

蛍光XAFS による環境浄化植物における 重金属蓄積機構の解明

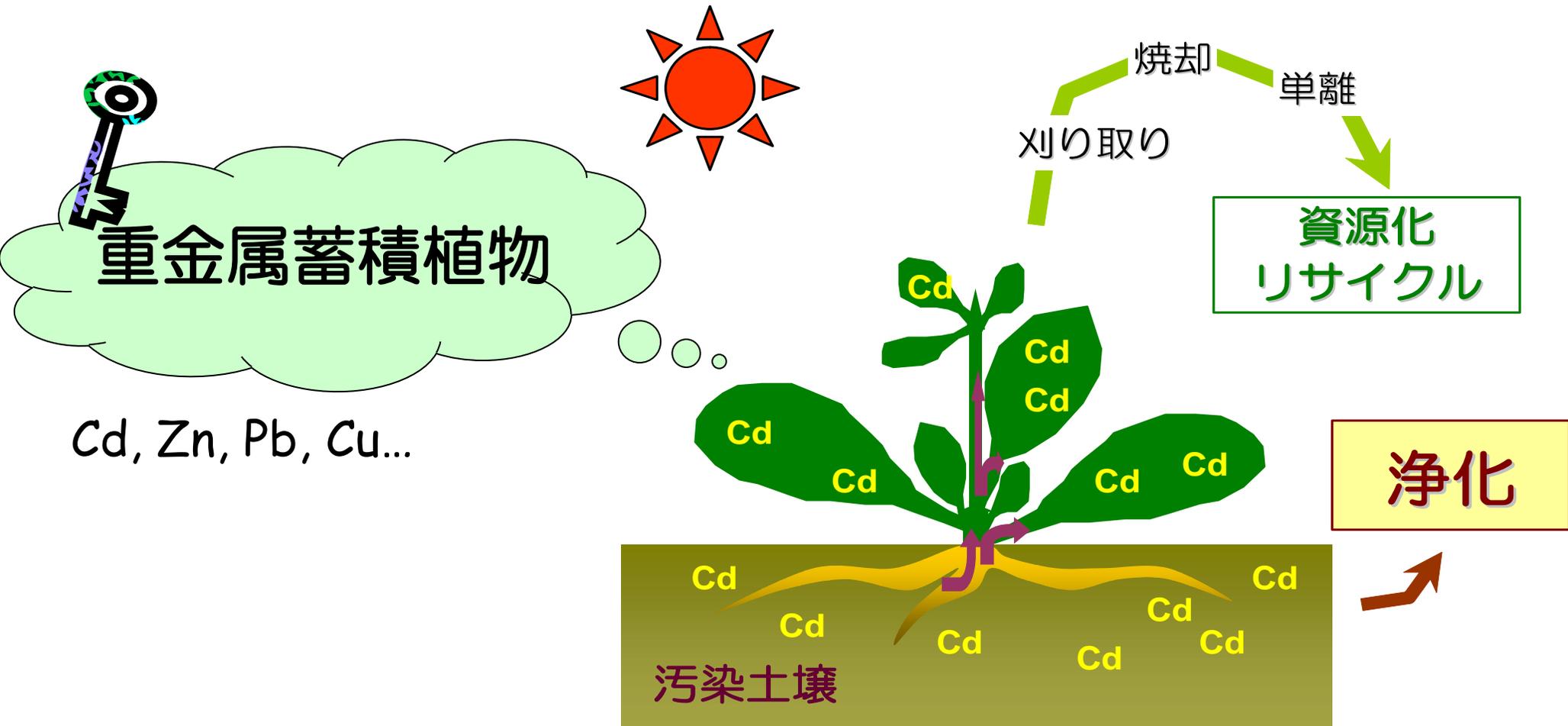


保倉明子^{1,2}, 北島信行³, 寺田靖子⁴, 中井 泉²

1:早稲田大学高等研究所、2:東京理科大学理学部、
3:フジタ、4:JASRI, SPring-8

植物を用いる重金属汚染土壌の浄化

～ ファイトレメディエーション ～



重金属超集積性植物の一例

元素	含有量 ($\mu\text{g/g}$)	植物名(学名)	
As	22,630	モエジマシダ	(<i>Pteris vittata</i> L.) *
Cd	2,000	ハクサンハタザオ	(<i>Arabis gemmifera</i>) **
Pb	34,500	カラシナ	(<i>Brassica juncea</i>) ***

* L. Q. Ma, et al., *Nature*, (2001), **409**, 579.

