

機関番号：82105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658148

研究課題名(和文) 吸着金属をプローブとするSEM/EDX法による木材通水組織のリグニンの可視化

研究課題名(英文) Visualization of lignin distribution in the plant cell walls as concentration distribution of adsorbed metal ions by FE-SEM/EDX

研究代表者

久保 智史 (Kubo, Satoshi)

独立行政法人森林総合研究所・バイオマス化学研究領域・主任研究員

研究者番号：50399375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：樹木細胞壁のリグニンの分布を簡便かつ高解像度で明らかにするために、リグニンの重金属イオン吸着特性を利用し、吸着した重金属イオンの分布からリグニンの分布の可視化方法の開発を試みた。硝酸鉛(II)水溶液で処理した木材試料のFE-SEM/EDX分析では、細胞壁および細胞間層のリグニンの分布と比較できる鉛イオンの濃度分布像が得られた。しかしFE-SEM/EDXによる高解像度分析では、高加速電圧下での試料の分解が問題となった。SIMSによる吸着金属イオンの分析では、木材試料表面に低濃度で吸着した鉄イオンが明確に検出でき、鉄イオンが二次壁に比べて、複合細胞間層に高濃度で吸着している様子を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To reveal the distribution of lignin in cell wall with a high resolution and simple sample preparation methods, we tried to visualize the distribution of heavy metal ions adsorbed on lignin. In FE-SEM/EDX analysis of wood samples treated with lead (II) nitrate solution, we obtained the distribution image of lead ions that were comparable with the distribution of lignin in the cell walls. However, in a high resolution analysis by FE-SEM/EDX, decomposition of the sample under high acceleration voltage occurred. In the analysis of adsorbed metal ions by SIMS, iron ions adsorbed on cell wall at low concentration could be detected clearly as adsorbing in high concentration at compound middle lamella compared with the secondary wall.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：リグニン

### 1. 研究開始当初の背景

樹木内での水の移動を担い、樹木の生命維持に大きな役割を持つ管状要素(仮道管、導管)は、リグニンの細胞壁及び細胞間層への堆積(木化)を経て形成される。この疎水性高分子であるリグニンの木材組織上に於ける分布が、樹木の通水様式に関係すると考えている。このことを実証するには、細胞壁および細胞間層に存在するリグニンの詳細な分布を明らかにする必要がある。

### 2. 研究の目的

リグニンの分布の可視化法には、選択的な組織染色法、紫外顕微分光法、リグニンの臭素化と走査型電子顕微鏡(SEM)/エネルギー分散型X線分析装置(EDX)を組み合わせた方法等が知られている。本研究では、リグニンの重金属吸着特性に着目し、1)木材切片を金属塩溶液に浸漬、洗浄するだけの簡便な試料調製と、2)近年、技術革新が著しい高分解能SEM(FE-SEM)によるEDX分析を組み合わせた方法で、簡便且つ高解像度で木材組織上のリグニンの分布を可視化する方法を開発する。

### 3. 研究の方法

(1)立木凍結法で採取したスギから切り出した約5mm角の辺材を試料とした(以下、試料と記した)。試料は、エタノール/ベンゼンおよびアセトン抽出で脱脂した後、減圧乾燥(40℃)し、0.001-0.1Mの金属塩(鉄、銅、亜鉛、カドミウム、鉛の塩化物および硝酸塩)水溶液に1昼夜~3日間浸漬させた。各金属塩に浸漬させた試料は、イオン交換水で2日間以上洗浄した後、再度減圧乾燥(40℃)し、各分析に供した。

(2)金属塩水溶液で処理した試料は、マイクロトームで表面を平滑化し、金あるいはカーボン蒸着後にFE-SEM/EDX分析に供した。(FE-SEM:日立社製S4800 FE-SEM、EDX:EDAX社製Genesis-XM)

(3)リグニンと金属イオンの相互作用を解明するために、核磁気共鳴装置(NMR:JEOL社製NMR 500MHz)によるスギ木材から単離した磨砕リグニン(MWL)及び、MWLと硝酸鉛(II)をDMSO-d<sub>6</sub>に溶解し、MWLの各プロトンの緩和時間(T1緩和時間)測定を行った。

(4)上記金属イオン水溶液で処理した試料から超薄切片を作成し、試料に吸着した金属イオンを、超高空間分解能二重収束型二次イオン質量分析計(SIMS:GAMECA社製NanoSIMS50L)で分析した。

