

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

保倉明子 東京電機大学工学部環境化学科 〒101-8457 東京都千代田区神田錦町 2-2
 北島信行 株式会社フジタ 技術センター 〒243-0125 神奈川県厚木市小野2025-1
 寺田靖子 高輝度光科学研究センター 〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1
 中井 泉 東京理科大学理学部応用化学科 〒162-8601 東京都新宿区神楽坂 1-3

要旨 ある種の植物は、生長の過程で環境から重金属を取り込み、体内において高濃度に蓄積する。この蓄積機構を化学的に明らかにするためには、重金属元素の細胞レベルでの分布や化学形態の解明が必要である。最近、放射光 X線マイクロビームを用いた蛍光 X線分析およびXAFSを重金属蓄積植物へ適用することで、新しい多くの知見が得られ始めている。ここではヒ素を蓄積するモエジマシダとカドミウムを蓄積するハクサンハタザオについての研究成果を解説する。特に高エネルギー X線マイクロビームの利用は、植物におけるカドミウムの分布を可視化する上で非常に有用である。また我々が開発した放射光 X線のための植物の試料調製法についても概説した。

1. はじめに

ある種の植物は、水や養分を吸収する際に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古くから知られている^{1,2)}。植物によって蓄積する重金属の種類や量が異なることから、このような植物は、地下鉱脈を探るための指標植物として用いられてきた²⁾。近年、重金属汚染された土壌を浄化するためにこれらの植物を用いるファイトレメディエーション (Fig. 1) が、環境にやさしい浄化技術として注目を集めている³⁾。この Phytoremediation という言葉は、ギリシャ語で植物を意味する“phyto”と英語で修復を意味する“remediation”からなる造語で、植物を用いる環境修復・環境浄化技術を意味する。例えばシダの仲間のモエジマシダ (*Pteris vittata* L.) は、ヒ素汚染土壌で栽培すると乾燥重量あたり 2 wt%ものヒ素を蓄積する⁴⁾ため、ヒ素を除去する植物として米国の会社により商品化されている⁵⁾。

現状では、毒性のある金属汚染土壌の浄化に対しては、土を運び出し、化学的に洗浄して汚染を取り除いてから埋め戻す手法や、汚染がそれ以上広がらないようにコンクリートなどで固めて不溶化する手法等がとられている。これらは迅速に汚染を処理できるというメリットがある一方で処理費用が高い。米国では有害廃棄物処理現場において1エーカーあたり百万ドル (約8万円/坪) という非常に高価な費用で処理されている³⁾。また土壌を掘り起こしたり運んだりする過程で、二次的な環境汚染を引き起こす可能性もある。

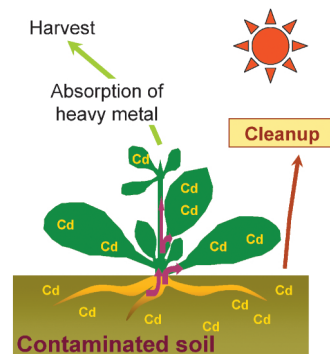


Fig. 1 Basic concept of Phytoremediation.

これに対して、植物を用いる環境浄化では、栽培に必要なものは主に太陽と水であり、とても省エネルギーで、処理にかかる費用は安価である。さらに、土壌を掘り起こさず、表土を保護するので、環境にやさしい処理技術である。ある一定期間栽培して金属元素を取り込んだ植物を刈り取ることにより、土壌から金属元素の除去が可能となる。ヒ素、鉛、カドミウム、クロム、放射性元素などで汚染された土壌は世界各地で問題となっており、生きた植物と太陽エネルギーで金属汚染浄化を行なうファイトレメディエーションは潜在的に“グリーン”技術として発展するポテンシャルをもち、その経済効果は大きいと見積もられている³⁾。わが国でも実用化に向けて研究が進められており、実地試験例などが報告されるようになってきた⁶⁾。

ここで重要なのは、汚染土壌でこのような重金属の蓄積

性を示す植物は、極一部の植物種である、ということである。海草やヒジキなどヒ素含有量が通常の植物よりも比較的高いことは従来から知られていたが、モエジマシダは、2001年に陸上植物として初めてヒ素の高集積性が認められた植物なのである。なぜ特定の植物にのみ、このような集積性があるのか、そのメカニズムに興味を持たれる。

一般に植物は動物と違って自由に移動できないため、重金属などの汚染物質に対しては、ある程度の防御機構を持っているとされる。たとえば植物体内で重金属の不溶体を形成する、もしくはチオール基などと錯形成して不活性な化学種に変える、などの機構である⁷⁾。また一方で、植物は、植物細胞に特徴的な細胞壁と細胞内小器官である液胞をもつ。細胞壁の構成成分であるペクチンは多数のカルボキシル基をもち、重金属を含む陽イオンを捕獲し、吸着・固定化する⁸⁾。また、液胞は、液胞膜と呼ばれる膜につつまれた構造で、成熟細胞の体積の9割を占め、老廃物とともに重金属などの有害物質を取り込む。このように、植物に特徴的な細胞内小器官は、細胞質における生命活動から有害重金属を切り離すことで、重金属耐性機構に重要な役割を果たしている。このような植物が持つ重金属に対する防御機構や蓄積機構を理解するためには、根から吸収された重金属がどこにどのように移行・蓄積して分布しているのか、またその化学形態はどのように変化しているのか、という「元素分布」と「化学形態」の両者の情報が重要である。

しかしながら、重金属高集積性植物が重金属をどこにどのように蓄積するのか、なぜ一般の植物よりも高濃度に蓄積できるのか等についてはよくわかっていなかった。

2003年に筆者らがこの研究に取り組み始めたとき、モエジマシダにおけるヒ素の蓄積に関しては、根より葉において高濃度であることはわかっていた^{9,10)}が、葉における詳細な分布はよくわかっていなかった。それは元素分布を調べる手法として、SEM-EDSを用いていたため、ヒ素のような重元素のK線に対する電子線の励起効率が悪く、ぼんやりした像しか得られなかったからである⁹⁾。

そこで著者らは、放射光X線を用いるアプローチを始めた^{11,12)}。X線の非破壊分析である特長を生かし、*in vivo*



Fig. 2 Arsenic hyperaccumulator (*Pteris vittata* L.) (left) and cadmium hyperaccumulator (*Arabidopsis halleri* ssp. *gemmaifera*) (right).

で植物における重金属の動態解明を目指して、研究を行ってきた。植物は含水率が高いため、高真空系を必要とする分析手法とはマッチングが悪く、大気下で測定が行える放射光X線マイクロビームの適用が有効である。

本稿では、ヒ素を蓄積するモエジマシダ (*P. vittata* L.) および亜鉛とカドミウムを蓄積するハクサンハタザオ (*Arabidopsis halleri* ssp. *gemmaifera*) (Fig. 2) についての最新の研究成果を解説する。

2. 放射光マイクロビーム蛍光X線分析

植物における重元素分布や化学形態に用いられる分析法について、Table 1にまとめた。実験室に設置できる装置は、使用できる時間に制約がないという利点がある一方、一般的に感度が低いか、破壊を伴う分析法に限られてしまう。また、それぞれの分析法には利点があるが、同一試料に対して細胞レベル (μm オーダー) で、元素の二次元分析と化学形態分析ができるのは、放射光マイクロビームを用いたX線分析法だけであることがわかる。

我々がSPring-8のBL37XU¹³⁾で行っている高エネルギー放射光マイクロビーム蛍光X線分析システムの一例をFig. 3に示す。アンジュレーターからの放射光をSi(111)二結晶分光器で単色化し、Kirkpatrick-Baez型反射鏡(K-Bミラー)で1~2 μm 程度に集光したX線を試料に照射する。カドミウムをK線を用いて分析する際には、アンジュレーターからの3次光を使い、入射X線のエネルギーをCd K吸収端(26 keV)よりも高エネルギーの30~37 keVとしている。K-Bミラーは、凹面鏡(楕円筒面ミラー)でX線を全反射させて集光する¹⁴⁾。K-Bミラーは非点収差を抑えるために、2枚のミラーを直交配置させており、光子の利用効率が高く、色収差がないという利点を持つ。このため蛍光X線分析においては、明るく、エネルギー可変な光学系であるという特長がある。

