

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21228004

研究課題名(和文) 二次イオン質量分析法による植物細胞における生体分子三次元分布の可視化

研究課題名(英文) Direct visualization of the in vivo distribution of chemical components in plant cells by TOF-SIMS

研究代表者

福島 和彦 (Fukushima, Kazuhiko)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：80222256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 80,700,000円、(間接経費) 24,210,000円

研究成果の概要(和文)：急速凍結した試料の表面切削、cryo-TOF-SIMS分析、cryo-SEM観察を連続的に行うことの出来る複合的な分析システム(cryo-TOF-SIMS/SEM)を開発した。表面切削と分析を繰り返して行うことにより、三次元的な分析が可能である。本手法により、これまで生きている植物内での詳細な分布状況が不明であった各種水溶性成分について、三次元分布の可視化を顕微領域で行うことが可能となった。

研究成果の概要(英文)：A complex analytical system (cryo-TOF-SIMS/SEM) was developed to achieve a series of experiment (surface preparation, cryo-TOF-SIMS, and cryo-SEM) for quick-frozen samples. A repetition of the surface preparation and measurements make three-dimensional analysis possible. The method provides a microscopic visualization of 3D distribution for water-soluble components in living plants.

研究分野：生物系・農学・森林学・木質科学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：組織構造・材形成 リグニン 抽出成分・微量成分 保存・木質文化

1. 研究開始当初の背景

飛行時間型二次イオン質量分析 (TOF-SIMS) とは、一次イオンを試料表面に照射し、そこから派生する二次イオンを解析することにより、試料表面の分子レベルの情報を顕微領域で入手する技法である。従来、半導体の評価技術として発展を遂げてきたが、高分子材料などの有機物にも適用できることが示され、近年、生物学の領域においても用いられるようになった。代表者は、10年ほど前から本技法を国内においていち早く導入し、植物細胞壁の分析に適用することを試み、これまでに細胞壁構成高分子であるリグニン、多糖、および抽出成分 (低分子化合物) の分子イオンの同定とマッピングを報告した。また本手法によって、約 1300 年前に伐採された法隆寺ヒノキ建築古材の心材と辺材の識別に成功し、法隆寺古材の伐採年を推定するなど、幅広い研究を行った。

TOF-SIMS はケミカルマッピングにおいて非常に高い感度と面分解能を有し、生物試料においても新たな知見を提供可能な優れた装置である。しかしながら真空下での質量分析という特性上、試料は乾燥状態であることが前提となっており、生体内に存在する様々な水溶性成分は、乾燥過程において不可逆的に移動してしまうため、「生きている状態」での分布評価を行うことは困難であった。

2. 研究の目的

乾燥試料において、十分な分析能力を示してきた TOF-SIMS 機器を、急速凍結した生体細胞でも直接測定できるように、装置の改造をおこなう。これにより、生きた細胞におけるターゲット分子の位置と存在量を、化学的な処理を施すことなく可視化する。

3. 研究の方法

急速凍結した試料でも測定が可能な前処理システムを開発し、現有設備の TOF-SIMS (TRIFT III) 機器に接続して、実際に稼働するようなコンプレックスシステムを構築することが主軸となる。まず、急速凍結した試料を迅速に TOF-SIMS 測定するために、低温かつ窒素雰囲気下で測定室に導入する連結チャンバーの構築が必要である。チャンバー内の圧力や温度の調節など、機器ハード面での設計をおこなう。次に、凍結試料測定に最適な条件を、実際に急速凍結した植物試料を用いて検討する。このとき、植物細胞壁中のすでに同定した化学成分 (リグニン、多糖、抽出成分等) の分子イオンを用いて測定条件を評価する。また、一次イオンビームの選択・調整をおこない、凍結細胞の高解像度測定の達成を目指す。さらに、試料表面を高解像度で観察できる電子顕微鏡の導入と、測定する凍結試料の平滑面作製が可能なスライ