### 4. 研究成果

(1)各種金属塩水溶液(0.1M)で処理した試料のX線分析をFE-SEM/EDX(加速電圧=15

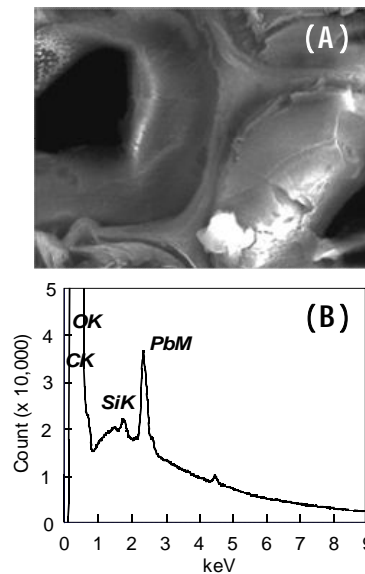


図1. 硝酸鉛(II)水溶液に浸漬処理した試料のFE-SEM写真(A)とEDXスペクトル(B)

kV)で行った。金蒸着した金属塩に浸漬しなかった試料のEDX分析では、鉄、銅、亜鉛、カドミウムは検出されなかったが、金属塩水溶液で処理した試料のEDX分析では、鉄と亜鉛が有意に検出された。それに対して、銅、カドミウムは、今実験で使用した試料調製およびEDXの分析条件では検出できなかった。また鉛(M線)は、蒸着で使用した金のM線と重なるために、鉛(II)塩水溶液で処理した試料に関しては、別途カーボン蒸着を行いFE-SEM/EDX分析に供した。その結果、硝酸鉛(II)水溶液で処理した試料の分析では、表面に吸着した鉛イオンを明確に検出できることが明らかになった(図1)。

(2)鉛イオンの試料表面への明確な吸着が明らかになったことから、同硝酸鉛(II)水溶液で処理した試料のFE-SEM/EDXによるマッピング分析およびライン分析を行い、その結果を図2に示した。マッピング分析の結果から、鉛イオンが、セルコーナーあるいは複合細胞間層に高濃度で吸着していることが示唆された(図2(A)、(B))。またライン分析の結果からは、細胞壁中の炭素含量が一定であったのに対し、鉛イオンが複合細胞間層により高濃度で吸着されていることが明らかになった(図2(C)、(D))。これら硝酸鉛(II)水溶液で処理した試料表面の鉛イオンの分布は、リグニンの細胞壁および細胞間層におけるリグニンの分布と同様の傾向であった。

(3)木材中のリグニンの鉛イオン吸着特性をモデル的に明らかにする為に、木材から抽出したMWLを高分子モデルリグニンとし、硝酸鉛(II)を加えた時のMWLの各プロトンT1緩和時間の変化を反転回復法で測定した。図3(A)に示したMWLの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルの各

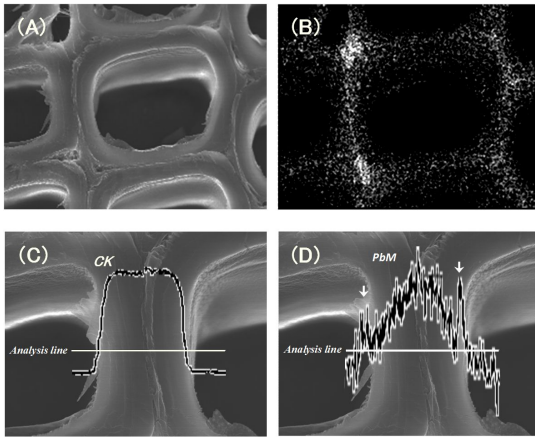


図2．硝酸鉛(II)水溶液に浸漬処理した試料表面における鉛の分散像((A) FE-SEM 写真、(B) EDX マッピング分析像、(C) EDX ライン分析-CK 線、(D) EDX ライン分析-PbM 線

シグナルのケミカルシフトは、同重量の硝酸鉛を添加してもほとんど変化しなかった(図3(B))。MWLの各プロトンのT1緩和時間は、低磁場(8.99-8.75 ppm)に現れるフェノール性水酸基のプロトンに帰属されるシグナルで僅かに減少したことを除き、硝酸鉛(II)添加前後でほとんど変化しなかった。(硝酸鉛(II)を加えることで、ほぼ全てのシグナルのT1緩和時間は減少したが、硝酸鉛(II)を加えないMWLに比べた場合の減少率は10%以下であった。また代表的なシグナルのT1緩和時間は図3に記した。)このことから、フェノール性水酸基の運動性が、硝酸鉛(II)を添加する事で減少したことが示唆された。これは、リグニンのフェノール性水酸基が静電的に鉛イオンと吸着していることに起因すると推測される。

(4) 上記結果から、リグニンのフェノール性水酸基に吸着した鉛の濃度分布から、試料

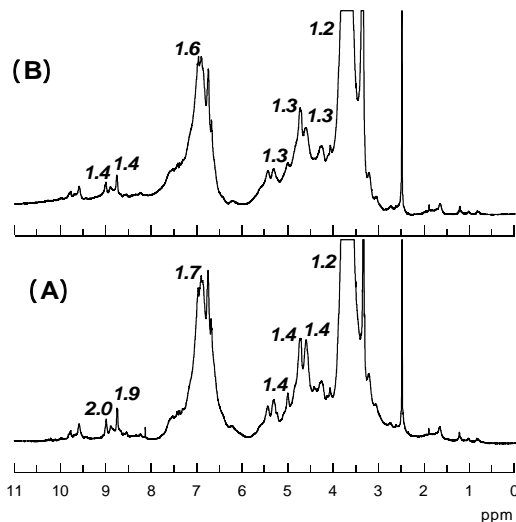


図3．MWL(A)および MWL/硝酸鉛(II)混合物(B)の<sup>1</sup>H-NMR スペクトル(溶媒=DMSO-d<sub>6</sub>)