このマイクロメートルサイズに集光したX線に対して、試料を走査することで、蛍光X線強度などの空間的な分布を得る手法が、放射光マイクロビーム蛍光X線イメージング¹⁵⁾である。走査型X線分析顕微鏡ともよばれる。本研究では、試料ステージを2次元に走査して、発生する蛍光X線を半導体検出器で検出し、含有元素の2次元分布を測定している。この空間分解能は基本的に集光したX線のサイズで決まる。より高い空間分解能を目指した集光素子の開発が行われている¹⁶⁻¹⁸⁾。

X線、特に高エネルギーX線は試料内部深くへ侵入し、分析深さは数mmにも及ぶ¹⁹⁾。集光素子を使って整形した小さなX線ビームの空間分解能を生かすためには、試料の厚みはビームサイズ程度以下であることが理想である。しかし、現実には、樹脂置換などの化学的な処理をしないでX線マイクロビーム(1 μm)程度の厚みの植物切片を作成することは、非常に難しい。また植物細胞は

Table 1 Analytical techniques for determining elemental distribution and chemical form in plant

Analytical technique	Spatial resolution	Sensitivity	Chemical speciation	Place of experiment	Remarks
synchrotron radiation micro-XRF (SR- μ -XRF imaging, μ -XAFS) ³⁸⁾	ca.1 μ m	○	◎	specialized facility	Elemental distribution and information regarding chemical form are obtained from one sample at a spatial resolution of μ m.
X-ray fluorescence microscope (XRF)	10 μ m	×	×	laboratory	White X-rays from the X-ray tube give high levels of background for a wide energy range. This causes a low S/N ratio for analysis.
Scanning electron microscopy-energy dispersive spectrometry (SEM-EDS)	several dozen nm ^{a)}	×	× ^{b)}	laboratory	Excitation efficiency for the K-line of heavy elements is generally low. Analysis is carried out in a vacuum.
micro-particle induced X-ray emission analysis (μ -PIXE analysis) ³⁹⁾	ca.1 μ m	○	×	specialized facility	Measurements in the air deteriorate in spatial resolution due to diffusion of the particle beam (\approx 10 μ m). Sample damage is sometimes serious. Chemical state analysis is not possible.
positron emitting tracer imaging system (PETIS) ⁴⁰⁾	ca.1 mm	△	×	specialized facility	Element dynamics are obtained for the living sample. Radioactive isotope with appropriate life-time is necessary.
Chemiluminescence spectrometry ⁴¹⁾	0.1 μ m ^{e)}	△ ^{d)}	×	laboratory	Element dynamics are obtained in a living state. Chemical treatment is necessary with an appropriate reagent to detect a target element.
HPLC/ICP-MS	— ^{e)}	◎	○	laboratory	Liquid samples are generally necessary. Extraction of target material should be required.
Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)	— ^{e)}	×	○	laboratory	Any sample condition is analyzable. Target elements are limited because optimum nuclei are essential.

- a) The resolution for elemental analysis is much larger than that for imaging due to penetration of the incident electron beam and characteristic x-rays.
- b) Transmission Electron Microscopy (TEM) together with Electron Energy-Loss spectrometry (EELS) can provide chemical state information. Some studies of Ca, O, Si, etc. have been reported.⁴²⁾
- c) With use of a laser microscope.
- d) Easily affected by coexisting material.
- e) This technique has no spatial resolution. A target sample can be separated individually before the analysis.

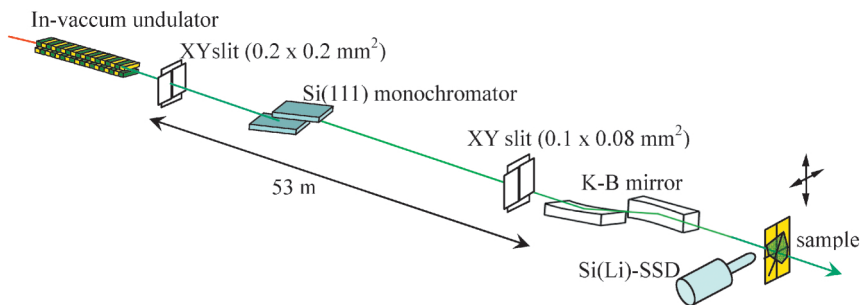


Fig. 3 A system of micro X-ray fluorescence analysis with high-energy synchrotron radiation (SPring-8 BL37XU). K-B mirror: fused quartz coated with platinum, fabricated by a bent-polishing method at Canon Co. Ltd. Length of the mirror: 100 mm, focal length: 250 mm (1st mirror) and 100 mm (2nd mirror), average glancing angle: 0.8 mrad.

含水率が高く、乾燥すると収縮してしまうので、細胞レベルで蛍光 X 線イメージングを行うためにも、試料調製法は非常に重要である。

そこで我々は、次節で紹介するように、いくつかの試料調製法を試み、現在は植物を急速に凍結させて凍結マイクロトームで切片を作成する手法で試料調製を行っている。この手法を用いると含水状態の植物試料から厚み10~20 μ m程度の切片を作成することが可能である。切片の凍結状態を維持するため、蛍光 X 線イメージングの測定中には低温窒素ガスの吹き付けを行っている。

3. 重金属蓄積植物の試料調製法の開発

植物の組織・細胞レベルにおける元素分布を明らかにするためには、測定中における乾燥等による組織の収縮・変形や含有元素の移動・流出のない試料調製を行う必要がある。通常、放射光蛍光 X 線分析は大気下で測定が行えるため、試料の形状については自由度が高く、生きたままの植物、植物から切り出したばかりの生鮮組織、凍結乾燥試料、凍結試料など様々な形態の試料を用いて測定を行うことが可能である。しかし、蛍光 X 線イメージングでは、

試料をパルスモーター制御のステージに載せて2次元に走査してXRFデータを取得するため、一回の測定に数時間を要する場合もあり、測定中の乾燥・収縮の影響は非常に大きく、これを避けるための工夫が必要となる。

また測定で明らかにしたい元素分布が器官レベルであるか、組織や細胞レベルのものであるかによって、適切な空間分解能でXRFイメージングを行うことになる。とりわけ、細胞レベルの空間分解能が必要で1 μ mレベルのX線マイクロビームをプローブとして蛍光X線イメージングを行う場合には、試料調製におけるアーティファクトを回避するために試料調製に要求されるレベルも高くなる。

我々は、これまでに器官レベルのマクロな元素分布の測定から細胞レベルのミクロな測定へと研究を進めていく過程で、様々なレベルに応じた試料調製法について検討を行ってきた。以下に、その代表的なものについて紹介する。

3.1 器官レベルの測定（生鮮試料）

葉、茎、根など器官レベルにおける元素分布の分析を行う際には、生きたままの植物を用いた。試料台の近くに架台を設け、栽培容器に入った植物を載せた。測定対象とする葉をアクリル製の試料ホルダーにテープで固定し、生きたままの状態でもマクロな元素分布測定を行った（Fig. 4）。この方法は、完全な非破壊であるため、測定中に植物が乾燥する恐れがない反面、試料台を2次元に走査するため、周辺機器と干渉しない位置に栽培容器を配置する必要があり、試料の測定範囲が制限されるという不具合があった。また試料が湾曲して測定面が平坦になっていないと、X線に対して陰ができるという問題点もあった。

植物の葉や茎のような地上部器官の表皮細胞の表面にはロウ質の発達したクチクラ層があり、比較的乾燥に耐える構造となっている⁸⁾。そこで、植物個体から測定部位を切り出し、切り口からの乾燥を防ぐため、蒸留水で湿らせた紙を密着させたり、袋状にヒートシールした高分子膜の中に試料と湿らせた小紙片を一緒に封入したり、乾燥を防ぎつつ測定を行う方法も採用した。



Fig. 4 A photo of in vivo XRF analysis of *A. halleri* (Spring-8 BL37XU).

