ から求めた。 $M(t)$ は巨視的磁化、 m はワイブル係数で、1 (ローレンツ型) から 2 (ガウス型) の間の値を入力し、非線形の最小二乗法の計算を行った。

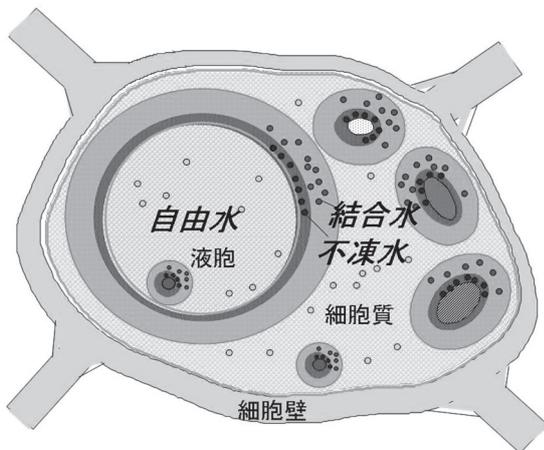
イネの開花後 20 日の平均気温が 26.5°C 以上になると白未熟粒の発生率が急増することや (船場ら 2000)、高温障害の原因についての詳しい総説がある (森田 2008)。ヒノヒカリの籾の登熟過程の温度ストレスにおいて水分応答に何か違いはないのか、 T_1 や T_2 の推移プロファイルを 25°C (対照) と比較した (第3図)。その結果、温度により特徴的な水の分子挙動を示すことが明らかになった。30°C 区では、開花後 7 日から 15 日の乳熟期から糊熟期にかけて T_1 値が有意に短縮した (第3図 A, B)。また、 T_2 値は、開花後 22 日までは、二成分はそれぞれ 100 ms および 10 ms であったが、22 日から 29 日 (黄熟期) にかけて、急激に減少し 1 ms および 20 μ s を示した (第3図 C, D)。一方、20°C 区は登熟過程を通じて T_1 および T_2 値が長い傾向が見

られ、特に開花後 29 日まで T_2 の二成分はそれぞれ 100 ms および 10 ms であった。 T_2 は、著しく短い値を得ることができるので、この図では対数でプロットしていることに注意してもらいたい。

生体内には複数の性質の異なる水があり、動物に比べ特に液胞が発達している植物は明らかに異なる水の領域をもっている。一般に生体組織において緩和時間が長いことは、水の分子運動が盛んな水が存在していることを意味し、特に T_2 値が短い場合には、水の運動性が束縛されている構造化した水が多いと考えられる (Bryant, 1996)。細胞は膜系で仕切られ、異なる運動性をもつ水の相として存在しており、特に植物細胞では液胞にバルク水として大量に存在する。すなわち、自由水またはバルク水 (free water, bulk water) の緩和時間は約 1~2 s、緩い結合水 (loosely bound water) は数 100 ms のオーダーで、不凍水または束縛水 (nonfreezing water; tightly bound water) は数 10 μ s のオーダーとなる。結合水またはガラス化した水 (bound water, glassy state of water) はその中間の領域の水である。乾燥に伴う子実の水のガラス化 (転移) 現象についてはインゲンマメの種子やトウモロコシの胚で報告されており (Williams and Leopold 1989, Leprince and Vertucci 1995)、子実中の水は非結晶状態の水と考えられる (Mishima and Stanley 1998)。この水は、イオンや生体高分子、膜系など

との相互作用に強く影響されている。

このことから、30℃、25℃区で栽培されたヒノヒカリ籾の自由水は、開花後22日まで存在したがその後消失したことがわかる(第3図, 第4図)。これに対し、20℃処理では自由水が7日長く保持されていると考えられた。以上のことから、含水率が高い時期には含水率は T_1 とよく相関したが、籾の含水率が新鮮重あたり約30%以下になると T_2 が敏感に応答した。即ち、水稻の登熟過程において、籾の T_1 値は登熟初期から中期まで、また T_2 値は登熟後期の変化を追跡するのに有効であり対照区と比較することにより容易に温度に対する診断指標となることが明らかとなった。