ディングマイクローム内蔵グローブボックス等の開発をおこない、急速凍結した生体試料に存在する特定分子の三次元ケミカルマッピング構築を試みた。

4. 研究成果

以下の要素技術を開発し、凍結試料表面の汚染、昇華を防止しながら表面切削、TOF-SIMS 分析、SEM 観察を繰り返して実行できる複合分析システムを開発した。

- ①グローブボックス内での急速凍結試料の切削 (マイナス 20°C、窒素雰囲気下)
- ②表面仕上げ凍結試料を極低温真空シャトルを用いて TOF-SIMS に搬送
- ③クライオ TOF-SIMS 分析 (ステージ温度はマイナス 120 度以下)
- ④TOF-SIMS 測定済試料を極低温真空シャトルを用いてクライオ SEM に搬送
- ⑤エッチング (昇華) 後、クライオ SEM で試料表面微細構造観察
- ⑥SEM 観察済試料を極低温真空シャトルを用いてグローブボックスに搬送

この①から⑥までの工程をさらに繰り返すことで、新生切削面の TOF-SIMS データを連続的に入手し、三次元ケミカルマッピングを行うことが可能である。作製した分析システムの概観を図 1 に、複合的な測定・観察の概要を図 2 に示した。

図 3 は凍結イチョウ試料の樹皮から木部までの連続測定された cryo-TOF-SIMS イメージについて示した。左側は全イオン像を緑色で、スクロースおよびコニフェリンに由来する m/z 381 イオンを赤色でオーバーレイ表示したものである。右側は部分的な拡大図であるが、cryo-SEM 写真の上に m/z 381 イオンをオーバーレイしたものであり、より詳細な組織観察が可能である。

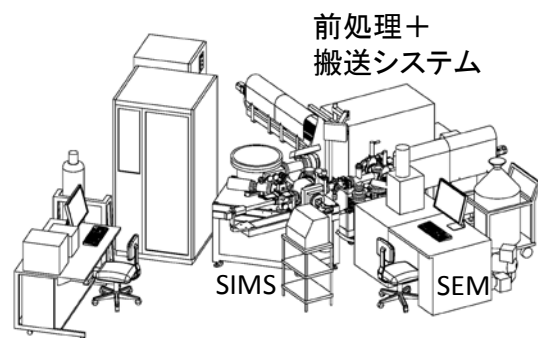


図 1 cryo-TOF-SIMS/SEM システム

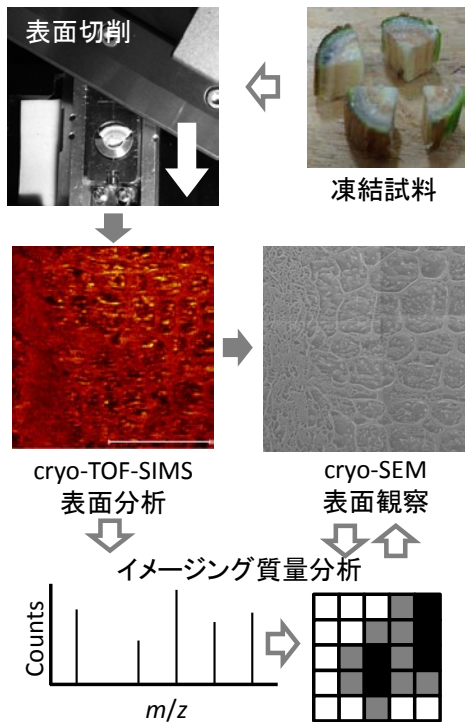


図2 凍結試料の複合的な分析・観察

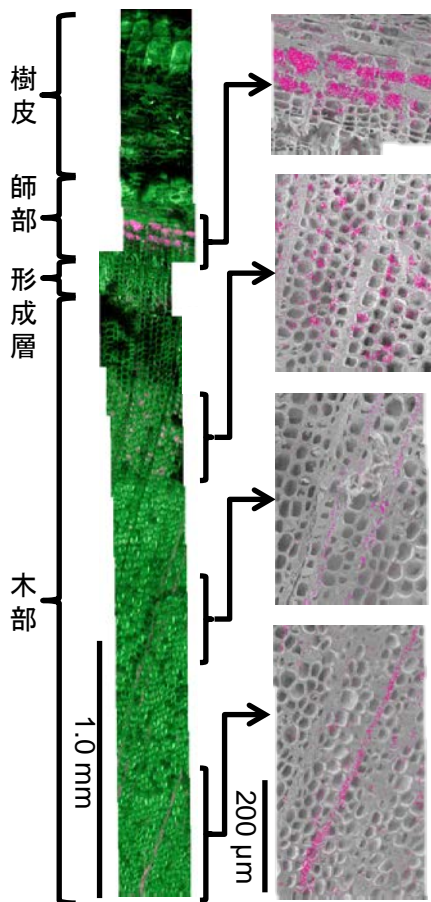


図3 凍結イチョウ試料の cryo-TOF-SIMS/SEM 分析によるコニフェリンおよびスクロースのマッピング

図4は凍結スギ試料の木部について、表面切削および cryo-TOF-SIMS 分析を繰り返して得られた 3D 分析の例である。全イオン像および心材成分フェルギノールの局在を可視化した。矢印は同一の細胞を示しており、軸方向においてフェルギノールの局在状態が異なっていることがわかる。以上のように、本システムを用いることで様々な植物生体分子に関して、凍結状態での 3D ケミカルマッピングが可能となった。

