

μ-XRF および μ-XAFS を用いた環境浄化植物モエジマシダにおける ヒ素蓄積機構の解明

Study on the accumulation mechanism of arsenic in the hyper-accumulator plant, Chinese fern, by using μ-XRF imaging and μ-XAFS

保倉明子^a、柏原輝彦^a、小沼亮子^a、福田直樹^a、遠藤 哲^a、

齊藤篤子^a、中井 泉^a、北島信行^b、寺田靖子^c

Akiko Hokura^a, Teruhiko Kashiwabara^a, Ryoko Onuma^a, Naoki Fukuda^a, Satoshi Endo^a,

Atsuko Saito^a, Izumi Nakai^a, Nobuyuki Kitajima^b, Yasuko Terada^c

^a 東京理科大学理学部、^b フジタ、^c 高輝度光科学研究センター

^a Faculty of Science, Tokyo University of Science, ^b Fujita Co., ^c JASRI SPring-8

ヒ素を高濃度に蓄積することで知られているモエジマシダの前葉体を試料とした。NaH₂AsO₄ を添加した培地で栽培を行った。単色化した X 線を Kirkpatrick-Baez ミラーで集光して得られたマイクロビーム（ビームサイズ 1.5×1.5 μm²）を試料に照射して蛍光 X 線を検出し、ヒ素、カリウム、カルシウム、鉄のイメージングを行った。ヒ素の蓄積が認められた部位について、さらに μ-XANES 測定を行い、ヒ素の状態分析を行った。その結果、前葉体の細胞におけるヒ素の蓄積が明瞭に観察され、その化学状態は培地に添加したヒ素と同様に 5 価であることが明らかになった。

Microbeam synchrotron-radiation X-ray fluorescence (μ-SR-XRF) analysis was applied to Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.), which was known as the arsenic Hyperaccumulator contained large amounts of arsenic, in order to reveal the distributions of elements in the plant's tissues and cells. Prothallia of the fern were subjected to this analysis and both their physiology and their accumulation mechanism were investigated. The chemical speciation of arsenic at the cellular level was also carried out by XANES analysis utilizing the microbeam. The results showed that the prothallia took up arsenic from the cultivation medium and accumulated arsenic inside their cells in the As(V) form.

背景と研究目的

最近、植物を用いて環境修復を行うファイトレメディエーション” Phytoremediation” が低コスト・低環境負荷型浄化技術として注目

されている。これは植物が生育土壌から水や無機成分を摂取する力を利用して汚染土壌の改質を行う技術で、対象の汚染が重金属元素の場合には、それらを植物体内に蓄積させる

ことで、土壌の浄化を行うものである。¹⁾ 2001 年、イノモトソウ科のモエジマシダ (*Pteris vittata* L.) はヒ素汚染土壌で生育すると、乾燥重量あたりのヒ素濃度に換算して $22000 \mu\text{g g}^{-1}$ という非常に高濃度のヒ素を蓄積することが初めて見いだされ、²⁾ ファイトレメディエーション技術実用化の切り札として期待が高まっている。このように植物による重金属汚染除去を効率よく行うため、汚染元素を高濃度に蓄積する植物の探索と遺伝子組み換えによる植物作出などのバイオエンジニアリングが行われている。しかし、これらの重金属超集積性植物 (hyperaccumulator) が毒性元素を高濃度に蓄積する生理機構については未解明の点が多い。これは植物などの生体試料を非破壊で分析する手法が限られていたことが原因のひとつといえる。この点で、放射光を利用した分析は *in vivo*, *in situ* 測定が可能であり、植物を生きたままの状態で測定できることから、生理機能を理解するうえで重要な知見を直接与えることが期待される。我々は、放射光マイクロビームを用いた蛍光 X 線分析と X 線吸収微細構造(XAFS)解析法により、植物細胞レベルでこれら毒性元素の蓄積部位とその化学形態を明らかにし、その蓄積機構を解明することを目的として研究を行っている。³⁻⁵⁾ 本研究では、SPring-8 の X 線マイクロビームを線源とする蛍光 X 線分析 (XRF) により、モエジマシダの前葉体でヒ素がどこに蓄積しているか、またどのような化学形態で存在しているのかを細胞レベルで解明し、重金属蓄積メカニズムについて考察を加えることを目的とした。生きた状態に近い試料についてヒ素の化学状態を測定するのは初めての試みである。

実験

モエジマシダ [*P. vittata* L.] の前葉体を試料とした。シダ胞子体の前身である前葉体は、細胞がシート状にならんでおり、厚みは細胞一つ分である。ヒ素を $200 \mu\text{mol dm}^{-3}$ 添加した寒天培地で前葉体を 20 日間培養した。ヒ素濃度の調整には NaH_2AsO_4 の試薬を用いた。培養した前葉体は、等張液で三度洗浄し、直ちにアクリル板 (大きさ $4 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$ 、厚さ $200 \mu\text{m}$) の穴 $3 \text{ mm}\phi$ に寒天と一緒に包埋し両面を $4 \mu\text{m}$ 厚のマイラー膜で封入し、測定試料とした。