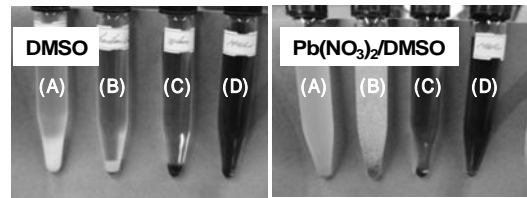


図4．セルロース(A)、グルコマンナン(B)、キシラン(C)、MWLのDMSOおよび硝酸鉛(II)/DMSO溶液への溶解

表面のリグニンの分布がFE-SEM/EDXで簡便に可視化できることが示唆された。しかし本研究の目的の一つであるFE-SEMの特徴を生かした高分解能観察では、高加速電圧下での長時間分析により試料表面が物理的に破壊されるという問題があった。より穏和な条件でFE-SEM/EDX分析を行うためには、試料表面の金属イオン濃度を上げる必要がある。試料に、より多くの金属イオンを吸着させるためには、金属塩水溶液の濃度を上げる、あるいは長時間の金属塩水溶液への浸漬処理が必要である。しかし、金属塩水溶液の濃度を上げた場合には、溶液のpHが大きく低下するとともに細胞壁が膨潤する可能性が示唆された。高濃度の塩化亜鉛(II)水溶液はセルロースを膨潤することが報告されている。また本研究では、硝酸鉛(II)/DMSO溶液が、キシロースを部分溶解すること、およびグルコマンナンとの混合ではゲルを形成することが確認された(図4)。また金属塩の希薄水溶液(0.01M)への長時間(3日間)の浸漬で調製した試料のFE-SEM/EDX分析では、試料表面の金属イオンの分散を明確に検出することはできなかった。

(5) FE-SEM/EDX分析に代わる方法として、細胞壁を分解、膨潤が抑えられると考えられる希薄金属塩溶液で処理した試料表面の金属イオンの濃度分布をSIMSで分析した。図5に1mMの塩化鉄(III)水溶液で48時間処理した試料のSIMS分析の結果を示した。SIMSではFE-SEM/EDXでは分析できなかった試料表面上の鉄イオンの濃度分布を可視化することができた。また、鉄イオンの分布は、FE-SEM/EDXで可視化した硝酸鉛(II)水溶液で処理した試料表面の鉛イオンの分布と比較でき、リグニンの細胞壁および細胞間層に

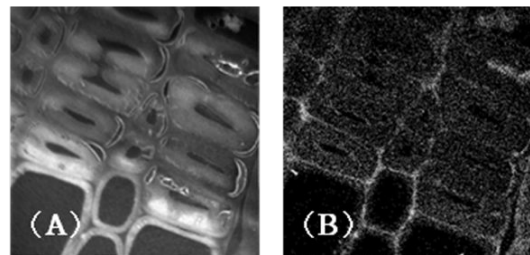


図5．塩化鉄(III)水溶液に浸漬した試料表面における鉄イオンの分散像、((A) 全イオン、(B) 鉄イオン)

おける分布と同様の傾向を示した。このことから本研究では、SIMS 分析では、低濃度で吸着した試料表面上の金属イオンの分布を、試料の2次的な分解を抑えた条件で可視化できることを明らかにした。

## 5 . 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 )

Katsushi Kuroda、Takeshi Fujiwara、Takanori Imai、Ruka Takama、Kaori Saito、Yasuyuki Matsushita、Kazuhiko Fukushima、The cryo-TOF-SIMS/SEM system for the analysis of the chemical distribution in freeze-fixed *Cryptomeria japonica* wood、Surface and interface analysis、査読有、Vol. 45、No. 1、2013、215-219  
DOI: 10.1002/sia.4979

### [ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

Satoshi Kubo、Katsushi Kuroda、Shuji Hosoya、Yuko Itoh、Kengo Magara、Adsorption of metal ions on wood and its components、4th International Conference on Pulping, Papermaking and Biotechnology, Nanjing, China (2012.11.7)

Katsushi Kuroda、New Approach of Chemical Distribution in a Frozen-Hydrated Wood Sample Using the Cryo-TOFSIMS/SEM System、IUFRO conference division 5, Lisbon, Portugal (2012.7.8)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

久保 智史 (KUBO, Satoshi)  
独立行政法人森林総合研究所・バイオマス  
化学研究領域・主任研究員  
研究者番号 : 50399375

### (2) 研究分担者

黒田 克史 (KURODA, Katsushi)  
独立行政法人森林総合研究所・木材特性研究  
研究領域・主任研究員  
研究者番号 : 90399379