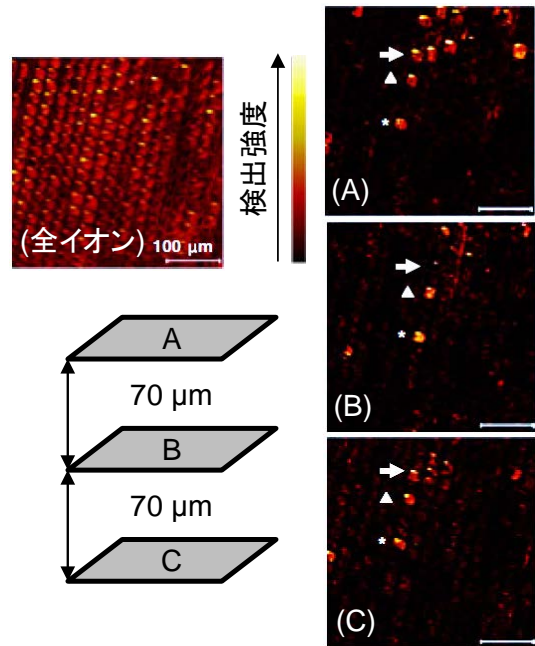


図4 凍結スギ試料中フェルギノールの 3D cryo-TOF-SIMS 分析

TOF-SIMS を用いた量的比較についても検討した。具体的には、植物細胞壁リグニンを構成するグアイアシル (G)、シリングル (S) の構成単位 (モル比) の TOF-SIMS による測定値が、実際の S/G モル比 (化学分析値) に非常に近い値になることを示し、TOF-SIMS 分析の有効性を示した (図5)。また、高分子であるリグニンがどのような機構で結合単位が解裂し単量体まで分解されるのかを同位体標識モデル化合物を用いて明らかにした。この技術により、化学的な処理なく、どのようなリグニン構造が細胞のどこに存在するかを一度に解析することが可能となった。リグニンを除去して多糖を利用する、バイオエタノール製造や紙パルプ生産などにおいても、本手法は、バイオマス変換過程の可視化法として活用されることが期待される。さらに、TOF-SIMS は、樹木抽出成分、製紙科学にも有効な分析法であることを明らかにした。

