

鉛蓄積性シダ植物シシガシラの小羽片における元素イメージング  
Element imaging o-f micropinna in Pb-accumulating fern  
*Blechnum niponicum*

西岡 洋<sup>a</sup>、村松康司<sup>a</sup>、小寺浩史<sup>a</sup>、上田 聡<sup>a</sup>、黒石佳和<sup>a</sup>、寺田靖子<sup>b</sup>

Hiroshi Nishioka<sup>a</sup>, Yasuji Muramatsu<sup>a</sup>, Hirofumi Kodera<sup>a</sup>,  
Satoshi Ueda<sup>a</sup>, Yoshikazu Kuroishi<sup>a</sup>, Yasuko Terada<sup>b</sup>

<sup>a</sup>兵庫県立大学、<sup>b</sup>高輝度光科学研究センター

<sup>a</sup>University of Hyogo, <sup>b</sup>JASRI

シダ植物シシガシラの小羽片について、大型放射光施設 SPring-8 の BL37XU において元素イメージングを行い、鉛や亜鉛など元素ごとの集積部位を調べた。試料は FAA 液で固定した後、tert ブタノールで置換し、真空乾燥した薄片試料とした。気孔、水孔、葉柄などの部位について元素イメージングを行ったところ、鉛が高濃度に集積されている部分が器官、細胞レベルで明らかとなった。

Microbeam XRF imaging was applied to analysis of *Blechnum niponicum* at BL37XU in SPring-8. The distributions of lead and zinc in stoma, water pore, vein and other tissues were investigated. Some of thin section samples were prepared with microtome and vacuum drying after replacement of water with tert-butanol subsequent to fixation with FAA solution. The present study has demonstrated that the SR microbeam imaging is a powerful method for revealing the accumulation site of lead in *Blechnum niponicum* with a cell-level resolution.

#### 背景と研究目的

近年、重金属で汚染された土壌を植物特有の金属集積能を利用して浄化するファイトレメディエーション技術は環境保全研究における重点分野となっている。特定の元素を高濃度に集積する植物はハイパーアキュムレータと呼ばれ、一般にシダ植物のヘビノネゴザがハイパーアキュムレータとして有名である。しかし、実際に汚染地域の環境浄化を行うためには、対象地域ごとの植生に適合したハイパーアキュムレータを探索することが重要で

ある。一方、兵庫県は他の都道府県に比べて多くの金属鉱床を抱え、様々な重金属を高濃度に含む土壌が多く分布しているため、多様なハイパーアキュムレータを探索するのに絶好の地域である。そこで、我々はヘビノネゴザ以外のハイパーアキュムレータを探索することを目的として、昨年度より兵庫県内に自生するシダ植物に着目し、これに含有される重金属について分析してきた。その結果、シシガシラ (*Blechnum niponicum*) が鉛を乾重量で数千 ppm も蓄積することを見出した。

しかし、シシガシラの重金属集積能のメカニズムは全く解明されておらず、この金属集積メカニズムを細胞・分子レベルで解明し体系化することは、ファイトレメディエーションに関する環境保全の基礎研究として極めて重要であるのみならず、植物栄養学の観点からも意義が高い。我々が目指す植物の重金属集積メカニズムの解明には、植物微細組織における金属の分布とその状態を分析することが肝要であり、ナノ（マイクロ）ビームの高輝度放射光を用いた微量元素イメージングとXAFS測定が必須である。以上の観点から、ナノビームによる蛍光X線分析が可能であり、豊富な元素イメージングの実績を有するBL37XUは非常に強力な測定手法である。

本研究では、鉛を集積したシシガシラの小羽片における元素分布を明らかにして、鉛の濃集位置と化学状態を細胞・分子レベルで特定することを目指しているが、その第一段階として、器官や細胞レベルでの集積位置を特定することを本実験の目的とした。

## 実験

実験はBL37XUの装置を用いて行った。図1にレイアウトを示す。

図1のように、中央部に直径20 mmの穴を開けた40 mm四方の亚克力板を試料保持板

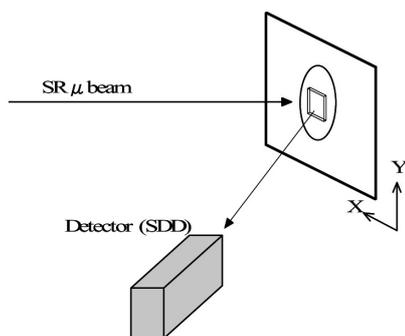


Fig. 1 Schematic diagram for measurement

とし、XYステージに固定して測定した。シシガシラの各部位を切り出し、FAA液で固定した後、試料中の水をtert-ブタノールで置換した。マイクロトームを用いて薄片とした後、真空乾燥して測定用試料とした。水孔や葉脈部分は、実体顕微鏡下で切り出した後、真空乾燥した。また、気孔を含む葉の裏側の表皮細胞については、葉面と並行に切り出すことが困難であったため、粘着テープを押しつけて、剥ぎ取ったものを乾燥し、測定に供した。

照射X線のエネルギーは16.5 keVであり、ビームサイズは縦1.8 μm横2.8 μmであった。

## 結果および考察

図2に小羽片裏面の表皮細胞についてイメージングを行った結果を示す。

図2は今年出芽した羽片先端部裏面の表皮細胞について200 μm四方の領域をイメージングした結果である。細胞の位置を特定するために必須元素のカリウムについてもイメージングを行ったが、鉛のイメージングでは孔辺細胞の形状が明確に認められた。植物生長の早期から鉛が孔辺細胞まで移行し、蓄積されていることが明らかとなった。

次に葉柄断面の維管束部分についてイメージングを行った。結果を図3に示す。

図3に示すように、鉛は仮道管と考えられ

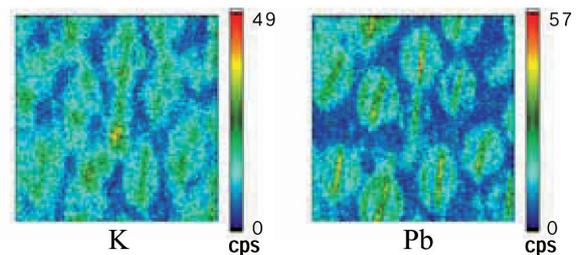


Fig. 2 Elemental images of potassium and lead in epidermic cell.

