

平成 30 年 7 月 31 日現在

機関番号：82105

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2017

課題番号：15KK0287

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
（国際共同研究強化）

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

研究代表者

黒田 克史（Kuroda, Katsushi）

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・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） 9,900,000円

渡航期間：12ヶ月

研究成果の概要（和文）：樹幹の放射方向のミネラル移動は樹木の成長に欠かせない重要な機能である。この移動に放射柔細胞のミネラル輸送機能が寄与すると考えられているが、この輸送機能のメカニズムは解明されていない。本研究では樹幹放射方向のミネラル移動実態の解明のため、トレーサーとして安定同位体セシウムを樹幹に注入して凍結固定したスギ樹幹におけるセシウムの放射方向分布をヨーロッパシンクロトロン放射光クライオマイクロ蛍光X線分析装置で解析した。凍結試料の解析の結果、セシウムが放射柔細胞内腔と細胞壁および仮道管の細胞壁に分布することを明らかにした。

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, which is one of the most important function for tree's growth. However, this function has not been demonstrated. In this study, we analyzed the radial distribution of stable isotope cesium, which is injected in a standing tree trunk as a tracer, through the frozen-hydrated *Cryptomeria japonica* tree trunk using a synchrotron radiation-based cryo micro X-ray fluorescence in ESRF. We succeeded to obtain the elemental mappings using frozen-hydrated tree samples, showing that cesium distributed in the lumen and cell wall of ray parenchyma cells and tracheids.

研究分野：樹木細胞学

キーワード：クライオ SEM/EDX ヨーロッパシンクロトロン 蛍光X線 スギ 放射柔細胞 セシウム 凍結固定

1. 研究開始当初の背景

本課題の基課題である科研費基盤 B「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」は、福島原発事故により樹木内部が放射能汚染された事実を受け、樹木の幹内部への汚染経路および汚染の将来予測に結びつく科学的根拠を提示しようとするものである。そのために、立木に安定セシウム等のミネラルを注入した樹木内のミネラル分布を可視化し、樹木内部へのミネラルの取り込みと移動経路を細胞レベルで明らかにする研究である。これまでの研究から、スギでは辺材外部の樹液内に溶け込んだセシウムは、辺材仮道管内の自由水内で拡散するが拡散の範囲は限定的であり、放射線細胞内を通して辺材内および移行材（辺材から心材へと変化する部分、白線帯とも言われる）へと移動することを明らかにした。一方、師部から取り込まれたセシウムも木部に移動し、移行材まで移動することが明らかになった。このことから、樹皮表面に付着した放射性セシウムや葉で吸収された放射性セシウムは、内樹皮から木部へと移動することが示唆された。これらは立木で凍結固定された試料を水を含んだまま解析する本研究独特の手法により初めて明らかにされた。

しかしながら、師部から木部への移動の経路については、師部（樹皮）の形成機構や師部内の細胞の機能について不明な点が多いため、科学的に証明するにはいたっていない。木部においても、放射線組織内の移動では柔細胞のどの構造が移動部位となるのかを解明することは、移動メカニズムを明らかにするための、残された重要な課題である。これらの課題は、クライオSEM/EDXの分析能力の限界によるものであり、より高分解能で解析が可能になれば、科学的に証明できる可能性がある。しかしながら、一般的な高解像度分析（例えば透過型電子顕微鏡による元素分析やシンクロトロンを用いたX線蛍光分析）では試料を脱水させる必要があり、植物内の水に溶解されているままでの元素分析は不可能である。

2. 研究の目的

本課題では、立木内のミネラル移動経路の解明研究を海外共同研究者との共同研究により進展させるために、立木の師部に安定同位体セシウムを注入した樹木を用いて、含水試料の放射光クライオマイクロ蛍光X線装置を用いて凍結樹木試料におけるミネラルの分布を可視化すること、また、師部から木部にかけての細胞間ネットワークを三次元的に可視化することを目的とする。同時に、これらの新規手法を基課題で行っているクライオSEM/EDXによるミネラル局在の結果と比較し、新手法の有効性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 試料