3.2 組織レベルの測定（凍結乾燥切片）

植物の葉は、表皮組織、柵状組織、海綿状組織など様々な組織から構成されている。このような組織レベルでの元素分布を知るためには、葉の断面を対象とした測定を行う必要がある。3.1で述べたように、試料切片と湿った紙切片を高分子膜の袋に封入することでも短時間の乾燥は防げるが、長時間にわたる測定には対応できない。そこで、一般的に植物の組織構造を保持できるとされる、凍結乾燥処理について検討した。カミソリあるいはパーチカルスライサー（日本分光、HS-1型）にて切り出した切片を、あらかじめ液体窒素を用いて冷却したアルミブロックあるいはドライアイス上にて速やかに凍結し、凍結を維持したまま減圧乾燥を行った。作成した試料は両面テープを用いてアクリル製の試料ホルダーに固定して測定に供した。

一方、同じ植物器官でも根は植物体の地上部とは異なり、表面にクチクラ層をもたない軟弱な器官であり切片を作成することは難しい。そこで、まず植物個体から切り出した根をドライアイス上にて急速凍結し、あらかじめ冷却しておいたカミソリを使って割断して切片を作成し、凍結乾燥処理を行った。この手法では、150~200 μ m厚さの切片を作成することが可能となった。凍結乾燥により作成した根の切片のSEM像をFig. 5に示す。作成した根の切片では平滑な断面が得られ、表皮、皮層、内皮、中心柱（地上部へ向けての養水分の通り道となる通導組織を含む領域）といった根の組織の構造が良好に保たれた状態であった。

凍結乾燥切片は、ハンドリングが容易で長時間の測定に耐えるという利点をもつが、Fig. 5(b)のSEM像に見られるように、一つ一つの細胞内におけるミクロな構造については、乾燥の過程で生じたと思われる細胞内部の収縮が認められる。したがって、1 μ m程度の分解能で細胞レベルの元素分布を議論するためには、この凍結乾燥処理した切片では難しい。そこで凍結乾燥を行わず、凍結して作成した切片試料について、その凍結状態を維持したまま測定するための方法について検討した。

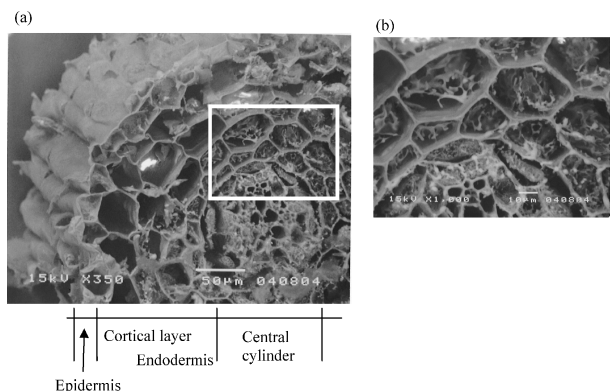


Fig. 5 SEM image for a root section of *P. vittata* prepared by freeze-drying (a) and its enlarged view (b).

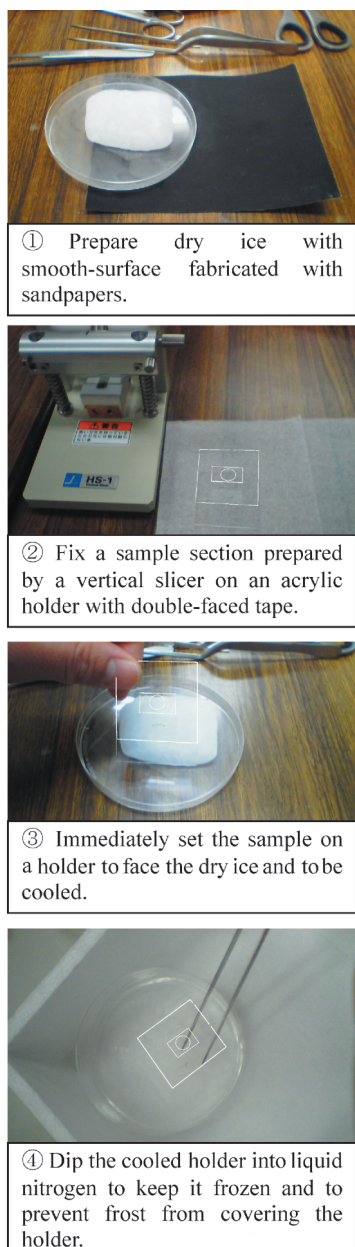


Fig. 6 Preparation procedure for plant section in a frozen state. (Acrylic holders can hardly be seen in the photos, so white lines traced the holders for clarity)

3.3 細胞レベルの測定（凍結切片）

1 μm のレベルで構造が保持される試料調製法として、ドライアイスで冷却固体に用いる比較的簡便な凍結切片作成手法 (Fig. 6) を確立した。水分を多く含む植物試料を対象とする場合、凍結法による試料の固定が生きた状態を最も良く保存した構造観察を可能にする。しかし、ゆっくり凍結すると植物細胞内に氷の結晶が生長してしまい、細胞構造は損傷を受ける。このため試料を均一に急速に凍結することが求められる。そこで試料切片の断面を冷却固体 (入手が容易なドライアイス) の表面に密着させる凍結方法を採用した。試料切片の体積が小さいため、平坦に研磨

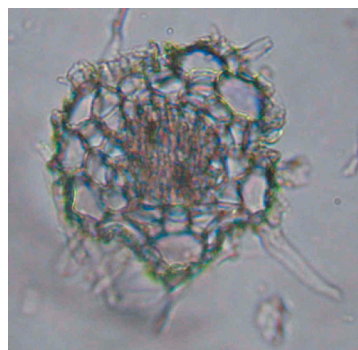


Fig. 7 Digital microscope image for the root section of *A. halleri* prepared by a cryomicrotome. (The root diameter was approximately 0.2 mm)

したドライアイスに密着させることで迅速に凍結させることが可能であった (Fig. 6)。

この手法を用いて、ヒ素を投与してから一定時間経過後のモエジマシダの葉を逐次的に採取して凍結切片を作成し、モエジマシダの葉組織内におけるヒ素の動態追跡を行うことに初めて成功した²⁰⁾。凍結切片を測定する際には、クライオジェット (Oxford) を用いて低温窒素ガスを試料に吹き付けることで凍結状態を維持しながら蛍光 X 線イメージング測定を行った。

この凍結法を用いることで、極めて高解像度の XRF イメージングによる元素分布が得られるようになり、元素分布と植物組織構造の解剖学的な位置関係を細胞レベルで測定することが可能となった。しかし、バーチカルスライサーで調製できるのは厚さ 150 μm 程度の切片であるため、この厚みの中には植物の細胞数個が含まれてしまい、厳密に細胞一つにおける分布を得ることは難しい。

そこで、クライオミクロトーム (ライカマイクロシステムズ, 3050S 型) を用いて、厚さ 10~50 μm の凍結切片を作成した (Fig. 7)。凍結切片の厚みを、植物細胞 1 つ分程度にすることにより、より解像度の高い元素の分布図が得られるようになった。この手法では、大まかにメスで切り出した植物組織をモールド (型) に入れて包埋剤で包埋したのちに、液体窒素やドライアイスで冷却しながらヘキササン中で急速凍結を行う。モールドから凍結したブロック状試料を取り出し、クライオミクロトームを使って、切片を作成する。試料の包埋には、凍結組織包埋剤 (OCT コンパウンド) の他にゼラチン、CMC (カルボキシメチルセルロース) 溶液などを用いている。包埋剤の選択やクライオミクロトームで切片を作成する際の設定温度などについては、測定試料ごとに検討し最適な条件を探る必要がある。