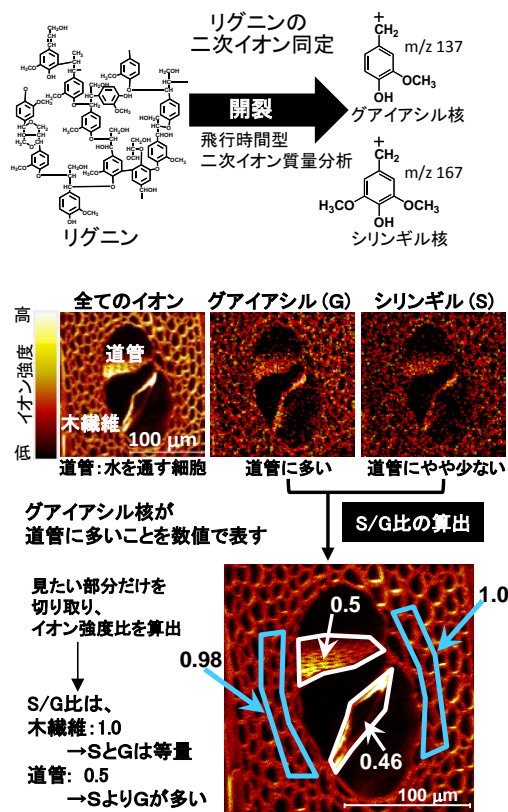


図5 顕微レベルで化学分析を可能にするTOF-SIMS分析

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

- [1] P. Zheng, D. Aoki, M. Yoshida, Y. Matsushita, T. Imai, K. Fukushima: Lignification of ray parenchyma cells in the xylem of *Pinus densiflora*. Part I: Microscopic investigation by POM, UV microscopy, and TOF-SIMS. *Holzforschung*, DOI:10.1515/hf-2013-0231 (2014). 査読有
- [2] K. Saito, Y. Watanabe, Y. Matsushita, T. Imai, T. Koike, Y. Sano, R. Funada, K. Fukazawa, K. Fukushima: Aluminum localization in the cell walls of the mature xylem of maple tree detected by elemental imaging using time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS). *Holzforschung*, **68**, 85-92 (2014). 査読有
- [3] T. Masumi, Y. Matsushita, D. Aoki, R. Takama, K. Saito, K. Kuroda, K. Fukushima: Adsorption behavior of poly(dimethyl-diallylammonium chloride) on pulp fiber studied by cryo time-of-flight secondary ion mass spectrometry and cryo-scanning electron

microscopy. *Appl. Surf. Sci.*, **289**, 155-159 (2014). 査読有

- [4] D. Aoki, K. Fukushima: Topochemical analysis of organic/inorganic components in frozen samples by cryo-TOF-SIMS/SEM system. *Cellulose Commun.*, **20**, 188-192 (2013). 査読無
- [5] K. Kuroda, T. Fujiwara, K. Hashida, T. Imai, M. Kushi, K. Saito, K. Fukushima: The accumulation pattern of ferruginol in the heartwood-forming *Cryptomeria japonica* xylem as determined by time-of-flight secondary ion mass spectrometry and quantity analysis. *Annals of Botany*, **113**, 1029-1036 (2014). 査読有
- [6] K. Saito, T. Mitsutani, Y. Matsushita, T. Imai, K. Fukushima: Distribution of Inorganic Elements in Heartwood and Sapwood of Hinoki Cypress Detected by TOF-SIMS. *Mokuzai Gakkaishi*, **59**, 353-360 (2013). 査読有
- [7] D. Aoki, K. Kuroda, Y. Hanaya, K. Saito, R. Takama, Y. Matsushita, K. Fukushima: Development of the Cryo-TOF-SIMS/SEM System and Application for Topochemical Analysis of Plant Biomolecules. *Mokuzai Gakkaishi*, **59**, 367-374 (2013). 査読有
- [8] K. Kuroda, T. Fujiwara, T. Imai, R. Takama, K. Sato, Y. Matsushita, K. Fukushima: The Cryo-TOF-SIMS/SEM System for analysis of the chemical distribution in freeze-fixed *Cryptomeria japonica* wood. *Surface and Interface Analysis*, **45**, 215-219 (2013). 査読有
- [9] S. Aoyagi, K. Kuroda, R. Takama, K. Fukushima, I. Kayano, S. Mochizuki, A. Yano: Evaluation of white radish sprouts growth influenced by magnetic fields using TOF-SIMS and MCR. *Surface and Interface Analysis*, **45**(1), 264-267 (2013). 査読有
- [10] Y. Matsushita, K. Ioka, K. Saito, R. Takama, D. Aoki, K. Fukushima: Fragmentation mechanism of the phenylcoumaran-type lignin model compound by ToF-SIMS. *Holzforschung*, **67**, 365-370 (2013). 査読有
- [11] K. Saito, K. Fukushima: Molecular Imaging of Chemical Compounds in Plant Tissue by Time-of-flight Secondary Ion mass Spectrometry. *生物物理学会誌*, **53**, 24-27 (2013). 査読無
- [12] Y. Matsushita, I-C. Jang, T. Imai, R. Takama, K. Saito, T. Masumi, S-C. Lee, K. Fukushima: Distribution of extracts

including 4,8-dihydroxy-5-methoxy-2-naphthaldehyde in *Diospyros kaki* analyzed by gas chromatography-mass spectrometry and time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Holzforschung*, **66**, 705-709 (2012). 査読有

