

機関番号：32657
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20612008
 研究課題名 (和文) 放射光マイクロビームを用いる重金属蓄積植物のインビボ蛍光 X 線イメージング
 研究課題名 (英文) in vivo XRF imaging of hyper-accumulating plants by utilizing synchrotron radiation X-ray microbeam
 研究代表者
 保倉 明子 (HOKURA AKIKO)
 東京電機大学・工学部・准教授
 研究者番号：20343569

研究成果の概要 (和文)：放射光 X 線マイクロビームを適用し、植物組織・細胞に対する *in vivo* 分析手法の開発を行った。植物の組織構造を保持し、できるだけ生きたままに近い状態を保って分析する手法を開発し、環境浄化技術で着目されているヒ素やカドミウムを蓄積する植物へ応用した。世界に先駆けて植物試料の高エネルギー XRF イメージングを実現し、Cd の K 線が励起できる高エネルギーマイクロビームの優位性を最大限に生かし、細胞レベルにおける Cd の蓄積部位を明らかにすることができた。

研究成果の概要 (英文)：Monochromatic high-energy X-rays (30-37 keV) focused into a microbeam (*ca.* 1 μm) with a Kirkpatrick-Baez mirror allows us for the first time to reveal the striking sub-cellular distribution and the chemical form of cadmium in the cadmium accumulating plant by detecting the Cd K α line. Micro X-ray fluorescence analysis (μ -XRF) and micro X-ray absorption near-edge structure analysis (μ -XANES) were used for the nondestructive analysis of the Cd distribution and chemical form of Cd at a cellular level in the plant in order to investigate the Cd accumulation mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分析化学，環境化学，無機化学

科研費の分科・細目：量子ビーム科学

キーワード：ファイトレメディエーション，放射光，X 線マイクロビーム，重金属蓄積植物，蛍光 X 線，X 線吸収微細構造解析

1. 研究開始当初の背景

最近、重金属蓄積植物を用いて重金属汚染土壌や汚染水質の浄化を行うファイトレメディエーションが、環境にやさしい環境修復技術として注目されている。植物に重金属を効率よく蓄積させることが、この技術を実用化する鍵となる。これらの植物は、毒性の高い重金属元素が数千 ppm という高濃度で体内に存在しても正常に生育できる。植物がど

のように無毒化しているのか、その機構は非常に興味深い。

モエジマシダをヒ素汚染土壌で生育すると、22000 $\mu\text{g g}^{-1}$ (乾燥重量換算) という非常に高濃度のヒ素を蓄積することが 2001 年の *Nature* で報告された。ヒ素は葉 (羽片) の辺縁部に蓄積されることが SEM-EDS の結果から示唆されていたが、その分布は不明瞭であった。申請者は、放射光 X 線マイクロビーム

を用いたXRFイメージングにより、辺縁部の胞子嚢基部において、ヒ素が高濃度に蓄積されることを初めて明らかにした。その後、海外の研究グループからも放射光マイクロビームを利用したモエジマシダの分析例が報告されるようになってきた。

アブラナ科のハクサンハタザオはCdとZnを高濃度に蓄積する。CdのK線を励起するためには高エネルギーX線が必要であるため、従来の第二世代放射光施設では分析ができなかった。一方、欧州の放射光施設ESRFのID-21ビームラインでは、CdL線による植物のXRFイメージングが2006年に行われたが、測定は真空雰囲気下であり、試料は凍結乾燥処理されたものであった。

このように、植物における有害元素の蓄積部位を組織・細胞レベルで分析するために、放射光マイクロビームを光源とする蛍光X線イメージングは優れているものの、試料の保持法など*in vivo*で測定する手法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

申請者は、放射光X線マイクロビームを植物試料の分析へ適用し、重金属蓄積植物における重金属蓄積機構の解明を目指している。本研究では、主としてSPring-8のBL37XUにおいて開発された1 μm の高エネルギーマイクロビームをXRFの光源として世界に先駆けて活用する。日本で開発された放射光X線マイクロビームを植物試料の*in vivo*革新的測定システムとして構築し利用するものである。