上記の試料調製法は、どんな試料にもあてはまるわけではなく、試料によって適切な調製法を選択する必要がある。放射光 X 線マイクロビームの空間分解能を最大限に生かして、蛍光 X 線イメージングを行うためには、地道

な試料調製法の開発が非常に重要な要因であることも事実である。

4. ヒ素を蓄積するモエジマシダ

2001年、イノモトソウ科のモエジマシダ (*P. vittata* L.) をヒ素汚染土壌で栽培すると、高濃度のヒ素を体内に蓄積することが報告され、植物を使った汚染土壌の浄化が注目を集めるようになった。一般的に酸化的な環境においてヒ素は5価で安定であるが、この5価のヒ素を添加してモエジマシダを栽培すると、葉においてヒ素は3価に還元されていることが報告された。3価のヒ素は毒性が高いことから、どこで還元反応が起きているのか、またどのようにモエジマシダはヒ素を輸送しているのか、なぜヒ素による障害が起きないのか、その機構は非常に興味深い。このためヒ素の化学形態について、特に注目が集まり、X線吸収端微細構造 (XAFS) 解析や HPLC/原子蛍光分光システムなどによる研究が進められていた²¹⁻²³⁾。これに対して、ヒ素の分布に関しては、根よりも地上部、特に羽片にヒ素を多く蓄積すること、羽片の中でも先端付近の葉において特にヒ素の蓄積が認められる^{9,10)}など、バルクレベルの知見しか得られていなかった。

そこで、我々はヒ素汚染土壌で栽培したモエジマシダの葉を試料とし、まず葉全体におけるヒ素の分布を調べた²⁴⁾。モエジマシダは葉の辺縁部に孢子嚢をつけるが、中には栄養葉として孢子嚢をつけない葉も存在する。そこで若い葉、成熟葉、栄養葉など、羽片からいくつかの成長段階の葉を選び、分析に供した。測定は Photon Factory BL-4A で行った。

結果の一部を Fig. 8 に示す。青～赤のグラデーションで各元素の蛍光 X 線強度を表し、赤色部は強度が高いことを表す。Fig. 8(a) に見られるように、成熟した葉において、ヒ素は葉の辺縁部において高濃度に蓄積されていることが明らかになった。一方、栄養葉 (Fig. 8(b)) では葉脈においてヒ素が蓄積されている様子が示され、成長段階の異なる葉ではヒ素の分布に違いがあることがわかった。成

熟葉の辺縁部には孢子嚢が着生しているため、葉の切片を作成し、5 μm 程度の放射光 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。その結果、カリウムやカルシウムが葉の辺縁部にある孢子嚢に分布しているのに対し、ヒ素は孢子嚢にはほとんど存在せず、孢子嚢の基部に特に高濃度で蓄積していることがわかった (Fig. 9(d))²⁴⁾。一般的には孢子のような生殖に関わる組織ではリン濃度が相対的に高いことから、リンと同族であるが毒性の高いヒ素は孢子へ移行していないという現象は、植物生理学の観点からも非常に興味深い結果であるといえる。

次に、ヒ素がどのような経路および形態でモエジマシダの体内を移行していくのかを明らかにするために、水耕栽培で生育したモエジマシダにヒ素水溶液を投与し、葉の組織におけるヒ素の分布の経時変化を観察した²⁰⁾。

まず培養液で水耕栽培したモエジマシダを 50 mg L⁻¹ ヒ素水溶液に移し、一定時間経過した個体の成熟した葉から切片を作成し、すばやくドライアイス上で凍結させ、測定試料とした。放射光測定は SPring-8 BL37XU で行った。凍結状態を維持するため、低温窒素ガスを吹きかけながら測定を行った。

ヒ素を添加してから1時間後、12時間後に測定したモエジマシダ孢子嚢周囲のヒ素とカリウムの蛍光 X 線イメージングの結果を Fig. 10 に示す。またデジタル光学顕微鏡による観察像も合わせて示した。約 2 μm のマイクロビームを使い、試料を 3 μm 間隔で走査し、0.3秒/点の計数時間 (トータル約3時間) で二次元の元素分布を得ることができた²⁰⁾。高輝度な X 線を利用することで、短い計数時間で S/N 比の高い測定が実現している。このように、ある一定時間経過した試料を測定することで、時間とともにヒ素の分布が広がっていく様子を可視化することに成功した。ヒ素は投与から1時間後で、既に蒸散流の末端である葉の周縁部に到達していることが初めて明らかになった。また、この部位においてヒ素は通導組織にまず集積し、孢子嚢よりも側糸と偽包膜に優先的に分配されることが判った。このように組織構造との位置関係が明らかになった元素分布を得ることができ、モエジマシダ体内におけるヒ

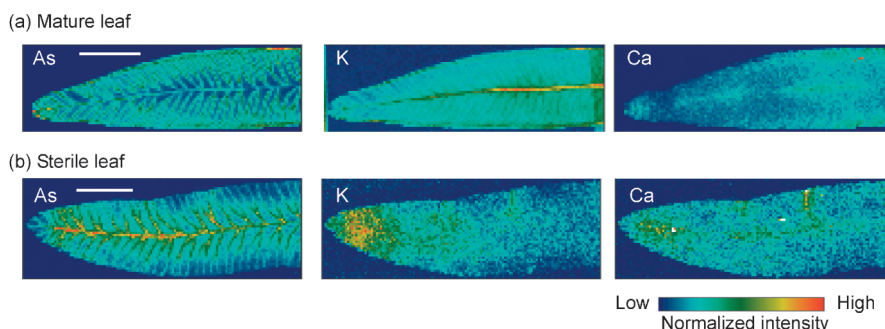


Fig. 8 Elemental distribution in leaves of arsenic accumulator, *P. vittata*, obtained by micro-XRF imaging. (a) mature leaf, (b) sterile leaf. Energy of incident X-ray: 16.5 keV, beam size: 200 \times 200 μm^2 , scan step: 200 μm , measurement time: 3 s/point, measurement point: 115(H) \times 36(V) (a), 125(H) \times 45(V) (b). Scale bar: 5 mm.

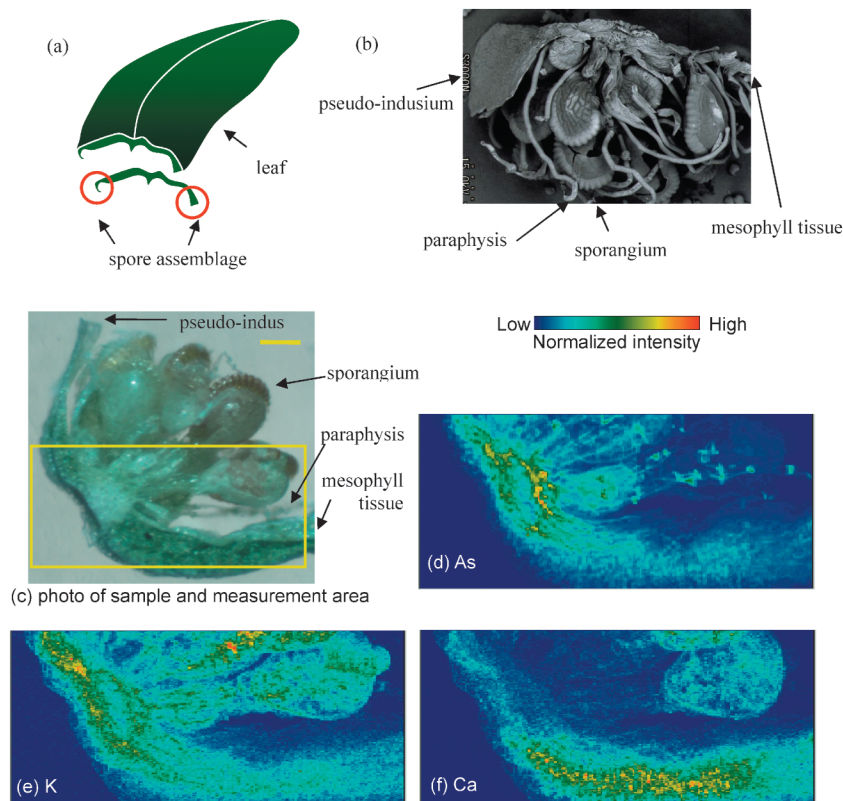


Fig. 9 Results of micro-XRF imaging for marginal area of a leaf for *P. vittata*. (a) diagram for leaves of the fern, (b) SEM image of spore assemblage, (c) optical microscope image of sample and measurement area, (d)–(f) elemental map of As, K, and Ca. Energy of incident X-ray: 14.2 keV, beam size: 5.5 (H) × 3.5 (V) μm^2 , scan step: 5.5 μm (H), 3.5 μm (V), measurement time: 1 s/point, measurement point: 180 (H) × 125 (V). Scale bar: 100 μm .

