

カドミウム超集積植物ヘビノネゴザの  
高エネルギーマイクロビーム蛍光 X 線 2 次元イメージング  
**Micro-XRF imaging of cadmium hyperaccumulate fern,  
Athyrium yokoscense, using high-energy synchrotron radiation**

三尾 咲紀子<sup>a</sup>, 福田 直樹<sup>a</sup>, 高田 沙織<sup>a</sup>, 保倉 明子<sup>a</sup>, 中井 泉<sup>a</sup>,  
寺田 靖子<sup>b</sup>, 北島 信行<sup>c</sup>

Sakiko Mitsu<sup>a</sup>, Naoki Fukuda<sup>a</sup>, Saori Takada<sup>a</sup>, Akiko Hokura<sup>a</sup>, Izumi Nakai<sup>a</sup>,  
Yasuko Terada<sup>b</sup>, Nobuyuki Kitajima<sup>c</sup>

<sup>a</sup>東理大理, <sup>b</sup>高輝度光科学研究センター SPring-8, <sup>c</sup>フジタ

<sup>a</sup>Tokyo University of Science, <sup>b</sup>JASRI SPring-8, <sup>c</sup>Fujita Co.

高エネルギー X 線マイクロビームを用いた蛍光 X 線 2 次元イメージングにより、カドミウム超集積植物ヘビノネゴザについて、細胞レベルにおけるカドミウムの分布を明らかにした。試料には、未分化の細胞の塊であるカルスと、カルスから再生した幼植体の根を用いた。これらの試料について凍結マイクロトームにより厚さ 20  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作成し、凍結状態を維持したまま測定に供した。測定は SPring-8 の BL37XU にて行った。2 次元イメージングの結果から、カドミウムはカルスおよび幼植体の根において、いずれも細胞壁に分布していることが明らかとなった。

We investigated the distribution of cadmium in cadmium hyperaccumulator fern, *Athyrium yokoscense*, at cellular scale by micro-XRF imaging using high-energy synchrotron radiation. The fern's callus and the regenerated plant from callus were cultivated with medium containing 1 mM Cd for 2 weeks. The frozen sections of plant samples were prepared with the thickness of 20  $\mu\text{m}$ , by using a cryomicrotome. Micro-XRF imaging was carried out at BL37XU of SPring-8. It was found by micro-XRF imaging that cadmium was highly accumulated in the cell wall of callus.

キーワード：ヘビノネゴザ、カドミウム、カルス、超集積植物、高エネルギー放射光、マイクロビーム蛍光 X 線分析

**背景と研究目的：**近年、植物を用いて重金属で汚染された土壌を浄化する技術であるファイトレメディエーション技術が注目を集めている。この技術に用いられるのが標的重金属に耐性を持ち、高濃度に重金属を蓄積する植物である。このような植物における重金属蓄積メカニズムを解明することで、より高効率な土壌浄化の実現が期待できる。

シダ植物のヘビノネゴザはカドミウムの超集積植物で、その植物体内に数千 ppm ものカドミウムを濃縮することが知られている。これまで、汚染地域で生育したヘビノネゴザ胞子体の重金属耐性・蓄積機構に関して研究が行われ、ヘビノネゴザの根にとりこまれたカドミウムは、根の細胞壁に蓄積されると報告されている。しかし、自然界に生育するヘビノネゴザ胞子体は栽培が難しく、個体差も大きいといった問題点があった。

近年、電力中央研究所の吉原らの研究によりヘビノネゴザの組織培養法が確立された<sup>1)</sup>。こ

の研究において、カルスの誘導そしてカルスから植物体の再生に成功し、遺伝的に均質な実験系が確立された。カルスとは未分化の細胞の塊であり、細胞レベルで分析を行うのに最適な材料となる。ヘビノネゴザにおけるカドミウムの蓄積部位を細胞レベルで明らかにすることにより、植物の重金属蓄積メカニズムを解明する上での重要な知見が得られる。

一方、従来一般的な分析法では、植物試料に対し *in vivo* で高解像度の組成分析を行うことは困難であった。例えば、SEM-EDS のような電子線を用いた分析法では、カドミウムのような重金属元素の励起効率が悪い、測定を真空下で行うため含水物を測れないといった欠点があった。これに対し、我々は SPring-8 の高エネルギー X 線マイクロビームを用いた放射光蛍光 X 線 2 次元イメージングにより、植物がほぼ生きたままの状態で植物体内におけるカドミウムの蓄積部位を細胞レベルで明らかにすることが可能であることを示した<sup>2,3)</sup>。