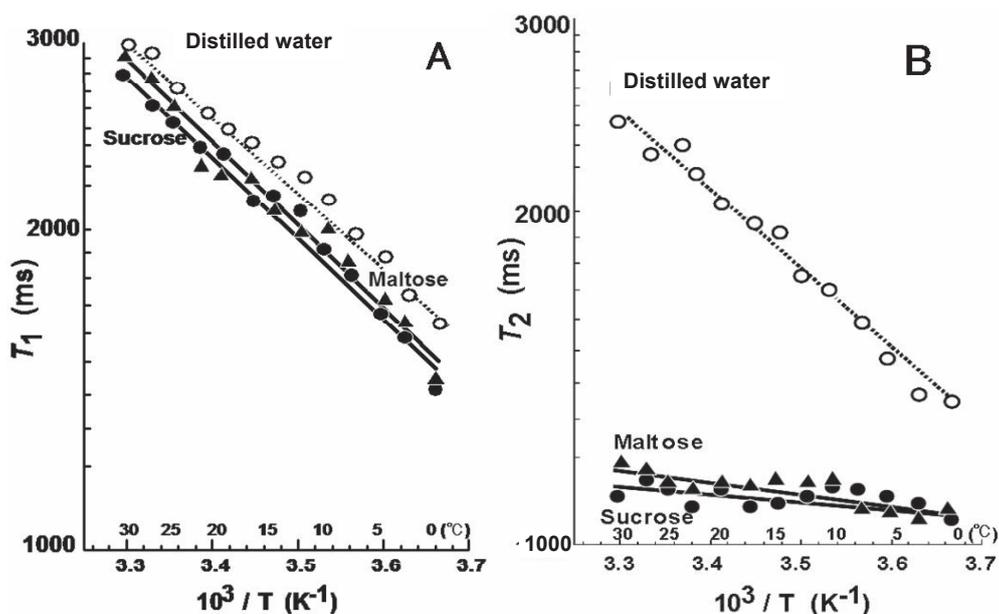


第4図 植物細胞の水の画分のモデル。膜系に最も近い部分から不凍水、結合水、自由水を示している。液胞の中はほとんど自由水で占められ、細胞質にはオルガネラ(細胞内小器官)が多く存在するため、結合水が多いことを示している。

3. 牧草の温度応答に対するリアルタイム緩和時間計測

登熟過程のような長いタイムスパンでの温度の影響だけでなく、NMR管の周囲の温度を変化させることにより数時間以内の緩和時間の変化から生体の温度反応を知ることができる。まず、溶液系(純水および糖溶液)の温度依存性について、絶対温度の逆数(x軸の内側は対応する温度で示している)と計測値の対数(y軸は常用対数)をプロットしたものを示す(第5図)。これは、相転移を求めるときに使われる手法であり、アレニウスプロットとして知られている(Nishiyama 1978)。変曲点がある場合には、その温度をはさんで相転移が起こることを意味している。同じ材料でも T_1 と T_2 では温度に対する応答が明らかに異なることがわかる。純水を試料にした場合、温度が高くなると水の分子運動も活発になり、 T_1 値はそれをよく反映しており正の相関を示している(Iwaya-Inoueら2004a, b)。一方、純水の T_2 は、 T_1 同様に温度と正の相関を示すが、糖溶液では T_2 は T_1 に比べ著しく短縮しているのが特徴的である。特に水の分子運動が活発な高温域では、 T_2 は糖の存在により水の分子運動が抑制されていることを表している。

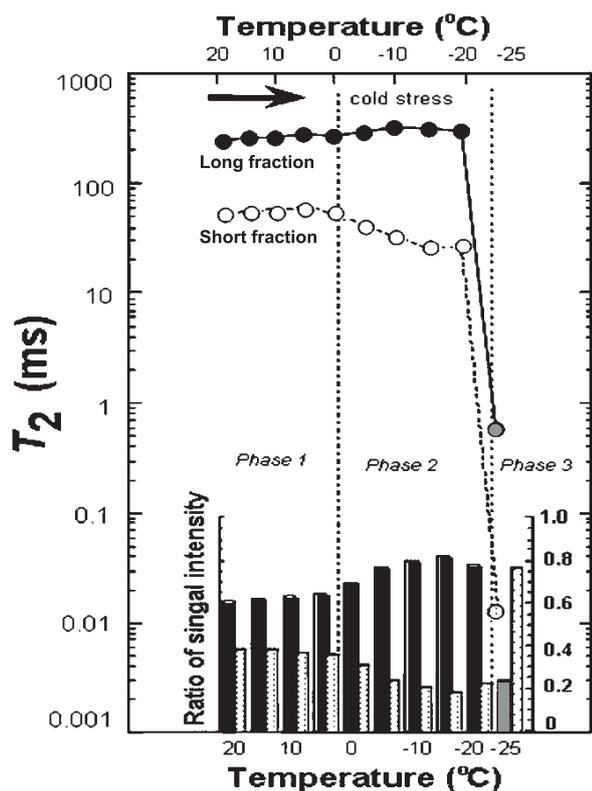
NMRプローブの温度を変えて測定する方法は、作物内の水分子の温度に対するリアルタイムの情報を提供するだけでなく、同じ試料を追跡調査できるという利点がある。本分光計は、温度可変装置を搭載しているためプローブの温度を-70℃から180℃まで変えることができる。室温以下の温度での計測にはメタルドゥワとよばれる液体窒素ボンベのドゥワアダプターをプローブヒーターに接続して温度調節する。なお、凍結温度から室温に戻す場合にはプローブや接続部位温度が十分に平衡状態になったことを確認す