まず、組織・細胞レベルでの有害元素の分布を明らかにするための*in vivo*蛍光X線イメージング法を開発し、ヒ素やカドミウムを蓄積する重金属集積植物（ヒ素を蓄積するモエジマシダ、カドミウムを蓄積するタバコやハクサンハタザオ）へ適用する。それぞれの植物における、蓄積機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 放射光マイクロビームを用いた*in vivo*蛍光X線イメージング法の開発

(i) *in vivo*測定に適した試料調製法の検討

植物の細胞は約90%が水分であるため、測定中において乾燥による試料の収縮が問題となる。そこで試料調製法としては、できるだけ生きた状態を保持して測定をするため、凍結マイクロトームを用いる試料の薄片化を検討した。またシダの前葉体やプロトプラストなど植物細胞試料については、寒天包埋による調製法を検討した。

(ii) 測定雰囲気および試料保持法の検討

SPring-8のBL37XUで $\mu\text{-XRF}$ 二次元イメージングを行った。K-Bミラー集光素子を用い

て形成された1マイクロサイズのマイクロビームを用いて、モエジマシダの $\mu\text{-XRF}$ 二次元イメージングを行った。(i)で検討した凍結切片試料の測定には、試料冷却が不可欠である。試料冷却システムとして、低温窒素ガス吹き付け方式の試料低温装置の導入を行った。

(2) ヒ素やカドミウムを蓄積した植物の*in vivo*蛍光X線イメージング

(i) ヒ素蓄積植物

モエジマシダ、オオバノイノモトソウ、ヘビノネゴザの前葉体に対して、ヒ素を添加し、蓄積部位を*in vivo*で観察した。

(ii) カドミウム蓄積植物

ハクサンハタザオ、タバコ、イネにカドミウムを添加して栽培し、それぞれ分析に供した。

(iii) 鉛蓄積植物

ヘビノネゴザおよびホンモンジゴケ等に鉛を添加し、分析に供した。

4. 研究成果

(1) ハクサンハタザオにおけるCdの蓄積

ある種の植物は、水や養分を吸収する際に汚染土壌中の重金属も体内に取り込み、高濃度に蓄積することが知られている。本研究では、放射光マイクロビームを用いた蛍光X線分析とX線吸収微細構造(XAFS)解析により、植物細胞レベルで有害元素の蓄積部位とその化学形態を明らかにし、その蓄積機構を解明することを目的とした。アブラナ科の植物ハクサンハタザオにおけるカドミウムの蓄積機構について、興味ある知見が得られた。

カドミウムを含む培養液で栽培したハクサンハタザオの葉を試料とし、約1 μm 角の放射光X線マイクロビームを使った蛍光X線二次元イメージングを行った。X線のエネルギーはCdのK線が効率よく励起できる30-37 keVとした。

その結果、カドミウムは葉の表面にある毛状突起細胞(トライコーム)において高濃度に蓄積されていることがわかった。1細胞からなるトライコームの中でも特に分岐下部において蓄積しており、この蓄積部位には亜鉛と正の相関が見られたことから、カドミウムの蓄積機構には同族元素である亜鉛との関連が示唆された。

さらにX線マイクロビームを用いてカドミウムのK吸収端のXANES測定を行い、トライコーム細胞内に蓄積されたカドミウムの化学形態を調べたところ、酸素あるいは窒素と結合した化学種であることがわかった。このように高エネルギー放射光X線マイクロビームを利用することで、細胞内におけるカドミウムの分布と化学形態を初めて明らかにすることに成功した。従来、植物内におけるカドミウムの無毒化機構として、カドミウムはシステインやファイトケラチンなど