** フジタ, 農業工学研究所, 名古屋大学 特許出願中

*** 本浄高治ら, 植物地理・分類研究, (1984), **32**, 68-80.



edenspace overview

Edenspace is a commercial leader in the use of plants for environmental protection and renewable fuels. With projects throughout the United States and Japan, the company is transforming the energy, environmental and agricultural industries with proprietary plants and plant-based services.

[more](#)

products & services

Edenspace is developing enhanced crop plants for production of fuel ethanol. The company also provides environmental phyto-technologies such as metal-hyperaccumulating plants and related field services for phytoremediation, site applicability analyses, bioavailability and chemical migration analyses, training, and technical consulting.

[more](#)

the latest news

Edenspace, NREL Sign Cooperative Development Agreement

(January 10, 2006) Edenspace and NREL will collaborate on development of enhanced corn varieties to provide low-cost fuel ethanol from leaves, stems and other cellulosic biomass.

[more](#)

Phytoremediation Superstar:

edenfern™ “Victory” [\[order ferns\]](#) [\[order soil arsenic test kit\]](#)



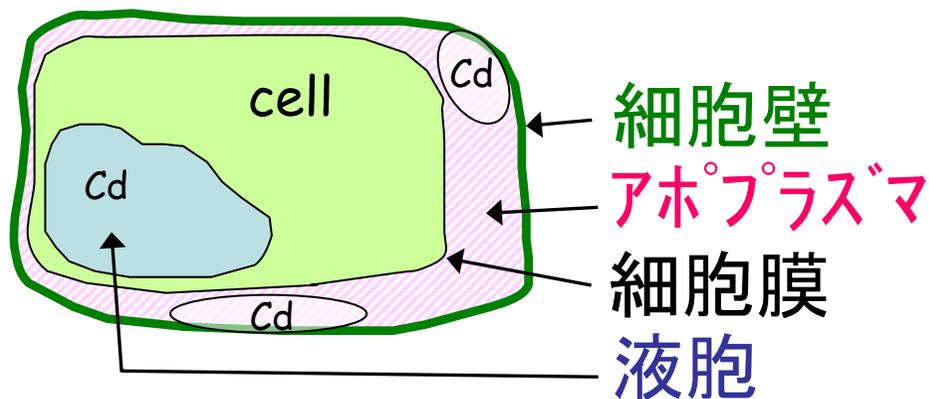
ハクサンハタザオを用いるCd汚染土壌の浄化試験



Photos presented by Fujita Co.

植物における重金属の蓄積機構

- システインのようなチオール基と錯形成して無毒化
ファイトケラチン、メタロチオネイン
- 特殊な組織や細胞内の液胞に封じ込めて無毒化
(コンパートメンテーション)



