

実施課題番号：2005B0806

実施課題名：ヒ素高集積植物の根における元素吸収・移行過程の解明

実験責任者所属機関及び氏名：株式会社フジタ技術センター環境研究部 北島信行

使用ビームライン：BL37XU

実験結果：

1. 目的

イノモトソウ属のシダ植物であるモエジマシダ (*Pteris vittata* L.) はその体内にヒ素を高濃度で吸収・蓄積できる能力を持っており、植物を用いた汚染の低減・除去（植物浄化）に対しての活用が期待されている。モエジマシダによる As の高集積という現象には、根による吸収、通導組織を介した移行、地上部における蓄積という過程が存在している。高集積を可能にしている機構を理解するためには、植物体の各部位・各過程を対象とした調査結果を植物体全体の高集積システムとして再構成していく必要がある。言うまでもなく植物による物質吸収の最前線は根であり、根における As 分布とその化学状態についての知見は、植物体全体としての As 高集積機構を解明する上で必要不可欠な事柄である。こうした知見は、植物生理として大変に興味深いものであり、実際のファイトレメディエーションにおける栽培管理や浄化予測に資するものと考えている。

しかし、植物体組織の中でも根は含水率が 80%程度と高く軟弱な組織であり、地上部と違って表皮にクチクラ層を持たないために乾燥しやすい。従って、生のままでは構造を保った状態での切片調製と分析が極めて困難である。そこで、根組織の構造を壊さずにハンドリングの良い分析試料を得る方法を 2 種類検討した。

まず、採取後速やかにドライアイス上で凍結した根を、カミソリ刃を用いて切断して厚さ 150~200 μm の切片とした後に凍結乾燥にかけて分析用の試料とした（凍結乾燥切片）。ついで、凍結した根をコンパウンドに包埋し、クライオミクロトームにて厚さ 20 μm の薄片試料とし、凍結状態を維持したまま測定する手法を検討した（凍結切片）。これら 2 種類の試料調製法による切片を用いて根の横断面における $\mu\text{-XRF}$ イメージングと $\mu\text{-XANES}$ によるヒ素の価数評価を実施した。

2. 実験

1) 試料の準備

モエジマシダは市販の栽培用土に孢子を散布し 6 ヶ月間育成したものから、生育が良好かつ均一な個体を選び、根に付着した用土を注意深く洗い落とし後に水耕栽培に移した。As の投与に先立ち、As を含まない培養液で 2 週間の栽培を行い、新しい根の発根・伸長を確認した上で培養液を As 含有水溶液に交換した。投与した As 濃度は 5mg/L (KH_2AsO_4 にて調製) とし、1 週間の投与期間の後に根を採取して測定のための凍結乾燥切片、凍結切片を作成した。凍結乾燥切片の調製では根の表面に直接刃を当てるため、根毛密度の高い根の基部と先細りの形状である根端では平滑な断面の試料が得られにくく、根全長の中央部分から採取した切片を測定試料とした。これに対してクライオミクロトームでの切片調製では、コンパウンド包埋によって容易に連続切片を得られることから、根端、中央部分、根の基部から採取した切片を測定に供した。

2) 放射光マイクロビームによる蛍光 X 線分析

XRF 分析は SPring-8 の BL37XU にて実施した。エネルギー 12.8 keV の X 線を K-B ミラーによって 1 μm 程度のサイズ（凍結乾燥切片の測定時は 1.1 μm × 1.3 μm 、凍結切片では 1.1 μm × 2.3 μm ）に集光し、 $\mu\text{-XRF}$ イメージングと $\mu\text{-XANES}$ によるヒ素の価数評価を実施した。凍結乾燥切片では、室温での測定が可能であるが、凍結切片では融解させると細胞構造が壊れてしまうため、試料ホルダーを液体窒素で冷却することで切片の凍結状態を維持しながら測定を実施した。