のチオール基と結合した化学種で存在するといわれていたが、カドミウムの高集積能を有するハクサンハタザオのトライコームにおいては、このような化学種ではなく酸素あるいは窒素と結合した化学種であるという知見は非常に興味深い。

(2) Cdを添加して栽培したタバコ植物

タバコはCdに耐性を持つ植物であり、比較的高濃度のCdを蓄積する。体内に取り込まれたCdは、グルタチオン (γ -Glu-Cys-Gly) やファイトケラチン ($(\gamma$ -Glu-Cys) $_n$ -Gly) のような化合物のシステインと結合して無毒化されるといわれている。また同じタバコ (*Nicotiana*) 属である *N. tabacum* と *N. rustica* は、Cdの蓄積する部位が異なることが報告されていて、前者は主に葉と根に蓄積するのに対し、後者は根に蓄積する。そこで2種類のタバコ植物種におけるCdの蓄積機構を明らかにすることを目的として実験を行った。

約1か月間栽培したタバコ (*N. tabacum* L. cv. Xanthi と *N. rustica*) を 100 μ M Cd を含む培養液で、約2~4週間栽培した。根、茎、葉の部位別に分けて凍結乾燥後、錠剤試料を作成し、Cd K 吸収端の XAFS 測定を行った。また試料の根を切り出し、先端付近と基部について凍結ミクロトームで約30 μ m の切片を作成した。試料の凍結状態を維持して、高エネルギー μ -XRF イメージングと μ -XANES を行った。

2種類のタバコの根、茎、葉の XAFS スペクトルは、参照物質であるファイトケラチン-Cd 又はメタロチオネインの Cd とよく似ており、S と結合していることがわかった。さらに根の先端では Cd が一様に分布していたが、地上部に近い部位において、*N. tabacum* では表皮と内皮に、*N. rustica* では内皮に特に Cd の蓄積が見られた。また Cd が高濃度に蓄積している部位 (内皮と表皮) では、S と結合している Cd の割合が高かった。一方、種による Cd の化学形態の違いは見られなかった。以上のように、同じタバコ属である *N. tabacum* と *N. rustica* では、Cd の化学形態には違いが見られず、むしろ根での Cd の蓄積部位が異なったことから、地上部への Cd の蓄積のしやすさは、根での Cd の取り込みや移行機構に起因することが示唆された。

(3) イネにおけるCdの蓄積およびコケにおけるPbとCuの蓄積

イネやコケ植物における重金属の蓄積機構を明らかにすることを目的として、研究を進めた。その結果、Cd を添加して栽培した二品種のイネ (日本晴、密陽 23 号) について、茎における Cd 及び植物必須元素の蓄積部位と、各器官 (根、茎、葉) に蓄積された Cd の化学形態が明らかになった。

一方、センボンゴケ科イワマセンボンゴケ属のホンモンジゴケ (*Scopelophila cataractae*) を野外から採取し、10 mM PbCl₂水溶液を添加して20分間振とうした試料について放射光マイクロビーム蛍光X線 (μ -XRF) イメージング (ビームサイズ 3.5 μ m \times 5.5 μ m) を行い、1-2 mm という微小なコケの葉における Pb と Cu の元素分布を初めて *in vivo* で可視化することができた。添加した Pb と野外で取り込まれた Cu は、いずれも主として細胞壁に蓄積されており、中肋の厚壁細胞 (ステライドセル) では特に Cu が高濃度に蓄積されていることがわかった。また、0.01 M 塩酸水溶液と茎葉体を20分間振とうしたところ、大部分の Cu は水溶液に抽出されるが、中肋部に蓄積した Cu は明瞭に残っていることが示された。また茎葉体の X線吸収微細構造 (XAFS) の *in vivo* 測定を蛍光法で行ったところ、ホンモンジゴケ体内の Cu は酢酸銅(II)と、Pb(II) はステアリン酸鉛と似た化学形態であり、Cu と Pb はいずれもカルボキシル基の酸素と結合していることが示された。以上により、Pb と Cu は細胞壁に含まれる酸性糖由来のカルボキシル基と結合して蓄積されていると考えられる。