- [13] K. Saito, Y. Watanabe, M. Shirakawa, Y. Matsushita, T. Imai, T. Koike, Y. Sano, R. Funada, K. Fukazawa, K. Fukushima: Direct mapping of morphological distribution of syringyl and guaiacyl lignin in the xylem of maple by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *The Plant Journal*, **69**(3), 542-552 (2012). 査読有
- [14] T. Kojima, S. Tsuji, M. Niwa, K. Saito, Y. Matsushita, K. Fukushima: Distribution analysis of triglyceride having repair effect on damaged human hair by TOF-SIMS. *International Journal of Polymer Analysis and characterization*, **17**(1), 21-28 (2012). 査読有
- [15] K. Saito, T. Kishimoto, Y. Matsushita, T. Imai, K. Fukushima: Application of TOF-SIMS to the direct determination of syringyl to guaiacyl (S/G) ratio of lignin. *Surface and Interface Analysis*, **43**(1-2), 281-284 (2011). 査読有
- [16] T. Kojima, H. Kitano, M. Niwa, K. Saito, Y. Matsushita, K. Fukushima: Imaging analysis of cosmetic ingredients interacted with human hair using TOF-SIMS. *Surface and Interface Analysis*, **43**(1-2), 562-565 (2011). 査読有
- [17] 齋藤香織, 福島和彦: 木質バイオマスの TOF-SIMS による解析. *Cellulose Communications*, **16**(4), 161-165 (2009). 査読無

[学会発表] (計 28 件)

- [1] P. Zheng, D. Aoki, Y. Matsushita, S. Yagami, K. Fukushima: Distribution of lignin in ray parenchyma cells from the sapwood to heartwood of *Pinus densiflora*. 第 64 回日本木材学会大会, 2014 年 3 月 13 日-15 日, 松山
- [2] 浅井龍太郎, 青木弾, 石黒正雄, 松下泰幸, 八神祐絵, 福島和彦: パルプ洗浄工程における洗浄剤の効果. 第 64 回日本木材学会大会, 2014 年 3 月 13-15 日, 松山
- [3] M. Uesugi, H. Naraoka, F. Kitajima, M. Ito, H. Yabuta, Y. Takano, H. Mita, K. Fukushima, D. Aoki, I. Ohnishi, Y. Kebukawa, T. Yada, Y. Karouji, Y. Ishibashi, T. Okada, M. Abe.: Current status and future plans of the

preliminary examination of the Category 3 particles of the Hayabusa-returned samples. Hayabusa 2013: Symposium of solar system materials, 2013 年 10 月 16-18 日, Sagami-hara, Japan

- [4] Y. Hanaya, D. Aoki, R. Takama, Y. Matsushita, K. Kuroda, K. Fukushima: Chemical mapping of tree biomolecules by the cryo-TOF-SIMS/SEM system. Annual Meeting of International Academy of Wood Science, October 17-21, 2013, Nanjing, China
- [5] P. Zheng, D. Aoki, M. Yoshida, Y. Matsushita, S. Yagami, T. Imai, K. Fukushima: Distribution of lignin in ray cells from the sapwood to heartwood of *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. 第 63 回日本木材学会大会, 2013 年 3 月 27-29 日, 盛岡
- [6] K. Fukushima, K. Saito, D. Aoki, Y. Matsushita, K. Kuroda: Direct mapping of morphological distribution of syringyl and guaiacyl lignin in the xylem of maple by TOF-SIMS and development of cryo-TOF-SIMS/SEM system. Carbo Summit 2013, March 17-21, 2013, Zauchensee
- [7] 今井貴規、TOF-SIMS: 樹木抽出成分生合成・分布の可視化、日本木材学会組織と材質研究会 2012 秋季シンポジウム、木材の形成機構解明に向けた新規イメージング技術、pp.5-8、2012 年 9 月 26 日、東京農工大学府中キャンパス、招待講演
- [8] 白河 学、黒田克史、渡辺陽子、渡辺 誠、小池孝良、齋藤香織、松下泰幸、今井貴規、高間瑠佳、福島和彦: CryoTOF-SIMS/SEM システムによる植物生体成分の分子マッピングの試み. 第 62 回日本木材学会大会, 2012 年 3 月 15-17 日, 北海道
- [9] 真清高志, 松下泰幸, 今井貴規, 福島和彦: TOF-SIMS を用いた抄紙薬品の吸着挙動解析-アルケニルコハク酸 (ASA) の吸着挙動について-. 第 62 回日本木材学会大会, 2012 年 3 月 15-17 日, 北海道
- [10] K. Fukushima, K. Saito and K. Kuroda, Application of TOF-SIMS to the direct determination of plant components and introduction of Cryo TOF-SIMS/SEM system, The 12th International Symposium on Biomimetic Materials Processing, Nagoya, Japan, 2012 年 1 月 24-27 日、招待講演
- [11] K. Ioka, Y. Matsushita, T. Imai, K. Saito, K. Fukushima: Analysis of lignin structure using ToF-SIMS. Twelfth International Symposium on Biomimetic Materials Processing, 2012 年 1 月 24 日, 2012, Nagoya, Japan
- [12] K. Fukushima, K. Saito, K. Kuroda,