心材が形成された成木のスギの樹幹に塩化セシウム水溶液を3時間、1日、1週間注入し、注入部を含む樹幹部位を立木凍結固定伐採法により採取した(図1)。採取した凍結試料を-80℃の冷凍庫で保存した。

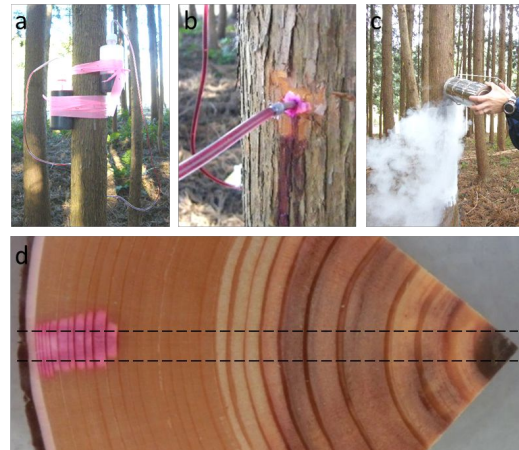


図1 試料の採取の様子

スギ立木に塩化セシウム溶液を注入し(a,b)、立木凍結法で幹を凍結固定した後に伐採(c)、凍結を維持したまま-80℃で保存(d)

(2) 凍結試料を用いた放射光クライオマイクロ蛍光X線分析

ヨーロッパシンクロトロンのID21ビームラインで凍結試料の分析を行う。凍結試料を用いた分析は、一般的な蛍光X線分析では行っておらず、試料調整や解析方法についても共同で開発する。

(3) 凍結試料を用いたX線マイクロトモグラフィー

師部から木部組織の各細胞の立体配置を三次元的に可視化するために、X線マイクロトモグラフィーを用いた手法について検討をおこなった。

4. 研究成果

4-1. 凍結試料におけるミネラル分布可視化手法の開発

(1) 放射光クライオマイクロ蛍光X線分析

ヨーロッパシンクロトロン(ESRF) ID21ビームラインのマイクロ蛍光X線分析装置には凍結試料測定のための凍結ステージが設置されており、本研究の目的である凍結試料のミネラル局在解析に最適な装置と考えた。ESRFはヨーロッパ各国の共同開発により設立された大型のシンクロトロンであり、施設の利用は課題を申請し採択される必要がある。そこで、共同研究者のJyske博士(フィ

ンランド・Luke)と詳細な打合せを行い、本研究課題内容を ESRF に申請した。クライオ SEM/EDX では試料ダメージ等の影響により成功していない元素マッピングが、高感度・高分解能の ESRF のクライオマイクロ蛍光 X 線分析装置を利用することにより可能になる点を強調した結果、課題が採択された。

本装置は、凍結試料を測定できるが、植物を材料とした研究実績は少ない。そこで、ビームライン研究者と事前の打合せを行い、試料調製方法などを確定した。また、実際の測定とデータ解析のため、本装置の使用経験が豊富で画像処理技術を開発した Suhonen 博士(フィンランド・ヘルシンキ大学工学部)と Suurone 博士(フランス・ESRF)に共同研究者として参画してもらい実験を進めた。測定の結果、注入したセシウムおよびカリウムやリンなどの樹幹に存在する元素についてマッピングデータを得ることができた(図 2)。得られたデータから、スギ立木の幹(辺材外方)に注入した安定同位体セシウムが、注入部位よりも内側の辺材の仮道管の細胞壁および放射柔細胞の細胞壁と内腔に局在することを明らかにした。