以上のように、非破壊で2次元多元素同時分析が可能な μ -XRF イメージングと XAFS 解析により、種々の植物における元素の分布と化学形態に関する多くの知見が得られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① 吉井雄一, 保倉明子, 阿部知子, 井藤賀操, 榊原均, 寺田靖子, 中井泉: 放射光マイクロビーム蛍光X線分析とXAFS解析によるホンモンジゴケ (*Scopelophila cataractae*) 体内における銅と鉛の蓄積に関する研究, X線分析の進歩, 査読有, **42** (2011) 347-358.
- ② N. Yamaguchi, S. Mori, K. Baba, S. Kaburagi-Yada, T. Arao, N. Kitajima, A. Hokura, Y. Terada, Cadmium distribution in the root tissues of solanaceous plants with contrasting root-to-shoot Cd translocation efficiencies, *Environ. Exp. Bot.*, 査読有, **71(2)**, (2010) 198-206.
- ③ E. Harada, A. Hokura, S. Takada, K. Baba, Y. Terada, I. Nakai, K. Yazaki: Characterization of Cadmium Accumulation in Willow as a Woody Metal Accumulator Using Synchrotron Radiation-Based X-Ray Microanalyses, *Plant and Cell Physiology*, 査読有, **51(5)**, (2010) 848-853.
- ④ 山岡和希子, 高田沙織, 竹久妃奈子, 林