Application of TOF-SIMS to the direct determination of plant components and introduction of Cryo TOF-SIMS/SEM complex apparatus, The International Symposium on SIMS and Related Techniques Based on Ion-Solid Interactions (SISS-13), Aichi, Japan, June 23 (2011) 招待講演

- [13] K. Fukushima, K. Saito, Direct determination of lignin using ToF-SIMS, The 11th International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-11), Nagoya, Japan, 2011年1月25-28日、招待講演
- [14] 福島和彦、齋藤香織、TOF-SIMSの心材形成研究への導入、日本木材学会組織と材質研究会 2010秋のシンポジウム、2010年9月14日、名古屋、招待講演
- [15] 黒田克史、Cryo-SEMとToF-SIMSでみた心材形成、日本木材学会組織と材質研究会 2010秋のシンポジウム、2010年9月14日、名古屋、招待講演
- [16] ToF-SIMSの生体試料への適用、福島和彦、アルバックファイ技術講演会、東京、2010年6月2日、招待講演
- [17] ToF-SIMSの生体試料への適用、福島和彦、アルバックファイ技術講演会、京都、2010年6月4日、招待講演
- [18] 福島和彦、木材科学の可能性を広げる基礎科学の重要性、一般社団法人日本木材学会設立記念シンポジウム、2010年5月15日、東京、招待講演
- [19] 齋藤香織、渡邊陽子、松下泰幸、今井貴規、船田良、深澤和三、福島和彦：TOF-SIMSを用いた広葉樹におけるリグニンS/G比分布の解析。第60回日本木材学会、宮崎、2010年3月17-19日
- [20] K. Fukushima, The chemical analysis of plant cell wall using ToF-SIMS, The 3rd Wood Science & Biotechnology Symposium, Chonnam National University, 2009年11月20日、招待講演
- [21] T. Kojima, H. Kitano, M. Niwa, K. Saito, Y. Matsushita, K. Fukushima: Imaging analysis of cosmetic ingredients interacted with human hair using TOF-SIMS. SIMS XVII, Tronto, 2009年9月14-18日
- [22] K. Saito, T. Kishimoto, Y. Matsushita, T. Imai, K. Fukushima: Application of TOF-SIMS to the direct determination of syringyl to guaiacyl (S/G) ratio of lignin. SIMS XVII, Tronto, 2009年9月14-18日
- [23] 齋藤香織、吉田正人、今井貴規、松下泰幸、福島和彦：TOF-SIMSによるヒノキ心材成分の分子マッピング。第59回日本木

材学会、松本、2009年3月15-17日

〔図書〕(計3件)

福島和彦

第2章 5. TOF-SIMSを用いたリグニンの構造解析と分布の可視化, In: “リグニン利用の最新動向”, シーエムシー出版, 40-47 (2013)

「グリーンバイオケミストリーの最前線」福島和彦、シーエムシー出版、pp. 51-61、2010年4月

「木質の形成 バイオマス科学への招待 第2版」、海青社、福島和彦ら編著、pp. 307-315, 317-320, 351-353, 550-552、2011年7月

〔その他〕

名古屋大学大学院生命農学研究科森林化学研究分野

<http://forestchem.sakura.ne.jp/>

名古屋大学

http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20120202_agr.pdf

(環境展望台)(独)国立環境研究所

<http://tenbou.nies.go.jp/news/jnews/detail.php?i=7536>

マイナビニュース

<http://news.mynavi.jp/news/2012/02/03/010/>

研究組織

(1)研究代表者

福島和彦 (Fukushima Kazuhiko)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号：80222256

(2)研究分担者

今井貴規 (Imai Takanori)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：20252281

松下泰幸 (Matsushita Yasuyuki)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：60335015

(3)連携研究者

黒田克史 (Kuroda Katsushi)

(2010年度～研究終了まで)

独立行政法人森林総合研究所・木材特性領域・主任研究員

研究者番号：90399379

青木弾 (Aoki Dan)

(2012年度～研究終了まで)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号：80595702