3. 結果

Fig. 1に凍結乾燥切片における蛍光X線イメージングの結果を試料断面の光学顕微鏡像とともに示した。光学顕微鏡像中の枠は蛍光X線によるイメージングを行った範囲であり、イメージングの結果として、Asの他にK, Fe, Cu, Znといった植物にとっての必須栄養元素の測定結果も合わせて示した。Asのイメージングの図から分かるように、Asは根の断面全体にわたって検出された。表皮の直ぐ内側にある比較的大型の細胞では内部に線状のAsの分布が認められたが、全体としては主に細胞壁に沿った形での分布が得られ、特に表皮において蛍光X線強度の高い部分が認められた。Fig. 2には、根の表皮から中心柱に向けて選択した8測定点（スペクトル図の右に配置したAsのイメージング像中に矢印とそれに対応させた数字で示した）におけるXANESスペクトルを、参照試料（ As^{3+} : As_2O_3 , As^{5+} : H_3AsO_4 ）のものとあわせて示した。Fig. 2に示したXANESスペクトルの中で測定点1、2、3のものは根の表皮に相当する領域から得られたデータである。これら3点のスペクトルについて、3価のAsに由来すると見られるピークが低エネルギー側で観察されたが、5価のAsに由来すると判断される高エネルギー側のピークが圧倒的に高いことから、表皮に分布するAsは5価が主体であると考えられる。中心柱内部の測定点7、8においても3価と5価のAsが共存していたが、全体的な傾向として根の中心に向かうに従って5価のAsに対する3価のAsの比率が高くなっており、特に測定点4と5の間でK吸収端のシフトが大きく低エネルギー側に、すなわち3価の側に变化していた。このように参照試料と実試料断面における8測定点のXANESスペクトルを比較した結果から、5価のヒ酸として与えたヒ素が、吸収直後の表皮においても速やかに3価に還元されることが明らかとなり、特に中心柱の周囲にある細胞層で相対的に高いAs還元能が存在している可能性が示された。

Fig. 3には凍結切片に対するヒ素の蛍光X線イメージングの結果を採取部位ごとに示した。凍結乾燥切片の測定では、表皮の直ぐ内側にある比較的大型の細胞では内部に線状のAs分布が認められたが非常に不明瞭なものであった。これに対して、凍結切片の測定では細胞内部のヒ素分布をオルガネラレベルで明瞭に観察することができた。凍結切片は放射光マイクロビームの高い空間分解能を活かすことのできる測定試料であることが分かった。また、採取部位ごとの測定結果を比較すると、通導組織外周の組織において、根の先端から100 μm の位置では主として細胞内にヒ素が存在していたが、そこから上の部位（根の中央部分、根の基部）では細胞壁に相当する部分にヒ素が集積しており、根の構造発達に応じたヒ素分布の違いが認められた。