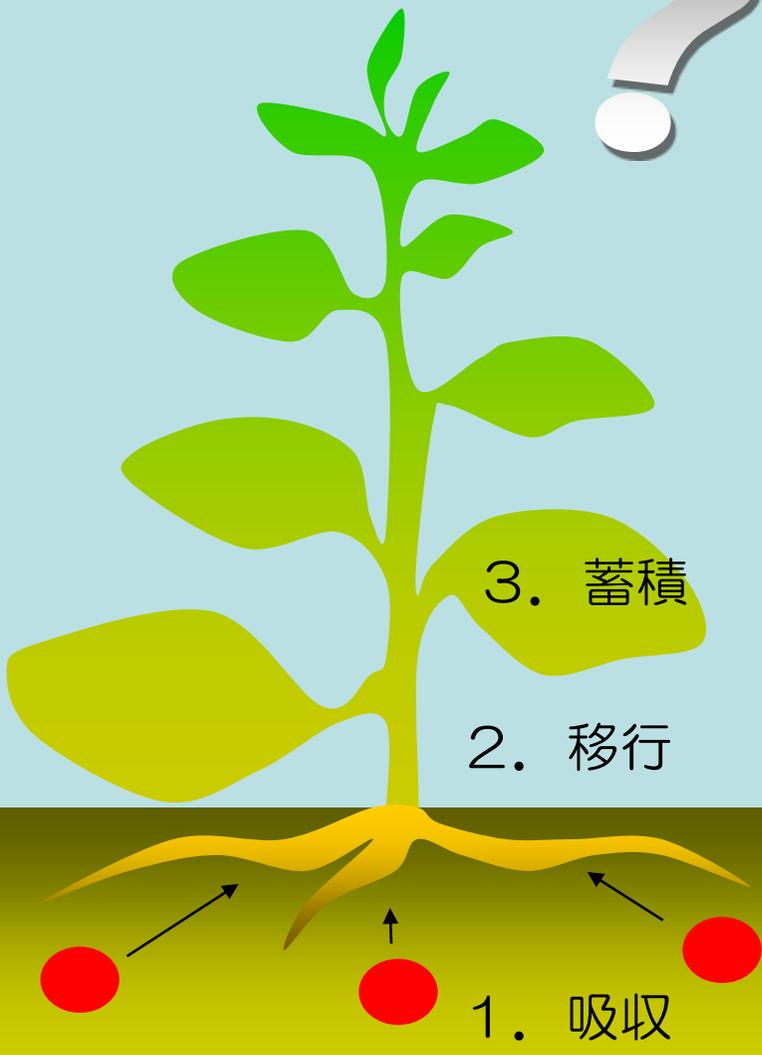
化学形態

元素分布

植物による重金属のといこみ



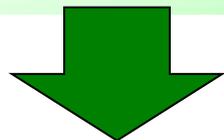
組織・細胞レベルにおける分布
in vivo の化学状態分析



放射光X線を用いる
分析手法の開発

本研究の目的

1. 植物に蓄積したAs、Cdの分布を組織および細胞レベルで明らかにする
2. 蓄積したAs、Cdの化学状態を明らかにする



放射光マイクロビームを利用したXRF2次元イメージング
X線吸収微細構造 (XAFS)解析を用いた化学状態分析
マイクロXANESによる細胞レベルでの化学状態分析

ヒ素を蓄積する植物

モエジマシダ

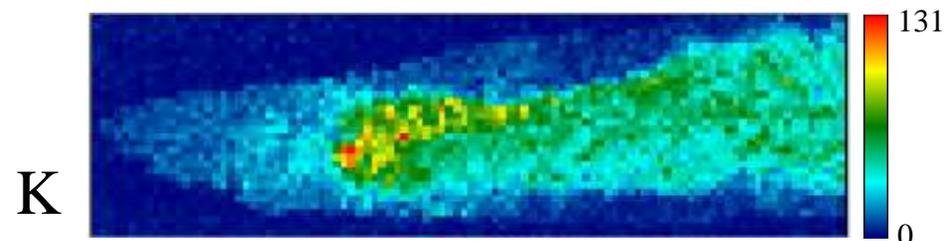
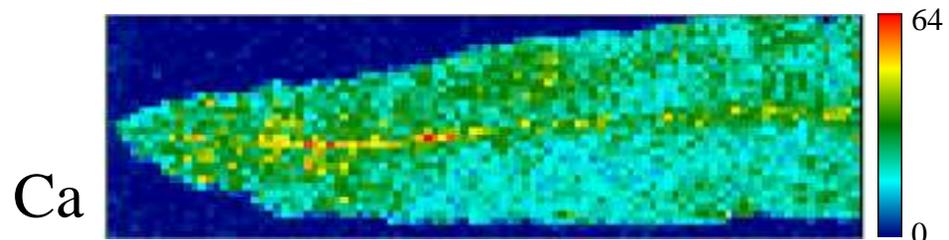
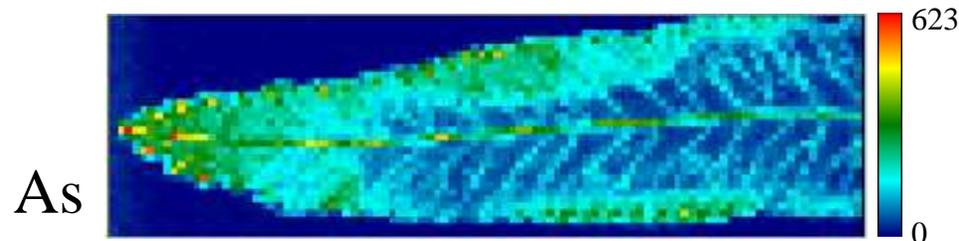
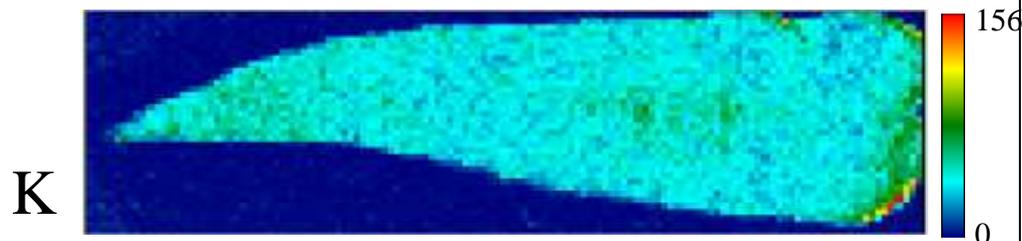
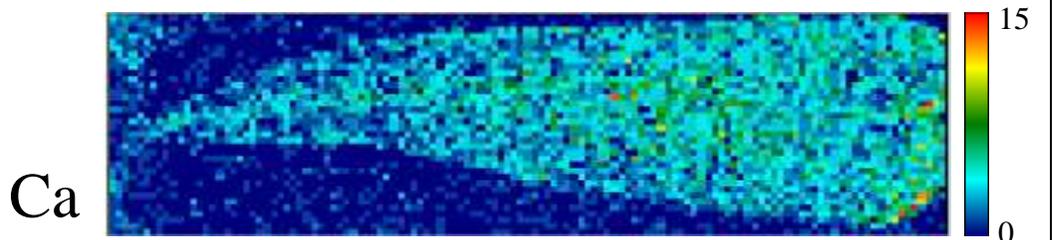
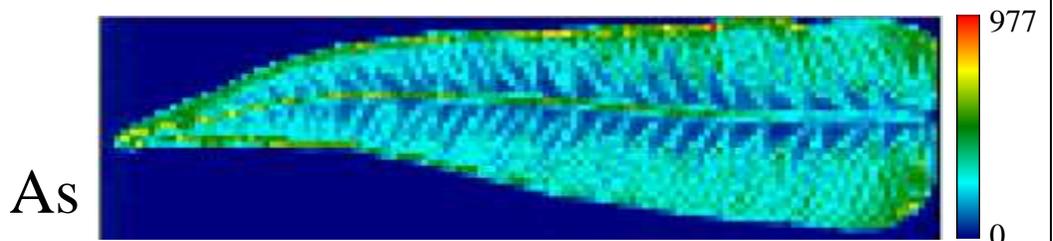


Arsenic Hyperaccumulator
Pteris vittata L.