測定は SPpring-8 BL37XU にて行った。アンジュレーター光を Si(111)二結晶分光器で単色化し、Kirkpatrick-Baez (K-B) ミラーで $1 \mu\text{m}$ 程度に集光した X 線を試料に照射し、試料ステージを走査して、まず含有元素の蛍光 X 線 2 次元イメージングを行った。次に蓄積がみとめられた点において、ヒ素の K 吸収端 (11.863 keV) のマイクロ XANES 測定を行なった。入射 X 線のエネルギーを $11.91\text{-}11.85 \text{ keV}$ の範囲で 1 eV ずつ走査し、試料から発生するヒ素の $\text{K}\alpha$ 線を SDD (Silicon Drift Detector) で検出した。

結果と考察

約 $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ のビームを用いて、モエジマシダ前葉体におけるヒ素の分布が得られた。十分な強度が得られたヒ素と必須元素である Fe についての結果を Fig. 1 に示す。各点は、得られた蛍光 X 線強度を入射 X 線強度 I_0 で規格化した値を示す。一点あたりの積算時間は 5 秒とした。図に見られるように、前葉体の細胞にヒ素が蓄積されている様子が明らかとなった。また鉄と同様の分布を示しており、

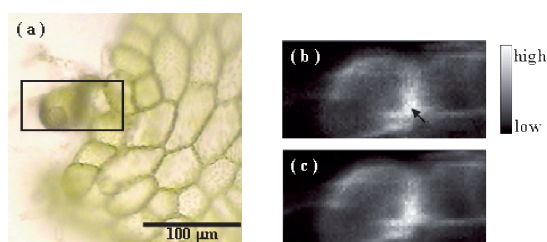


Fig.1 Prothallium of *P. vittata* (a) and SR-μ-XRF imaging of arsenic (b) and iron (c). The square shown in photograph is the measured area of the XRF imaging. The elemental map was illustrated based on the XRF intensity normalized by I_0 . The arrow shown in (b) was the measurement point of μ-XANES.

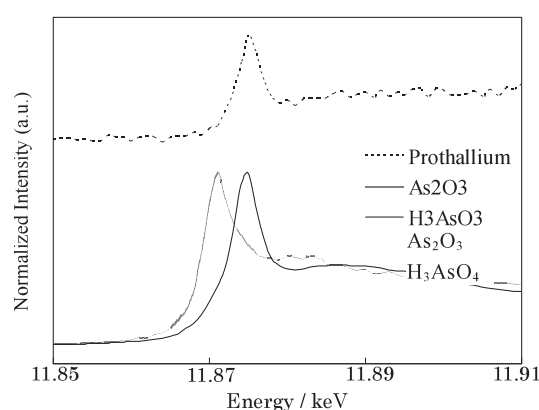


Fig.2 Arsenic K-edge XANES spectrum of *P. vittata* prothallium. The beam size was $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}^2$. The measurement point is shown by the arrow in Fig. 1(b). The XANES spectra of As_2O_3 and H_3AsO_4 were measured as the reference materials of As(III) and As(V), respectively.

大変興味深い。

このように Fig. 1 でヒ素の蓄積が認められた部位において、μ-XANES 測定を行なった結果を Fig. 2 に示す。図に見られるように、前葉体に蓄積されたヒ素は 5 価で存在していることが明らかとなった。培地に添加したヒ素は 5 価であるので、前葉体に取り込まれた後、ヒ素の価数は変化していないということがわかった。

一方、成長した胞子体のモエジマシダの場合、蓄積しているヒ素の価数は 3 価であることが報告されている。本研究により、前葉体

に蓄積されたヒ素の価数は 5 価であったことから、前葉体と胞子体とは、異なる蓄積機構を有する可能性が示唆された。このように、本研究では、ヒ素の超蓄積植物であるモエジマシダ前葉体に対して、SR-μ-XRF イメージングと μ-XANES を併用し、植物体内に吸収された後の重金属の蓄積部位と化学形態を観察することに成功した。植物細胞はその構成要素、元素分布、元素の化学状態の複雑さから未解明部分が多く、様々な条件で栽培した植物試料について本手法を用いることで、重金属蓄積のメカニズムを解明することが期待される。

参考文献

- 1) I. Raskin and B.D. Ensley: *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*, John Wiley & Sons, Inc. (1999).
- 2) L.Q. Ma, K.M. Komar, C. Tu, W. Zhang, and Y. Cai, *Nature*, **409**, 579 (2001).
- 3) N. Kitajima, R. Onuma, A. Hokura, I. Nakai, Y. Terada: *Proceedings of XRM2005, IPAP Conference series*, in press.
- 4) R. Onuma, A. Hokura, N. Kitajima, I. Nakai, Y. Terada, T. Abe, H. Saito, S. Yoshida: *Proceedings of XRM2005, IPAP Conference series*, in press.
- 5) A. Hokura, R. Onuma, N. Kitajima, I. Nakai, Y. Terada, T. Abe, H. Saito, S. Yoshida: *Proceedings of XRM2005, IPAP Conference series*, in press.

キーワード

・ファイトレメディエーション(phytoremediation)

植物が環境汚染物質を蓄積・分解する能力を利用したレメディエーション法（汚染浄

化・修復法)。ファイト Phyto とは、植物のことを意味する。重金属を対象とする場合、土壌からの汚染を取り除くだけでなく、濃縮した重金属を植物から抽出・回収することが可能であり、再生利用が期待される。