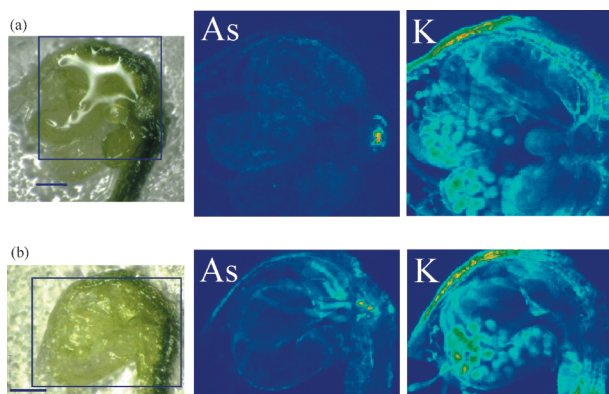


Fig. 10 Change in arsenic and potassium distributions for spore assemblage of *P. vittata* with the passage of time after arsenic addition. (a) 1 h, (b) 12 h. Energy of incident X-ray: 12.8 keV, beam size: 3 × 3 μm^2 , scan step: 3 μm , measurement time: 0.3 s/point, measurement point: 201 (H) × 201 (V) (a), 208 (H) × 151 (V) (b). Scale bar: 150 μm .

素の移行に関する重要な知見が得られた。

一方、植物に吸収されたヒ素の化学状態を調べるため、鉢植えのシダをそのまま生きた状態でヒ素の XAFS 測定に用いた。シダを生きたままの状態での化学状態分析をするため、PF BL-12C のビームラインのハッチ内に栽培した

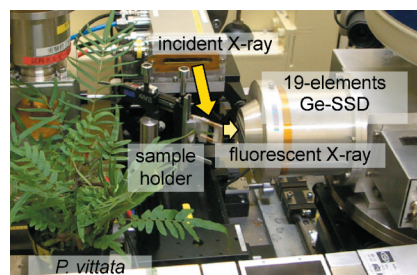


Fig. 11 A photo of in vivo XAFS measurement of *P. vittata* (PF, BL-12C).

鉢植えのシダを持ち込み、生きたまま測定した。測定の様子を **Fig. 11** に示す。ビームサイズは約 1 mm 角程度であり、この空間分解能で各部位の化学状態分析を行うことができる。測定箇所は X 線の照射位置を示すレーザーポインターを使って選択・調整した。また栽培に用いたヒ素汚染土壌も測定に供した。検出器には 19 素子の Ge 半導体検出器^{25,26}を用い、試料から発生する As K α 線を検出する蛍光法で測定した。

ヒ素の XANES 測定結果を **Fig. 12** に示す。モエジマシダの葉柄や中軸においては 3 価と 5 価のヒ素が共存しているのに対し、葉（羽片）ではほとんどのヒ素は 3 価で

存在しており、中軸から葉の基部にかけてヒ素の価数の変化が観察された。このように土壌からシダに取り込まれたヒ素は5価から3価に還元されて、各器官に蓄積している様子が示された。輸送の過程で次第に還元されているのか、それともある特定の組織で還元されているのか、詳細な検討が今後の課題である。少なくとも根においてヒ素が全て3価へ還元されるわけではなく、地上部でも還元作用が働いていることが示された。また羽片ではほとんど全てが3価であることから、中軸から羽片にかけて還元作用が働いている可能性が示唆された。シダに取り込まれたヒ素の90%は葉に蓄積されることから、このヒ素の還元機構とヒ素大量蓄積の関連に興味もたれる。また Fig. 12 (j) でみられるように、古い羽片（やや枯れはじめていた）では、ヒ素は5価で存在していた。羽片が古くなり生理機能が衰えてくると、ヒ素は3価から5価へ酸化される

と考えられる。つまり、モエジマシダは生理機能が活性な間は、ヒ素を3価の状態を保つ機構を持っている。

現在、モエジマシダにおけるヒ素の蓄積機構について、放射光 X 線を使った研究報告が増加している。ヒ素の化学種によって X 線吸収端エネルギーに違いがあることを利用し、選択励起することで化学種別の2次元分布測定も行われている²⁷⁾。モエジマシダの葉において、主なヒ素の化学種は亜ヒ酸イオンであるが、茎から葉へ分配される極一部の領域において、硫黄と結合したヒ素が見出されている。この報告では mm スケールの空間分解能であるため、さらに詳細に検討することで、新たな知見が得られる可能性があるだろう。

5. カドミウムを蓄積するハクサンハタザオ

カドミウムは生物にとって最も有毒な重金属のひとつである。ところがアブラナ科のハクサンハタザオは亜鉛やカドミウムに対する耐性がみとめられ、生育の過程で体内に取り込んだ亜鉛やカドミウムを数千 ppm という高濃度で蓄積していることが見出されている^{28,29)}。一方、イネはカドミウムに耐性を持ち、微量のカドミウムを体内に蓄積する性質を持つ^{30,31)}ため、食品の安全性の面から大きな問題となっている。

このように植物において蓄積されたカドミウムを分析するニーズは高いものの、第二世代の放射光施設では、20 keV 以上の高エネルギー X 線を集光してマイクロビームを得ることは難しく、カドミウムの K 線を直接検出して分析することはできなかった (Cd の K 吸収端エネルギー = 26.7 keV)。そのため Cd を測定する際には、Cd の L 線 ($L\alpha$ 3.1 keV, $L\beta_1$ 3.3 keV) が用いられているが、植物試料の場合には、必須元素で多量に含まれているカリウムの $K\alpha$ 線 (3.3 keV) の妨害により、微量の Cd の分析は困難である。我々は第三世代の放射光施設 SPring-8 の光源を利用することで、高輝度な高エネルギー X 線により Cd の K 線を励起して、植物に蓄積されたカドミウムの *in vivo* 分析を試みた^{32,33)}。

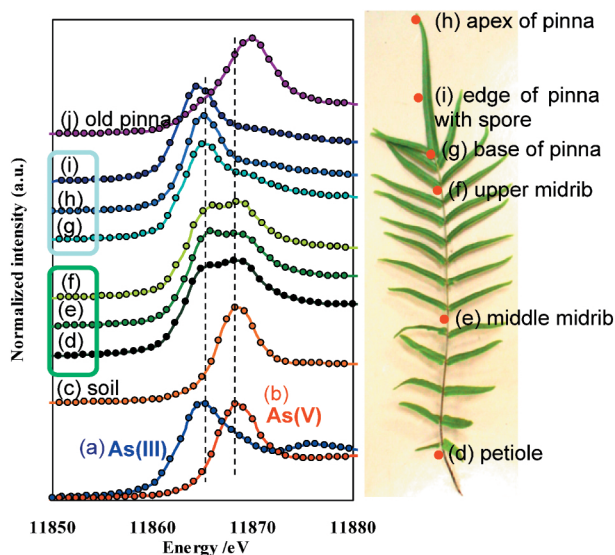


Fig. 12 Arsenic K-XANES spectra for *P. vittata* and reference materials. (a) As_2O_3 , (b) H_3AsO_4 , (c) arsenic contaminated soil, (d) petiole, (e) middle midrib, (f) upper midrib, (g) base of pinna, (h) apex of pinna, (i) edge of pinna with spore, (j) old pinna