羽片の分析結果

Young

Old



X-ray Energy : 16.5 keV

Beam size : 200 μm \times 200 μm

Step number : 125 point \times 36 point

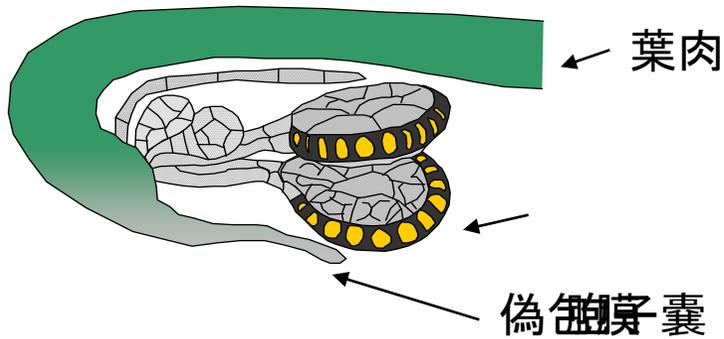
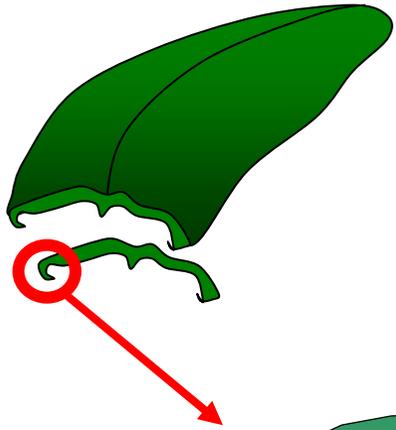
measurement time : 3 s/point

KEK PF BL-4A

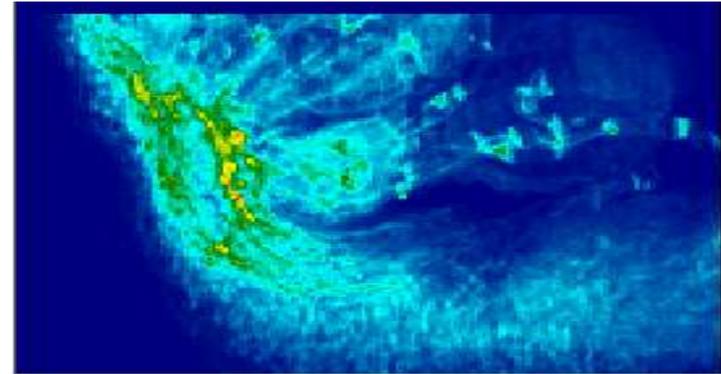
Step number : 100 point \times 32 point

measurement time : 3 s/point

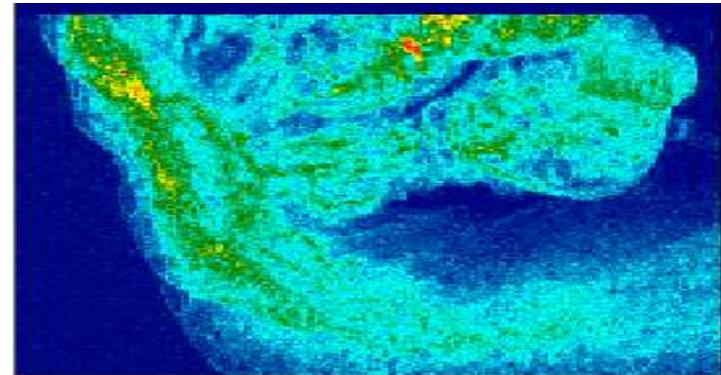
羽片断面の分析結果



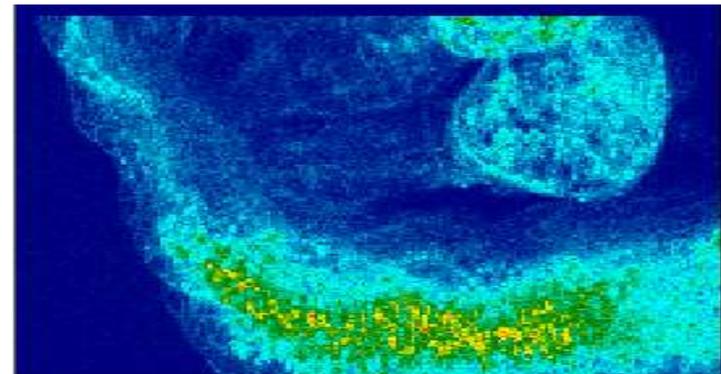
As



K



Ca



《測定条件》

X線エネルギー：14.2 keV

ビームサイズ：3.5 μm \times 5.5 μm

測定点数：180点 \times 125点

測定時間：1秒/点

in vivo XANES測定

測定施設： KEK PF BL12C

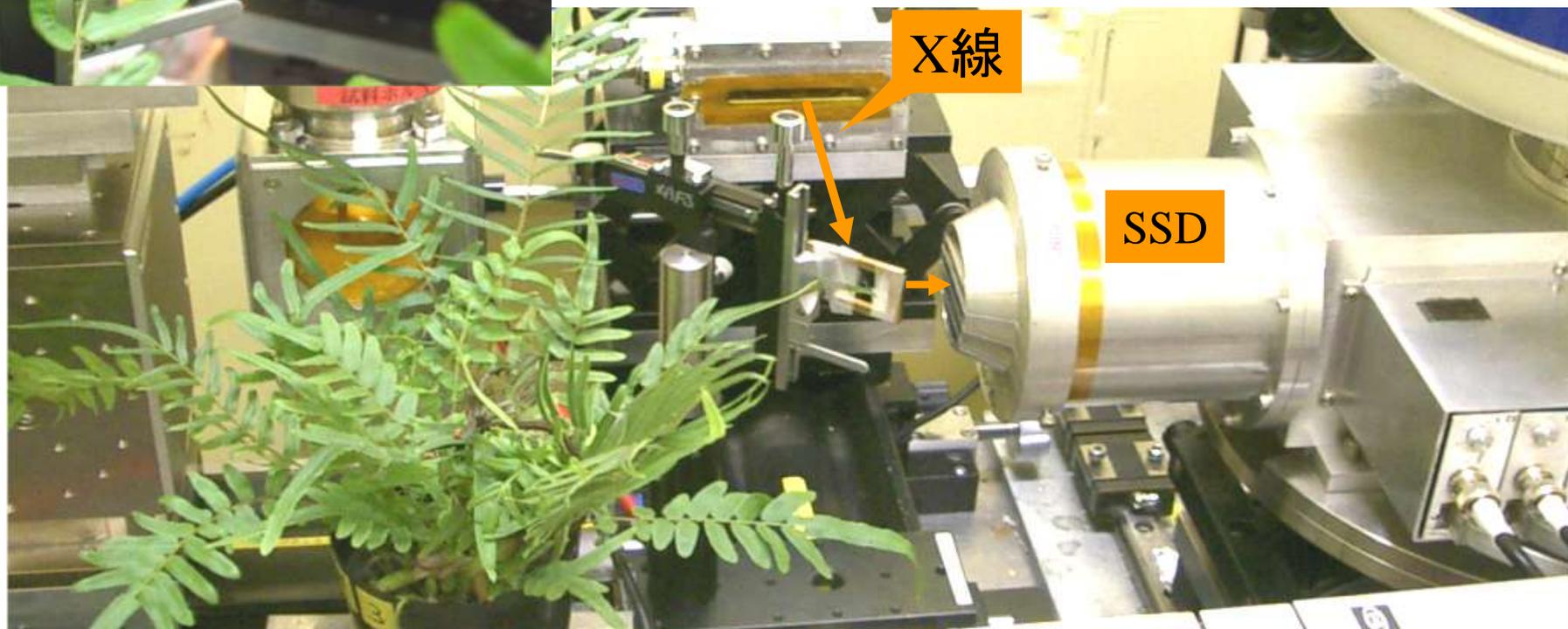
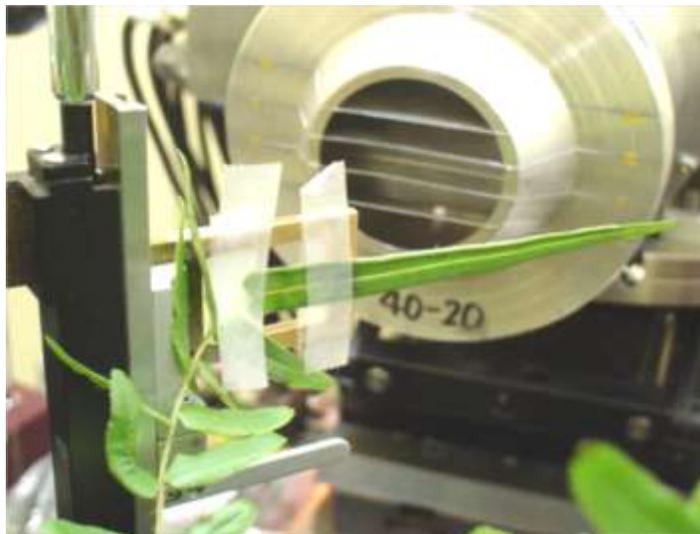
吸収端： As K-edge (11.863 keV)