そこで本研究では、高エネルギーX線マイクロビームを用いた放射光蛍光X線2次元イメージングをヘビノネゴザのカルスへ適用し、未分化のカルスにおける1細胞内のカドミウムの分布を明らかにすることを目的とした。また、カルスから再生した植物体についてカドミウムの分布を可視化することで、ヘビノネゴザの分化に伴うカドミウム蓄積メカニズムに関する知見を得ることを目的とした。

**実験：**1 mMのカドミウムを投与した培地で2週間培養したカルスおよび組織培養により再生した植物体の根について試料調製を行った。細胞レベルで分析するために厚さ数十 $\mu\text{m}$ という薄片切片的試料調製法の検討を行った。カルスおよび植物体の根をOCTコンパウンドおよびゼラチンにより包埋し、 $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結させ、クライオミクロトームにより厚さ20 $\mu\text{m}$ の組織切片を切り出した。試料の凍結状態を維持するために、放射光蛍光X線2次元イメージング測定は低温窒素ガスを吹きつけながら行った。

$\mu\text{-XRF}$ イメージングは、BL37XUにて行った。アンジュレーターからの放射光をSi(111)二結晶モノクロメーターにより単色化(30 keV)し、K-Bミラーにより集光した1.2(H) $\times$ 0.8(V) $\mu\text{m}^2$ のマイクロビームを用いた。

**結果および考察：**今回、ヘビノネゴザのカルスの凍結切片の測定を行ったところ、カルス1細胞(約40 $\mu\text{m}$ )におけるカドミウムの分布を得ることに成功した。Fig. 1にカルス凍結切片におけるカドミウムの分布を示す。一点あたりの計数時間は0.5秒であり、181 $\times$ 97 $\mu\text{m}^2$ の範囲を測定するにあたり、約3時間を要した。図に見られるように、カドミウムは未分化のカルス組織全体に分布し、特に細胞壁に多く存在していることが分かった。この結果から、ヘビノネゴザの各細胞におけるカドミウムの取り込みは、細胞壁を経由して行われている可能性が示された。

さらに、ヘビノネゴザの植物体の根の凍結切片を測定したところ、凍結状態を維持することで、微細で含水率の高い根におけるカドミウムの分布を可視化することに成功した。その結果、カドミウムは根の細胞壁、細胞内、中心柱といった組織に検出されたが、細胞壁に最も多く蓄積していることが示された。

以上のように、ヘビノネゴザのカルスおよび植物体の根において、カドミウムはいずれも細胞壁において高濃度に蓄積されており、ヘビノネゴザにおけるカドミウムの蓄積には細胞壁が

重要な役割を担っている可能性が示された。

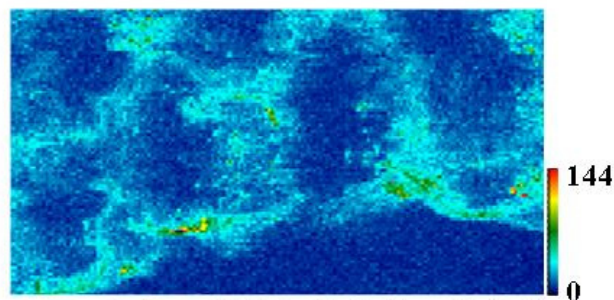


Fig. 1  $\mu\text{-XRF}$  imaging of Cd for fern's callus. Incident X-ray energy: 30 keV, beam size: 1.2 (H)  $\times$  0.8 (V)  $\mu\text{m}^2$ , step size: 1.0 (H)  $\times$  1.0 (V)  $\mu\text{m}^2$ , measurement time: 0.5 s/point, measurement area: 181  $\times$  97  $\mu\text{m}^2$ .

**今後の課題：**高エネルギーX線マイクロビームを用いた放射光蛍光X線2次元イメージングにより、ヘビノネゴザのカルスについて、1細胞におけるカドミウムの分布を明らかにすることができた。また、組織培養により再生した植物体の根についてカドミウムの分布を可視化し、ヘビノネゴザの根においてカドミウムは根の細胞壁に多く蓄積することが分かった。以上のことから、ヘビノネゴザにおけるカドミウムの蓄積には、植物細胞の細胞壁が何らかの役割を果たしているものと考えられる。今後は蓄積されたカドミウムの化学形態についての知見を得、蓄積機構の解明を目指したい。

#### 参考文献

- 1) T. Yoshihara, et al., *Plant Cell Rep.*, **23**, (2005) 579.
- 2) A. Hokura et al., *Chem. Lett.*, **35**, (2006) 1246.
- 3) N. Fukuda, et al., *J. Anal. At. Spectrom.*, submitted.