- 依子, 保倉明子, 寺田靖子, 阿部知子, 中井 泉: 放射光マイクロビーム蛍光X線分析とX線吸収微細構造解析を用いたイネのカドミウムの蓄積機構に関する研究, 分析化学, 査読有, **59(6)**, (2010) 463-475.
- ⑤ 保倉明子, 北島信行, 寺田靖子, 中井 泉: 放射光X線マイクロビームによる重金属超蓄積植物の蓄積メカニズムの研究, 放射光, 査読無, **23(2)**, (2010) 69-80.
- ⑥ 保倉明子: 高エネルギー放射光X線マイクロビームを用いる植物の重金属元素イメージング, ぶんせき, 査読無, **2009(9)**, (2009) 476-482.
- ⑦ 保倉明子: 重金属蓄積植物の放射光マイクロビーム蛍光X線分析, 化学と工業, 査読無, **62(11)**, (2009) 1185-1187.
- ⑧ T. Kashiwabara, S. Mitsuo, A. Hokura, N. Kitajima, T. Abe, I. Nakai: In vivo micro X-ray analysis utilizing synchrotron radiation of the gametophytes of three arsenic accumulating ferns, *Pteris vittata* L., *Pteris cretica* L. and *Athyrium yokoscense*, in different growth stages, *Metallomics*, 査読有, **2** (2010) 261-270.
- ⑨ 三尾咲紀子, 柏原輝彦, 保倉明子, 北島信行, 後藤文之, 吉原利一, 阿部知子, 中井泉: 放射光マイクロビーム蛍光X線分析を用いたシダ植物ヘビノネゴザのPbとCuの蓄積機構に関する研究, 査読有, **40** (2009) 183-193.
- ⑩ N. Tanikawa, T. Kashiwabara, A. Hokura, T. Abe, M. Shibata, M. Nakayama: A Peculiar Yellow Flower Coloration of Camellia Using Aluminum-Flavonoid Interaction, *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 査読有, **77** (2008) 402-407.
- ⑪ N. Fukuda, A. Hokura, N. Kitajima, Y. Terada, H. Saito, T. Abe, I. Nakai: Micro X-ray fluorescence imaging and micro X-ray absorption spectroscopy of cadmium hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri* ssp. *gemmifera*, using high-energy synchrotron radiation, *J. Anal. At. Spectrom.*, 査読有, **23** (2008) 1068-1075.
- [学会発表] (計 43 件)
- ① 保倉明子, 原田紗希, 平野智也, 阿部知子, 原田英美子, 矢崎一史, 佐野俊夫, 中井 泉, 寺田靖子, タバコ培養細胞BY-2の高エネルギー μ -XRF分析, 第24回日本放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム, 2011年1月9日, つくば国際会議場.
- ② A. Hokura, Y. Yoshii, I. Nakai, T. Abe, M. Itouga, H. Sakakibara: Study on Lead and Copper Storage Mechanism of Copper Moss, *Scopelophila cataractae*, by Micro-XRF Imaging and XAFS Analyses Using Synchrotron Radiation, The 5th International Conference on Ion Exchange, ICIE 2010, 2010年7月20日, オーストラリア.
- ③ 保倉明子: 放射光マイクロビームを用いた植物の蛍光X線イメージングについて, 第47回アイソトープ・放射線研究発表会 (依頼講演・パネリスト), 2010年7月8日, 日本科学未来館.
- ④ A. Hokura, S. Takada, N. Kitajima, Y. Terada, T. Abe, and I. Nakai: Study on Cd storage and detoxification mechanism of tobacco by micro-XRF imaging and XAFS analyses using high-energy synchrotron radiation, European Conference on X-ray Spectrometry 2011, 2010年6月24日, ポルトガル.
- ⑤ 保倉明子: 放射光マイクロビーム蛍光X線分析を用いてハクサンハタザオに蓄積されたカドミウムの分布と化学形態を解明する, 第147回 生存圏シンポジウム, 2010年1月22日, 京都大学.
- ⑥ 保倉明子: 微小部X線分析法のファイトレメディエーション用植物への応用, 第45回X線分析討論会, 2009年11月5日, 大阪市立大学.
- ⑦ 保倉明子: 重金属集積植物の放射光マイクロ蛍光X線分析, 日本化学会 第3回関東支部大会, 依頼講演, 2009年9月5日, 早稲田大学.
- ⑧ A. Hokura, S. Mitsuo, N. Kitajima, F. Goto, T. Yoshihara, T. Abe, Y. Terada, I. Nakai: Elemental Mapping and Chemical Speciation of Cadmium in Metal-Hypertolerant Fern, *Athyrium yokoscense*, by X-ray Spectrometry utilizing A Synchrotron Radiation Source, 2009 International Symposium on Metallomics, 2009年6月10日, 米国.
- ⑨ 保倉明子: 放射光X線マイクロビームを利用した重金属集積植物におけるカドミウムとヒ素の蓄積機構の解明, 日本化学会第89春季年会・第23回若い世代の特別講演会, 2009年3月29日, 日本大学.
- ⑩ 保倉明子, 中井 泉: 放射光蛍光X線分析を用いた重金属蓄積植物におけるカドミウム蓄積機構の解明, 日本植物生理学会第50回年会・シンポジウム「植物内の金属を観る—放射光蛍光X線分析法の進歩—」依頼講演, 2009年3月21日, 名古屋大学.
- ⑪ A. HOKURA, N. FUKUDA, N. KITAJIMA, Y. TERADA, T. ABE, I. NAKAI: Micro-XRF imaging and micro-XANES analysis of cadmium hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri* ssp. *gemmifera*, using high-energy synchrotron radiation,

European Conference on X-ray Spectrometry,
2008年6月18日, クロアチア.

〔図書〕(計1件)

①保倉明子, 丸善(株), 環境分析ガイドブック, 分担執筆 5.10.1 植物, 2011, 305-309.

〔その他〕

ホームページ等

東京電機大学工学部環境化学科

http://www.s.dendai.ac.jp/?page_id=17

早稲田大学高等研究所

http://www.waseda.jp/wias/researchers/monthly/spot_a_hokura.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保倉 明子 (HOKURA AKIKO)

東京電機大学・工学部・准教授

研究者番号: 20343569

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし