

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292110

研究課題名(和文) 樹幹へのミネラルの取り込みと移動経路のクライオSEM/EDXを用いた直接的解明

研究課題名(英文) Cryo-SEM/EDX study of the uptake and the radial movement of minerals in the tree trunk

研究代表者

黒田 克史 (Kuroda, Katsushi)

国立研究開発法人 森林総合研究所・木材特性研究領域・主任研究員

研究者番号：90399379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：樹木の幹におけるミネラルの放射方向の移動に放射柔細胞の関与が提案されているが、これは科学的に証明されていない。本研究ではミネラルの木部放射方向の移動経路を明らかにするために、安定同位体セシウムをトレーサーに用い、スギ辺材にセシウムを注入したときの辺材から心材にかけてのセシウム局在をクライオSEM/EDXによる細胞レベルの分布解析とICP-MSによる定量分析により解析した。結果は木部放射方向のセシウムの移動経路が放射柔細胞であることを示しており、スギ辺材放射方向において木部放射柔細胞がミネラルの輸送機能を担うことを実験的に明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Ray parenchyma cells are a proposed pathway for the radial movement of some elements from the sapwood to the heartwood in the tree trunk. However, this function has not been demonstrated. In order to reveal the radial pathway of minerals in the tree trunk, a solution of the stable isotope cesium (Cs) was injected into the outer sapwood of Japanese cedar trees, and its radial movement through the xylem was traced at the cellular level using cryo-scanning electron microscopy/energy-dispersive X-ray spectroscopy (cryo-SEM/EDX) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Our findings provide the experimental facts that Cs is actively moved radially from sapwood toward intermediate wood through the ray parenchyma cells.

研究分野：樹木細胞学

キーワード：クライオ SEM EDX ミネラル セシウム 樹幹 放射柔細胞 ICP-MS

## 1. 研究開始当初の背景

森林総合研究所が2011年度から実施した調査で、福島第一原発事故により森林に放出された放射性セシウムが、事故後半年のうちに、葉や樹皮のみならず、樹幹内部の辺材と心材にも取り込まれていることが分かった。報告では、土壌水に含まれたセシウムが根から取り込まれ、あるいは葉に沈着したセシウムが転流により師部を介して辺材に蓄積され、その後放射線細胞を経由して心材へ至ったと予想されている。しかしながら、辺材や心材のどの細胞に蓄積されたのか、またどのような経路により蓄積されたのか、その実態は不明である。そもそも、細胞へのミネラルの取り込みと移動の実態を科学的に証明した知見がないためである。

樹木木部柔細胞は木部を構成する細胞のおよそ1~2割を占め、数年から数十年にわたり生活細胞として生存する特徴を持つ。樹木の長寿に関係する重要な役割があると考えられているが、その機能の全容は明らかでない。Okadaら(2011,2012 木材学会誌)は、辺材に注入したルビジウムが数日で心材へ移動することを突き止めた。その経路について放射線細胞を介した能動的輸送であると考察しているが、その直接的証拠は得られていない。

樹木の生存戦略に関する科学的本質にせまるため、また、成果は樹木の放射能汚染の今後の予測につながる重要な知見になると考え、根から取り込まれた水や師部に含まれたミネラルが、どのように辺材や心材に取り込まれるのかを科学的に明らかにする本課題を提案した。

## 2. 研究の目的

本研究では、樹幹放射方向のミネラルの移動経路を直接的に明らかにすることを目的に、まず「クライオSEM/EDX」を用いたミネラル移動の解析方法を開発する。次に開発した手法を用いて、根あるいは師部から供給されたミネラルが樹幹木部の放射方向を移動する過程を細胞レベルで解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

ミネラルの挙動を調べるトレーサーとして、必須元素のカリウムと同族であるセシウムとルビジウムを用いた。ミネラル注入実験には森林総合研究所千代田苗畑に植栽された7年生と約20年生のスギを用いた。これらのスギは中央部に心材が形成されていた。注入溶液は、注入範囲を特定するための酸性フクシンを加えた塩化セシウム水溶液あるいは塩化ルビジウム水溶液を用いた。スギ立木胸高部位の内樹皮あるいは辺材に小穴を開け直ちに溶液を注入した(図1a)、3時間、

1日、4日、1週間注入した後に、立木の幹を液体窒素で凍結固定してから伐採する立木凍結法により注入部を含む樹幹を採取した(図1b)。

細胞レベルのミネラルの局在解析は、凍結試料をそのまま解析できる「クライオSEM/EDX」を用いて行った。クライオスタットを用いて試料表面の面出しを行った後、クライオSEM装置に導入した。加速電圧3kVで観察した後に金でコーティングし加速電圧15kVでEDX解析を行った。蓄積量の定量解析は、凍結試料を凍結乾燥させた後に硝酸で分解し、誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)で元素分析を行った。

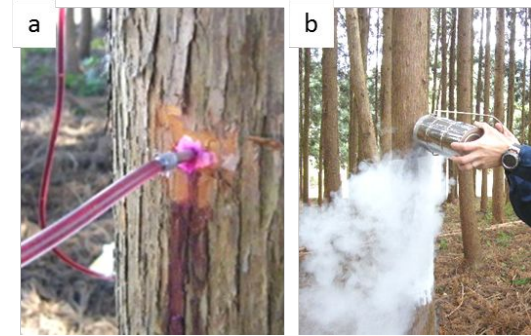


図1 スギ樹幹へのセシウム溶液の注入(a)と立木凍結法(b)

## 4. 研究成果

まず、樹木へのミネラルの注入方法の検討を行った。酸性フクシンによる赤色染色は自由水が移動した部位を特定するのに用いられており、本課題でも赤色染色部を自由水が移動した部位とした。辺材に注入した場合、注入溶液は木部の辺材の一部を直接移動するが内方に広がらないことが確認できた(図2)。一方、師部からのミネラルの移動を調べる目的で樹皮への注入を行ったが、木部を傷つける場合が多く、また木部に傷がないことを確認することが困難だった。そのため、本課題の解析にはすべて辺材に注入した試料を用いることにした。酸性フクシンの赤色の染色部を観察したところ、注入範囲に冬期と夏期の違いは見られなかった。



図2 溶液注入後のスギ試料  
自由水が移動した部位は酸性フクシンの赤色染色で判断できる。点線は分析を行った範囲を示す。

一方、本研究費を用いてSEM用の元素分析装置（エネルギー分散型X線分析装置；EDX）を購入し、既設のクライオSEMに組み込むことにより、凍結試料をそのまま観察し元素分析できるクライオSEM/EDXを導入した。この装置を用いて、凍結試料のミネラル局在を直接的に解析するための分析条件を検討した。注入セシウムについては特性X線のピークが明瞭であり、セシウムの解析が可能であった。一方、注入ルビジウムでは、試料の導電性の付加のために必須な試料コーティング材の金のスペクトルとエネルギー位置が重なるため解析不可能なことが分かった。このため以降の実験はセシウムを注入した試料を用いた。

セシウムを注入したスギ試料についてセシウムの特性X線を用いた局在解析を試みた。観察面の中から測定したい部位のスペクトルが得られる点分析を行った結果、セシウムの特性X線のピークの有無によりセシウムの蓄積を判断できることが分かった(図3)。次に、観察面全体の元素の局在が解析できる元素マッピングを試みた。観察面すべてでセシウムが存在しているセシウム濃度が高い部位ではマッピングは可能であり、この場合観察した全面からセシウムが存在するところが示された。しかしながら局所的に分布していると考えられる部位ではマッピングが成功しなかった。この原因としてセシウム濃度が低いことが考えられたため長時間（2時間以上）のマッピングを試みた。その結果、セシウムが局所的に存在することが確認できるものの、長時間の測定中にX線によるダメージのために試料が変形し、形態情報とあわせた正確なマッピングを得ることは出来ないことが判明した。これらのことから、本課題の目的であるセシウムの局在解析には、点分析によるスペクトル解析が適することを明らかにした。

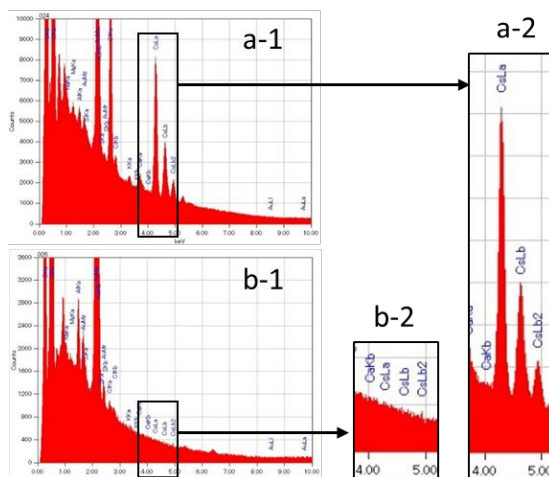


図3 セシウムを注入したスギ試料のクライオSEM/EDXの点分析の例  
セシウムの特性X線（CsL線）の有無でセシウムがある部位（a）とない部位（b）を判断した。

以上の確立した条件を用いて、注入したセシウムの局在解析を行った。解析は酸性フクシンの染色部位から放射方向に行った（図2の点線）。また、同時に、クライオSEM/EDX解析部と隣り合う部位を用いてICP-MSでセシウム濃度を測定し、放射方向の定量的な濃度分布変化を測定した。

注入するセシウム濃度を0.1M、1M、5Mと変えた場合のセシウム分布の違いを解析したが、セシウム分布にセシウム濃度による違いは見られないことを明らかにした。次に、冬期に塩化セシウム水溶液を3時間、1日、4日、1週間注入した試料を用いて分布解析を行った。仮道管内腔の水では注入溶液が直接移動した辺材部（着色部）およびその極近の部位でのみセシウムが検出された。仮道管間の細胞壁では着色部から2年輪程度の部位までセシウムが検出された。これらは注入時間にかかわらず同じ傾向であった。一方、放射柔細胞の内腔と細胞壁では、注入3時間および1日では着色部から2年輪程度までしかセシウムは検出できなかったが、4日間と1週間ではさらに内側の辺材および移行材でも検出できた。仮道管内腔と仮道管間の細胞壁では注入時間が長くてもセシウムが局在せず、放射柔細胞内腔と細胞壁では注入時間が長くなるとセシウムが局在するという結果は、セシウムの樹幹放射方向の移動経路が放射柔細胞であることを示しており、スギ辺材放射方向において木部放射柔細胞がミネラルの輸送機能を担うことを実験的に明らかにできた。

##### 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 3 件)

黒田克史 (2015) 木部における柔細胞の役割、物質移動と心材形成．木材学会誌、61:131-135．査読有  
doi.org/10.2488/jwrs.61.131.

Jyske T, Kuroda K, et al. (2015) Seasonal variation in formation, structure, and chemical properties of phloem in *Picea abies* as studied by novel microtechniques. *Planta*, 242:613-629. 査読有  
doi:10.1007/s00425-015-2347-8.

Kuroda K, Fujiwara T, Hashida K, Imai T, Kushi M, Saito K, Fukushima K. (2014) 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. 査読有  
doi:10.1093/aob/mcu028.

〔学会発表〕(計 5 件)

黒田克史、山根健一、伊藤優子．クライオ SEM/EDX によるスギ樹幹に注入したセシウムの分布解析、第 66 回日本木材学会大会．2016 年 3 月 27 日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)．

黒田克史、山根健一、伊藤優子．スギ樹幹に注入したセシウムのクライオ SEM/EDX による分布解析の試み、第 65 回日本木材学会大会．2015 年 3 月 17 日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)．

Jyske T, Kuroda K, et al. Phloem structure and stilbene chemistry in *Picea abies* as revealed by novel microtechniques. International Symposium on Wood Science and Technology 2015. 2015 年 3 月 16 日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)．

Jyske T, Kuroda K, et al. Stylbenes in Norway spruce: variability and localization within phloem and bark. 第 27 回国際ポリフェノール会議 2014. 2014 年 9 月 3 日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)．

黒田克史、鈴木養樹、中田了五．心材形成過程の解析を目指したインピーダンス法によるカラマツ木部の水分分布季節変化の非破壊的計測、第 64 回日本木材学会大会．2014 年 3 月 14 日、愛媛大学(愛媛県・松山市)．

〔図書〕(計 1 件)

黒田克史(2016)元素分布イメージング、植物細胞壁実験法(石井忠他編) 215-220 .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

黒田 克史 (Kuroda Katsushi)  
国立研究開発法人森林総合研究所・  
木材特性研究領域・主任研究員  
研究者番号：90399379

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

伊藤 優子 (Itoh Yuko)  
国立研究開発法人森林総合研究所・  
立地環境研究領域・主任研究員  
研究者番号：60353588