第5図 溶液系の T_1 と T_2 の温度依存性のアレニウスプロット (Iwaya-Inoueら2004a)。

A. T_1 ; B. T_2 .

○, 純水; ●, 0.1M ショ糖; ▲, 0.1M マルトース。



第6図 ペレニアルライグラスの葉身の T_2 の温度依存性のアレニウスプロット (Iwaya-Inoue ら 2004c).

●, 長い成分値; ○, 短い成分値; ■, 長い成分の割合; □, 短い成分の割合を示す。

る必要がある。第6図は、ペレニアルライグラス (*Lolium perenne* L. cv. フレンド) の葉身の低温応答を調べたものである。この飼料用作物は草地の放牧や土壌保全を目的に栽培され、冷涼な気候に適した多年生草本である。現在、温暖化に伴う牧草の栽培可能な南限地域は北上することが予測されており (Sasaki ら 2001), 栽培地拡大の可能性を探るために地上部と地下部の極限温度耐性を調べた。試料には、播種後3週間戸外で栽培したポットを 15°C のグロースチャンバーに移し、日長 12 h/12 h でさらに3週間栽培した牧草の葉身と根を対象にした。低温ストレス (20°C から最低温度 -25°C まで), 高温ストレス (20°C から最高温度 50°C まで) に対する葉身と根の T_1 および T_2 を測定した。この図は葉身の低温ストレスに対する T_2 の変化をアレニウスプロットで示している。観測開始時の 20°C では、 T_2 値は 800 ms を示したことから第4図で示したように液胞に由来する自由水成分、初期値が 40 ms の値から始まる短い成分は細胞質に由来する結合水であることを意味している。20~0°C までの冷却過程においては、著しい変化は見られなかったが (Phase 1), 0°C 以下では長い成分の T_2 値は漸増し、短い成分の T_2 値は減少した (Phase 2)。この現象はモヤシの低温ストレス応答と似た挙動を示した (Iwaya-Inoue ら 1993)。これら二成分は -25°C で 600 μ s と 10 μ s まで急激に短くなり、自由水成分は消失したことを示して

いる (Phase 3)。また、図中の下の棒グラフは長い T_2 成分と短い T_2 成分の割合を示している (右の y 軸)。-20°C までの T_2 値は CPMG 法で測定しており、自由水成分の割合が徐々に増えていることがわかる。-25°C の測定は、ソリッドエコー法で求めたもので、1 ms 以下を示した結合水成分の割合を示している。-25°C で T_2 の急激な短縮がみられた組織のイオン漏出度は 100% であり、また TTC 還元の結果からも死組織であることが確認された。細胞外凍結をする組織では融解後には細胞間隙や細胞壁の水は細胞内に戻り障害はみられないことから、ペレニアルライグラスの葉身でみられた -25°C における T_2 値の短縮は、細胞内凍結が起こっていることを示した。即ち、 T_2 によって得られた相転移点 (-25°C) は、自由水の消失したことを意味し、葉身の過冷却が破れた温度から低温耐性を知ることができる。

これに対し、根では -10°C で T_2 値の両成分とも約 1 ms まで低下し、このときに組織が死んだことを確認した (Iwaya-Inoue ら 2004c)。このことから、この多年生牧草の葉身は過冷却により凍結を回避しており、急激な外気温の変化を受けやすい地上部は地下部よりも 15°C ほど過冷却能力が高いことが明らかになった。一方、20°C から 50°C までの昇温過程では、葉身の T_1 値は 40°C まで徐々に短くなり、さらに温度が上がると著しく短縮したのに対し、根の T_1 値はリニアに短くなった。熱ストレスを受けた両器官のイオン漏出度は低かったことから、この温度の範囲内では、生体膜は特に著しい損傷を受けておらず、高温耐性をもつ可能性が示された。以上のことから、リアルタイムの温度依存性のアレニウスプロットにおける T_2 の解析は過冷却能力を調べるのに適しており、 T_1 の解析は冷温障害や高温障害など自由水が比較的多い状態での解析に適していることが明らかとなった。

4. おわりに

植物組織に普遍的に存在する水素原子核の温度に対する緩和時間の変化により、各作物における器官の特徴的な水分子の挙動を紹介した。籾や葉身の温度に対する水の挙動から、含水率の高い組織では T_1 値が有効であり、一方、含水率の低いものや過冷却能力の検証には T_2 が適用できることを示している。作物の水分子のふるまいに興味をもっていただく契機となれば幸いである。