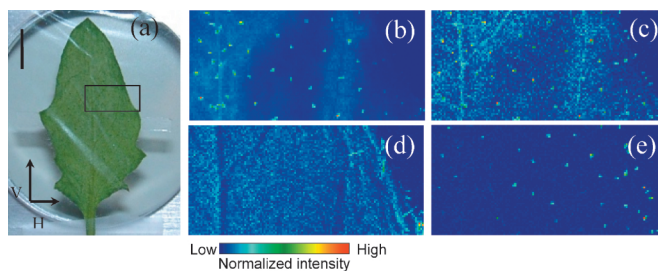


Fig. 13 Miro-XRF imaging of a leaf of *A. halleri*. (a) Photograph of the leaf showing the measured imaging area, scale bar: 5 mm. The two-dimensional distributions of (b) Cd, (c) Zn, (d) Ca, and (e) Mn. Imaging area: 6.5 mm (H) \times 3 mm (V), X-ray energy: 37 keV; beam size: 50 μ m \times 50 μ m, scan step: 50 μ m \times 50 μ m; measurement point: 131 (H) \times 61 (V); measurement time: 0.5 s/point.

Cd を適宜添加した土壌や水耕栽培で生育したハクサンハタザオを測定試料とした。放射光実験は SPring-8 BL37XU で行なった。X 線のエネルギーは Cd の K 線が効率よく励起できる 37 keV とした。検出器には、Si(Li)-SSD を用いた。高エネルギー (37 keV) の X 線に対応した K-B ミラー³⁴⁾により 1 μm 程度のマイクロビームを作成し³⁵⁾, Cd の Kα 線を検出して高感度なイメージングを行った。またマイクロビーム分析に先立ち、4 象限スリットで作成した 50 μm 角のビームを試料に照射して、葉全体における Cd の蛍光 X 線イメージングを行った。

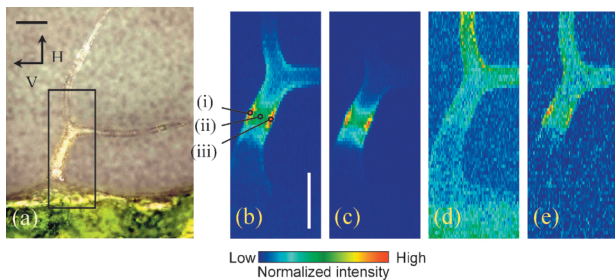


Fig. 14 Micro-XRF imaging of trichome. (a) photograph of the measured samples showing the imaging area, (b) Cd, (c) Zn, (d) Ca, and (e) Mn. Imaging area: 204 μm(H) × 81 μm(V), beam size: 3.8 μm(H) × 1.3 μm(V), step size: 3 μm(H) × 1 μm(V), measurement time: 0.3 s/point. (i)-(iii) points measured by μ-XANES of Cd. The scale bar is 50 μm.

葉におけるカドミウムの XRF イメージングの結果を **Fig. 13** に示す。葉の写真と測定部位を **Fig. 13 (a)** に, Cd, Zn, Ca, Mn の元素分布を **(b)-(e)** に示した。カドミウムの分布は局在化しており, 亜鉛やマンガンと同様に, 葉表面にある毛状突起組織であるトライコームにおいて蓄積されていることが, 初めて直接的に明らかとなった。

このトライコームを光学顕微鏡下で葉から切り取り, マイクロビームによる計測に供したところ, その付根の節においてカドミウム強度が強いことが示された (**Fig. 14**)。トライコームは単細胞であるといわれていることから, このデータは細胞内におけるカドミウムの局在化を可視化しているといえよう。 **Fig. 13, 14** で得られた Cd と Zn, Mn の強度の相関図を **Fig. 15** に示す。葉全体において Cd と Zn の分布には, ある程度の相関は見られるものの (**Fig. 15 (a)**), Cd と Mn の相関はほとんど見られない (**Fig. 15 (b)**)。一方, トライコームにおいては, Cd と Zn には高い正の相関があり (**Fig. 15 (c)**), Cd と Mn の相関係数も高い (**Fig. 15 (d)**)。Cd と Mn の分布に相関が見られる原因は現時点ではよくわからないが, Cd と Zn は同族元素であり, 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といえよう。このような Cd, Zn や Mn の分布は, カルシウムがトライコーム先端に分布している (**Fig. 14 (d)**) ことと対照的であり, その蓄積機構は非常に興味深い。

さらに X 線マイクロビームを用いてカドミウムの K 吸

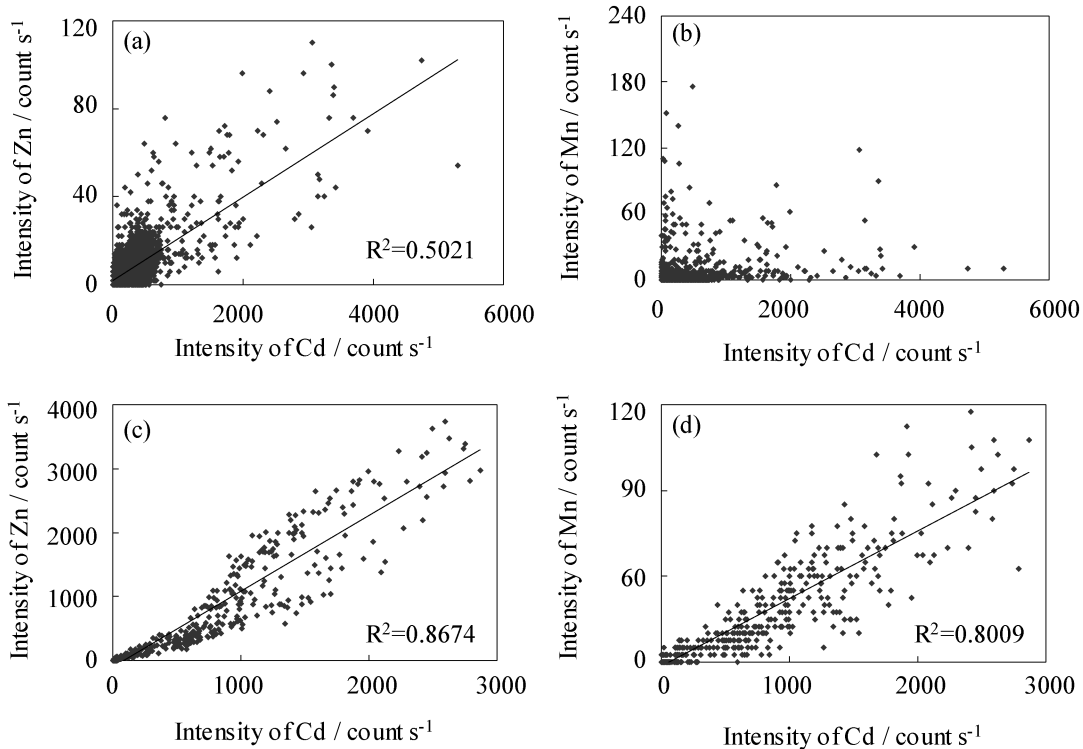


Fig. 15 Correlation between XRF intensities of (a) Cd vs. Zn and (b) Cd vs. Mn in the leaf of *A. halleri*, and (c) Cd vs. Zn, and (d) Cd vs. Mn in the trichome. The XRF data shown in Figs. 13 and 14 were used in the plots.