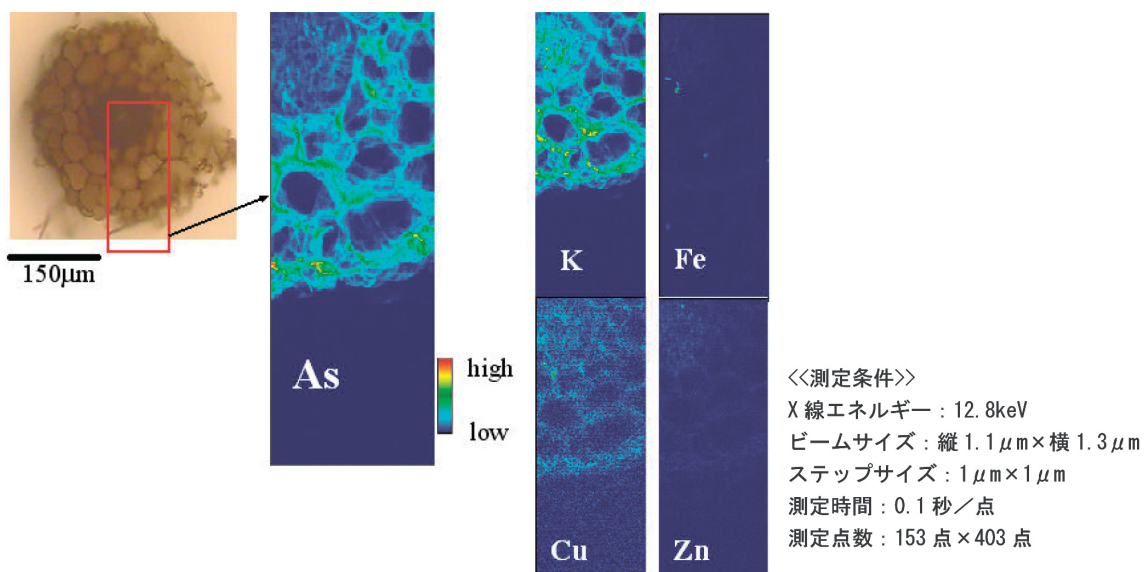


Fig. 1 凍結乾燥切片の蛍光X線イメージング結果

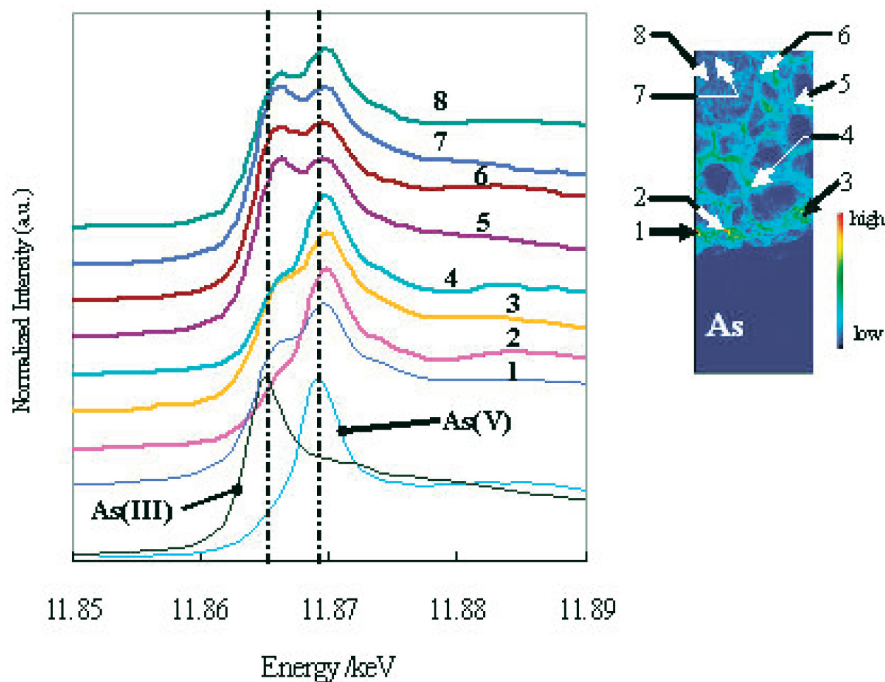


Fig. 2 凍結乾燥切片の As K-XANES スペクトル測定結果
 数字はスペクトルの測定点で、右のイメージング
 像中にその場所を矢印で示した。

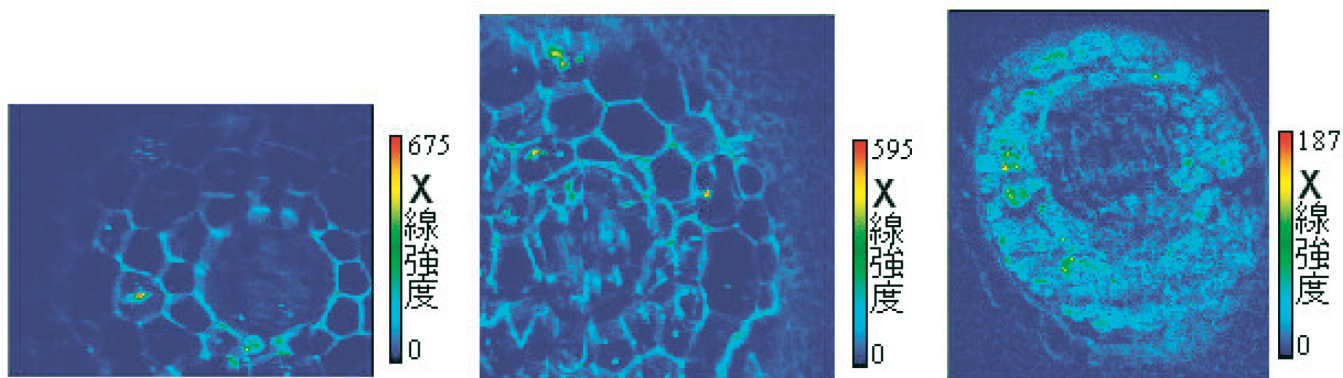


Fig. 3 凍結切片のヒ素の蛍光 X 線イメージング結果
 左から根の基部、中央、根端（先端から 100 μm ）

<<測定条件>>

X 線エネルギー：12.8keV

ビームサイズ：縦 1.1 μm × 横 2.3 μm

ステップサイズ：1 μm × 1 μm

測定時間：0.1 秒/点

測定点数：左 301 × 256 点

中央 276 × 266 点

右 251 × 281 点