引用文献

- Bryant, R.G. 1996. The dynamics of water? protein interactions. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 25: 29-53.
- Damadian, R. 1971. Tumor detection by nuclear magnetic resonance. *Science* 171: 1151-1153.
- 船場貢・藤沢徹・道添英昭・樋口正・西村勝久・泉省吾 2000. 長崎県下の水稲作期策定に関する研究. 第5報 壱岐地域における基白粒の発生. *日作九州支報* 66: 38-40.
- Funaba, M., Y. Ishibashi, A.H. Molla, K. Iwanami and M. Iwaya-Inoue

2006. Influence of low /high temperature on water status on developing and maturing rice grains. *Plant Prod. Sci.* 9 : 347–354.
- Glidewell, S.M. 2006. NMR imaging of developing barley grains. *J. Cereal Sci.* 43 : 70–78.
- Horigane, A.K., W.M.H.G. Engelaar, S. Maruyama, M. Yoshida, A. Okubo and T. Nagata 2001. Visualisation of moisture distribution during development of rice caryopses (*Oryza sativa* L.) by Nuclear Magnetic Resonance Microimaging. *J. Cereal Sci.* 33 : 105–114.
- Horigane, A.K., H. Takahashi, S. Maruyama, K. Ohtsubo and M. Yoshida 2006. Water penetration into rice grains during soaking observed by gradient echo magnetic resonance imaging. *J. Cereal Sci.* 44 : 307–316.
- Ishida, N., M. Koizumi and H. Kano 2000. The NMR Microscope : a unique and promising tool for plant science. *Ann Bot.* 86 : 259–278.
- Iwaya-Inoue, M., K. Yoshimura, H. Yamasaki and S. Kaku 1993. Characteristic changes in relaxation times of water protons in *Vigna radiata* seedlings exposed to temperature stress. *Plant Cell Physiol.* 34 : 705–711.
- Iwaya-Inoue, M., R. Matsui, N. Sultana, K. Saitou, K. Sakaguchi and M. Fukuyama 2004a. ¹H-NMR method enables early identification of degeneration in the quality of sweet potato tubers. *J. Agron. Crop Sci.* 190 : 65–72.
- Iwaya-Inoue, M., H. Nonami and M. Fukuyama 2004 b. Phase changes in Arrhenius plots on NMR relaxation times for various organs of crop plants exposed to temperature stresses. *Environ. Cont. Biol.* 42 : 5–19.
- Iwaya-Inoue, M., R. Matsui and M. Fukuyama 2004c. Cold-or heat-tolerance of leaves and roots in perennial ryegrass determined by ¹H-NMR. *Plant Prod. Sci.* 7 : 118–128.
- Kano, H., N. Ishida, T. Kobayashi and M. Koizumi 1990. ¹H-NMR imaging analysis of changes of free-water distribution in barley and soybean seeds during maturation. *Jpn. J. Crop Sci.* 59 : 503–509.
- Leprince, O, and W.C. Vertucci 1995. A calorimetric study of the glass transition behaviors in axes of bean seeds with relevance to storage stability. *Plant Physiol.* 109 : 1471–1481.
- Mishima, O. and H.E. Stanley 1998. Relationship between liquid, supercooled and glassy water. *Nature* 396 : 329.
- 森田敏 2008. イネの高温登熟障害の克服に向けて. *Jpn. J. Crop Sci.* 77 : 1–12.
- 村田吉男 1964. わが国の水稲収量の地域性に及ぼす日射と温度の影響について. *日作紀* 33 : 59–63.
- 長戸一雄・江幡守衛 1960. 登熟期の気温が水稲の稔実に及ぼす影響. *日作紀* 28 : 275–277.
- 日本作物学会 2003. 日本作物学会創立75周年記念総説集「温故知新」
- Nishiyama, I. 1978. Further evidence for the break on the Arrhenius plot of germination activity in rice seeds. *Jpn. J. Crop Sci.* 47 : 557–562.
- Sasaki, H., M. Fukuyama and T. Onoue 2001. Effects of increasing CO₂ concentration and leaf temperature on the photosynthesis of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Bull. Natl. Grassl. Res. Inst.* 60 : 1–8.
- Weishaupt, D. 2003. How does MRI work? : An Introduction to the Physics and Function of Magnetic Resonance Imaging. 3rd Edition. Springer : Nw York. 1–138.
- Williams, R.J. and A.C. Leopold 1989. The glassy state in corn embryos. *Plant Physiol.* 89 : 977–98.