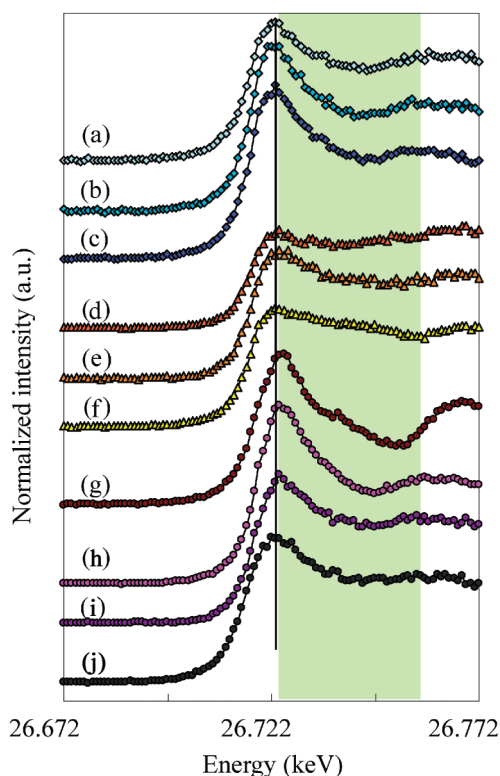


Fig. 16 Cadmium K-edge μ -XANES spectra for the trichome of *A. halleri* and the reference compounds. (a) Point (i), (b) point (ii), (c) point (iii) of the trichome sample shown in Fig. 14(b). (d) PC-Cd, (e) MT-Cd, (f) CdS, (g) CdO, (h) Cd(NO₃)₂ aq, (i) AcCd, (j) (Im)₆Cd(NO₃)₂. Beam size: 3.8 μ m (H) \times 1.3 μ m (V), energy step: 1 eV, and measurement time: 1–4 s/point.

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、参照とする Cd 化合物のスペクトルとの比較により、トライコームに蓄積された Cd は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 (Fig. 16)。

このように高エネルギーの放射光 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考えられていたが、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。

またカドミウムの化学形態を詳細に解明するため、ハクサンハタザオを部位別 (根、茎、葉) に採取し、それぞれ凍結乾燥後、均一な錠剤形状の試料を作成して、Cd の K-XAFS スペクトルを測定した。広域 X 線吸収微細構造 (EXAFS) 解析の結果から、いずれの部位においても Cd は酸素と結合しており、カルボキシル基をもつような有機酸との結合であることがわかった。同じアブラナ科のカラ

シナの導管液では Cd は O か N と結合し、根では S と結合していると報告されており³⁶⁾、このような植物種による Cd の化学形態の違いは、蓄積機構の差を反映している可能性がある。

6. 世界的な研究の状況

放射光 X 線マイクロビームを用いる蛍光 X 線 2 次元イメージング技術は、PF の初期から開発が行われている。最近の第三世代の大型放射光施設の利用により、ますます小さく X 線を集光することが可能になり、ナノビームの時代が現実になってきた。また次世代放射光源として期待されている X 線自由電子レーザーの利用が 2011 年に SPring-8 で始まる。従来の 1 億倍の輝度である。現在、この自由電子レーザーに対応する集光素子の開発が進んでいる³⁷⁾。マイクロビーム X 線分析技術は、新しい光源を得て著しく進歩するだろう。

ここで紹介したように、現在では、金属メッシュを用いてビームサイズを評価するデモンストレーションではなく、実際の研究対象試料に対し、実用レベルで 1 μ m をきる空間分解能の元素マッピングが可能となったことから、測定結果から「何がわかるのか」という点が重要になってきている。この点において、今後は異分野の研究者同士の協力が欠かせない。重金属蓄積植物に関しては、欧州では ESRF、アメリカでは ALS, NSLS を利用して、多くの研究成果が出ている。これは X 線分析の専門家と植物生理学者がうまく連携していることの現れではないだろうか。

わが国では、日本土壌肥料学会や日本植物生理学会で、放射光を利用した植物試料の微量元素分析のシンポジウムが開催され、少しずつ連帯の和が広がりつつある。今後、重金属蓄積植物におけるナノスケールやオルガネラレベルにおける元素分布や化学形態を理解するためには、超集積性を持たない植物と比較をし、特定の部位で発現する遺伝子やタンパク質の機能と、マイクロビーム X 線分析により得られた元素分布との関連についての考察が鍵となるであろう。

7. おわりに

このように、放射光を利用したマイクロビーム X 線分析は植物中の重金属元素の非破壊分析に大変威力を発揮する手法であり、植物中のヒ素やカドミウムの蓄積部位と化学形態を世界で初めて細胞レベルで明らかにすることができた。今後も放射光を利用して、様々な重金属蓄積植物における重元素の蓄積機構の解明を行っていきたい。

謝辞

本研究の実施にあたっては、理化学研究所の阿部知子氏、吉田茂男氏から植物の栽培や生理機構について適切な

助言と多大な協力をいただいた。PF の放射光実験に関しては、高エネルギー加速器研究機構の飯田厚夫氏に多くの技術的なご支援をいただいた。また現在行なっているタバコ植物におけるカドミウム蓄積機構の研究においては、京都大学生存圏研究所の原田英美子氏に多くの助言をいただいている。この場を借りて謝意を表す。本研究の成果は、SPRING-8 の研究課題 (2005A0542-NXb-np, 2005A0543-NXb-np-Na, 2006A0180, 2006A1686) および PF の研究課題 (2004A G332, 2007G638) によるものである。研究費の一部は、科学研究費補助金 (20612008) の補助を受けた。