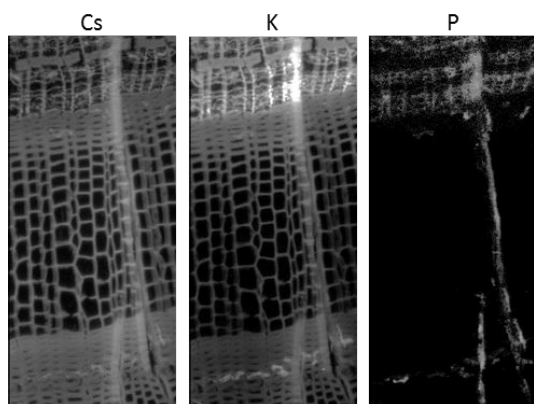


図 2 放射光クライオマイクロ蛍光 X 線分析の結果の例
セシウム(Cs)、カリウム(K)、リン(P)の元素マッピング。

(2) X 線マイクロトモグラフィー

当初、ESRF の ID19 ビームラインの X 線マイクロトモグラフィーを用いた解析を提案していたが、ESRF 利用が採択されずに実現しなかった。そこで、共同研究者の Suhonen 博士の研究室が所有するマイクロトモグラフィー装置の利用を検討した。本装置は凍結ステージを有していないため、試料が融解しない短時間の測定を行った。試料全体のミネラル測定は可能だが、測定中の乾燥に伴う試料の変形により細胞レベルの測定はできなかった。本研究の目的には短時間でも凍結を維持する装置が必要であるといえる。

4-2. 基課題の結果との比較

基課題で行っていたクライオ SEM/EDX による解析では、放射柔細胞の内腔と細胞壁にお

いて、注入セシウムは仮道管の細胞壁よりも内方(注入部から遠い側)で検出され、放射柔細胞によるミネラル移動は細胞機能としての輸送であり細胞壁を介した拡散に先んじて移動することが示唆された。一方、放射光クライオマイクロ蛍光 X 線分析装置では注入したセシウムが放射柔細胞と仮道管細胞壁に同様に分布する結果が得られた。この違いについて現段階で 2 通りの解釈が可能である。一つは、クライオ SEM/EDX では元素検出感度が低いために存在するはずの仮道管細胞壁のセシウムを検出できなかった可能性、もう一つは、クライオ SEM/EDX で見当を付けたセシウムが移動する先端部位は、放射光クライオマイクロ蛍光 X 線分析装置の高感度分析ではより内方に位置していたため解析目的部位の測定が出来ていない可能性である。引き続き詳細な研究を進めていく必要がある。

4-3. 今後の研究の発展

ESRF の放射光マイクロ蛍光 X 線装置について、共同研究者らと次期申請を行った。2017 年の使用については採択に失敗したが、2017 年 12 月申請の課題が採択され、2018 年 7 月に実験を行う。セシウムが移動する最先端における分析を試み、放射柔細胞の内腔と細胞壁、仮道管の細胞壁における注入セシウムの分布の相違について検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Kuroda K, Yamane K, Itoh Y. (2018) Cellular level in planta analysis of radial movement of artificially injected caesium in *Cryptomeria japonica* xylem. *Trees*, <https://doi.org/10.1007/s00468-018-1729-5>

[学会発表](計 3 件)

黒田克史、山根健一、伊藤優子. クライオ SEM/EDX によるコナラ辺材に注入したセシウムの木部内放射方向の局在解析、第 68 回日本木材学会大会、2018 年

Kuroda K, Yamane K, Itoh Y. Radial movement of cesium in *Cryptomeria japonica* xylem analyzed in the frozen state by cryo-SEM/EDX、IUFRO 2017 Division 5 Conference、2017 年

黒田克史、クライオ SEM/EDX によるスギ辺材に注入したセシウムの木部内放射方向の局在解析(2)冬期長期間注入、第 67 回日本木材学会大会、2017 年

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

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研究・整備機構・森
林総合研究所・主任研究員等

研究者番号：90399379

(2)研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

Dr. Tuula Jyske

Natural Resources Institute Finland

(Luke:フィンランド天然資源研究所)

Biomaterials and -products qualities,

Team leader