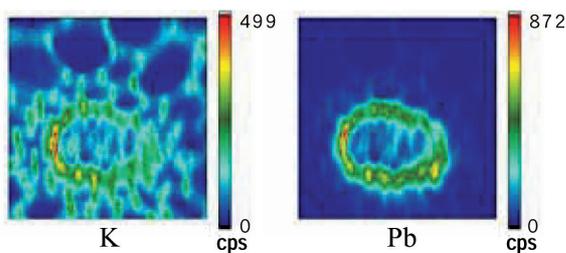


Fig. 3 Elemental images of potassium and lead in vascular bundle.

る部分に高濃度に蓄積されている可能性が高いことが判明した。シダ植物や裸子植物に見られる仮道管は上下方向の隔壁が残っているため、1本のパイプ状となっている道管に比べて通導性が低いとされている。そのため、多数の仮道管が形成されており、鉛を保持できるサイトが仮道管の壁に多く存在していることが推察される。

図4に小羽片の葉脈における鉛のX線強度を示す。

実体顕微鏡下で切り出した葉脈について、羽軸に近い部分をA、中央部をB、水孔部分をCとして、それぞれイメージングを行った。同じ葉脈でも鉛の濃度分布に大きな差が見られ、末端の水孔部分に高濃度で蓄積されてい

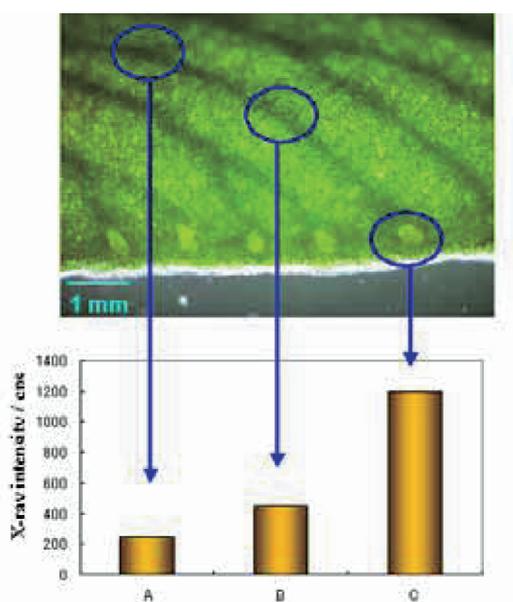


Fig. 4 X-ray intensity of Pb at each part of vein.

ることが明らかとなった。

以上の結果より、シシガシラの根から吸収された鉛は蒸散流に沿って仮道管の隔壁に保持されながら、最終的には末端の孔辺細胞と水孔において高濃度に蓄積されることが明らかとなった。

#### 今後の課題

今回の実験では小羽片と葉柄における鉛の蓄積部分が器官・細胞レベルで明らかとなった。しかし、根、胞子茎及び胞子囊における蓄積部位については不明であるため、今後計測する必要がある。さらに、蓄積部位における鉛の化学形態を知る必要があるため、課題番号2006B1614でX線吸収端近傍構造解析を含めた実験を予定している。

#### 参考文献

- 1) G. R. MacFarlane and M. D. Burchett, *Aquatic Botany*. **68** (2000) 45.
- 2) A. T. Ruley, N. C. Sharma and S. V. Sahi, *Plant Physiology and Biochemistry*. **42** (2004) 899.
- 3) K. J. Tiemann, G. Gamez, K. Dokken, J. G. Parsons and J. L. Gardea-Torresdey, *Microchemical Journal*. **71** (2002) 287.
- 4) J. L. Gardea-Torresdey, J. R. Peralta-Videa, G. de la Rosa and J. G. Parsons, *Coordination Chemistry Reviews*. **249** (2005) 1797.

#### 論文発表状況・特許状況

- [1] 西岡洋、小寺浩史, *環境技術*, **34**(2005)301.
- [2] 西岡洋、小寺浩史, 日本土壤肥料学会 2005年大会 (ポスター発表) .
- [3] H. Nishioka and H. Kodera, *The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies*,

PACIFICHEM 2005 (POSTER).

- [4] 小寺浩史、西岡洋、村松康司, X 線分析の  
進歩, **37**(2006)65.
- [5] 西岡洋、小寺浩史, 日本化学会第 86 春季  
年会 (ポスター発表) (2006).
- [6] 西岡洋、小寺浩史, 日本土壤肥料学会 2006  
年大会 (ポスター発表予定) .
- [7] 小寺浩史、黒石佳和、上田聡、西岡洋、村  
松康司、寺田靖子, 第 42 回 X 線分析討論会  
(口頭発表予定) .

#### キーワード

・ シシガシラ (*Blechnum niponicum*)

シシガシラ科ヒリュウシダ属の地上性シダ。  
常緑性で、日本固有種。葉の全長は 40cm 程  
度で孢子茎は直立する。

・ 蛍光 X 線

物質を X 線で照射したときに原子の内殻軌  
道の電子を励起放出し、この空準位に高い準  
位の電子が移るときに放射される特性 X 線の  
こと。