参考文献

- 1) H. J. M. Bowen 著, 浅見輝男, 茅野充男訳: 環境無機化学—元素の循環と生化学: 博友社 (1984).
- 2) H. L. Cannon: *Science* **132**, 591 (1960).
- 3) I. Raskin and B. D. Ensley (ed): *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*, John Wiley & Sons, Inc. (1999).
- 4) L. Q. Ma, K. M. Komar, C. Tu, W. Zhang, Y. Cai and E. D. Kennelley: *Nature* **409**, 579 (2001).
- 5) Edenspace System Corporation, <http://www.edenspace.com/products/envirosolutions.html>
- 6) 北島信行: モエジマシダによるヒ素浄化, “メタルバイオテクノロジーによる環境保全と資源回収—新元素戦略の新しいキーテクノロジー—”, 植田充美, 池道彦監修, シーエムシー出版, 84 (2009).
- 7) M. J. Stillman, C. F. Shaw III, K. T. Suzuki (ed): *Metallothioneins: Synthesis, Structure and Properties of Metallothioneins, Phytochelatin and Metal-Thiolate Complexes*, Wiley-VCH (1992).
- 8) L. Taiz, E. Zeiger (ed): *Plant Physiology*, Sinauer Associates Inc. (2002).
- 9) E. Lombi, F.-J. Zhao, M. Fuhrmann, L. Q. Ma and S. P. McGrath: *New Phytologist* **156**, 195 (2002).
- 10) W. Zhang, Y. Cai, C. Tu and L. Q. Ma: *Sci. Total Environ.* **300**, 167 (2002).
- 11) 保倉明子, 中井 泉: *ぶんせき* **11**, 622 (2005).
- 12) 小沼亮子, 中井 泉: *化学と生物* **44**, 517, 860 (2006).
- 13) Y. Terada, S. Goto, N. Takimoto, K. Takeshita, H. Yamazaki, Y. Shimizu, S. Takahashi, H. Ohashi, Y. Furukawa, T. Matsushita, T. Ohata, Y. Ishizawa, T. Uruga, H. Kitamura, T. Ishikawa and S. Hayakawa: *AIP Conference Proceedings* **705**, 376 (2004).
- 14) 大橋治彦, 平野馨一編: 放射光ビームライン光学技術入門—はじめて放射光を使う利用者のために, 日本放射光学会 (2008).
- 15) A. Iida and T. Noma: *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B* **82**, 129 (1993).
- 16) H. Mimura, H. Yumoto, S. Matsuyama, Y. Sano, K. Yamamura, Y. Mori, M. Yabashi, Y. Nishino, K. Tamasaku, T. Ishikawa and K. Yamauchi: *Appl. Phys. Lett.* **90**, 051903 (2007).
- 17) Y. Suzuki, A. Takeuchi and Y. Terada: *Rev. Sci. Instrum.* **78**, 053713 (2007).
- 18) S. Matsuyama, H. Mimura, K. Katagishi, H. Yumoto, S. Handa, M. Fujii, Y. Sano, M. Shimura, M. Yabashi, Y. Nishino, K. Tamasaku, T. Ishikawa and K. Yamauchi: *Surf. Interface Anal.* **40**, 1042 (2007).
- 19) 中井 泉編: 蛍光 X 線分析の実際, 朝倉書店 (2005).
- 20) N. Kitajima, T. Kashiwabara, N. Fukuda, S. Endo, A. Hokura, Y. Terada and I. Nakai: *Chem. Lett.* **37**, 32 (2008).
- 21) S. M. Webb, J.-F. Gaillard, L. Q. Ma and C. Tu: *Environ. Sci. Technol.* **37**, 754 (2003).
- 22) W. Zhang, Y. Cai, K. R. Downum and L. Q. Ma: *J. Chromatography A* **1043**, 249 (2004).
- 23) C. Tu, L. Q. Ma, W. Zhang, Y. Cai and W. G. Harris: *Environ. Pollution* **124**, 223 (2003).
- 24) A. Hokura, R. Onuma, Y. Terada, N. Kitajima, T. Abe, H. Saito, S. Yoshida and I. Nakai: *J. Anal. At. Spectrom.* **21**, 321 (2006).
- 25) M. Nomura: “Design and performance of a multi-element SSD for fluorescent XAFS”, KEK Report 98-4 (1998).
- 26) M. Nomura: *J. Synchrotron Rad.* **5**, 851 (1998).
- 27) I. J. Pickering, L. Gumaelius, H. H. Harris, R. G. Prince, G. Hirsch, J. A. Banks, D. E. Salt and G. N. George: *Environ. Sci. Technol.* **40**, 5010 (2006).
- 28) H. Kubota and C. Takenaka: *Int. J. Phytoremediat.* **5**, 197 (2003).
- 29) H. Kupper, E. Lombi, F. J. Zhao and S. P. McGrath: *Planta* **212**, 75 (2000).
- 30) 永山裕之, 小沼亮子, 保倉明子, 中井 泉, 松田賢士, 水平 学, 赤井孝夫: *X 線分析の進歩* **36**, 235 (2005).
- 31) 食品中のカドミウムに関する情報, 農林水産省, http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_cd/index.html
- 32) A. Hokura, R. Onuma, N. Kitajima, I. Nakai, Y. Terada, T. Abe, H. Saito and S. Yoshida: *Proc. 8th Int. Conf. X-ray Microscopy, IPAP Conference series* **7**, 323-325 (2006).
- 33) N. Fukuda, A. Hokura, N. Kitajima, Y. Terada, H. Saito, T. Abe and I. Nakai: *J. Anal. At. Spectrom.* **23**, 1068 (2008).
- 34) A. Takeuchi, Y. Suzuki, Y. Terada and M. Awaji: *SPRING-8 User Experiment Report 2004B*, p. 125 (2004).
- 35) Y. Terada, A. Takeuchi and Y. Suzuki: *SPRING-8 User Experiment Report 2005A*, p. 170 (2005).
- 36) D. E. Salt, R. C. Prince, I. J. Pickering and I. Raskin: *Plant Physiol.* **109**, 1427 (1995).
- 37) H. Mimura, S. Morita, T. Kumura, D. Yamakawa, W. M. Lin, Y. Uehara, S. Matsuyama, H. Yumoto, H. Ohashi, K. Tamasaku, Y. Nishino, M. Yabashi, T. Ishikawa, H. Ohmori and K. Yamauchi: *Rev. Sci. Instrum.* **79**, 083104 (2008).
- 38) E. Bulska, I. A. Wysocka, M. H. Wierzbicka, K. Proost, K. Janssens and G. Falkenberg: *Anal. Chem.* **78**, 7616 (2006).
- 39) K. Vogel-Mikuš, P. Pongrac, P. Kump, M. Nečemer, J. Simčič, P. Pelicon, M. Budnar, B. Povh and M. Regvar: *Environ. Pollution* **50**, 147 (2007).
- 40) S. Ito, N. Sazui, N. Kawachi, N. S. Ishioka and S. Fujimaki: *Proc. International Plant Nutrition Colloquium XVI*, 1238 (2009).
- 41) M. R. Hanson and R. H. Köhler: *J. Exp. Bot.* **52**, 529 (2001).
- 42) R. Stelzler and H. Lehmann: *Plant and Soil* **155/156**, 33 (1993).

● 著者紹介 ●



保倉明子

東京電機大学工学部環境化学科・准教授
E-mail: hokura@mail.dendai.ac.jp

専門：分析化学，環境化学

【略歴】

1997年東京理科大学大学院理学研究科化学専攻博士課程修了，博士（理学）。1997年日本学術振興会特別研究員(PD)，2000年科学技術振興事業団科学技術特別研究員，2001年10月東京理科大学理学部応用化学科助手。同助教，講師を経て，2009年2月早稲田大学高等研究所客員講師。同年4月より現職。



寺田靖子

勸高輝度光科学研究センター・主幹研究員

E-mail: yterada@spring8.or.jp

専門：結晶化学

【略歴】

1998年東北大学大学院理学研究科化学専攻博士後期課程修了。理学博士。東京理科大学理学部助手を経て，現在，勸高輝度光科学研究センター放射光研究所主幹研究員。高エネルギー放射光 X 線分析法の応用などの研究に従事。



北島信行

株式会社フジタ 技術センター・主任研究員

E-mail: nkitajima@fujita.co.jp

専門：植物生理学，栽培学

【略歴】

2008年東京理科大学大学院理学研究科化学専攻博士後期課程修了，博士(理学)。1989年フジタ工業株式会社（現 株式会社フジタ）入社，2002年株式会社フジタ技術センター 主任研究員。



中井 泉

東京理科大学理学部応用化学科・教授

E-mail: inakai@rs.kagu.tus.ac.jp

専門：分析化学，物質史

【略歴】

1980年筑波大学化学研究科博士課程修了，理博。同学助手，講師を経て，94年東京理科大学理学部応用化学科助教授，98年同教授，2005年よりグリーン光科学技術研究センター長併任。

Study on accumulation mechanism for heavy metal in hyper-accumulating plants by synchrotron radiation X-ray analysis

Akiko HOKURA

Tokyo DENKI University, School of Engineering, Department of Green Sustainable Chemistry, 2-2 Kanda-Nishikicho, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8457, Japan

Nobuyuki KITAJIMA

Fujita Corporation, Technology Development Division, 2025-1 Ono, Atsugi, Kanagawa 243-0125, Japan

Yasuko TERADA

Japan Synchrotron Radiation Research Institute (JASRI), 1-1-1, Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5198, Japan

Izumi NAKAI

Tokyo University of Science, Faculty of Science, Department of Applied Chemistry, 1-3 Kagurazaka, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8601, Japan

Abstract Some plants accumulate heavy metal elements such as As, Cd, and Pb, etc., and these plants have been focused on from the perspective of their application to phytoremediation. In order to understand the accumulation mechanism, the distribution and the chemical form of heavy metal should be revealed at cellular level. Here, we have introduced the recent works regarding arsenic hyperaccumulating fern (*Pteris vittata* L.) and cadmium hyperaccumulating plant (*Arabidopsis halleri* ssp. *gemmifera*). A combination of μ -XRF and μ -XANES techniques excited by high-energy X-ray microbeam with 1 μ m resolution has proved to be an indispensable tool for the study of Cd accumulation in biological samples on a cellular scale. The sample-preparation techniques were also summarized.