モノクロメーター： Si(111)二結晶

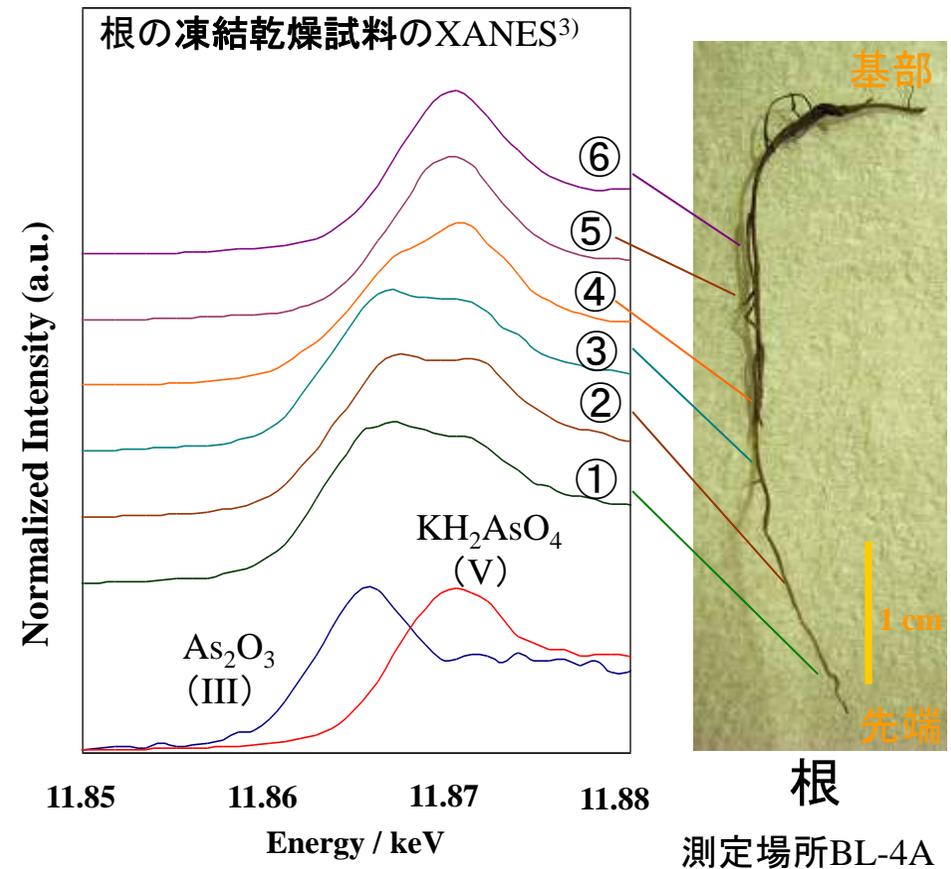
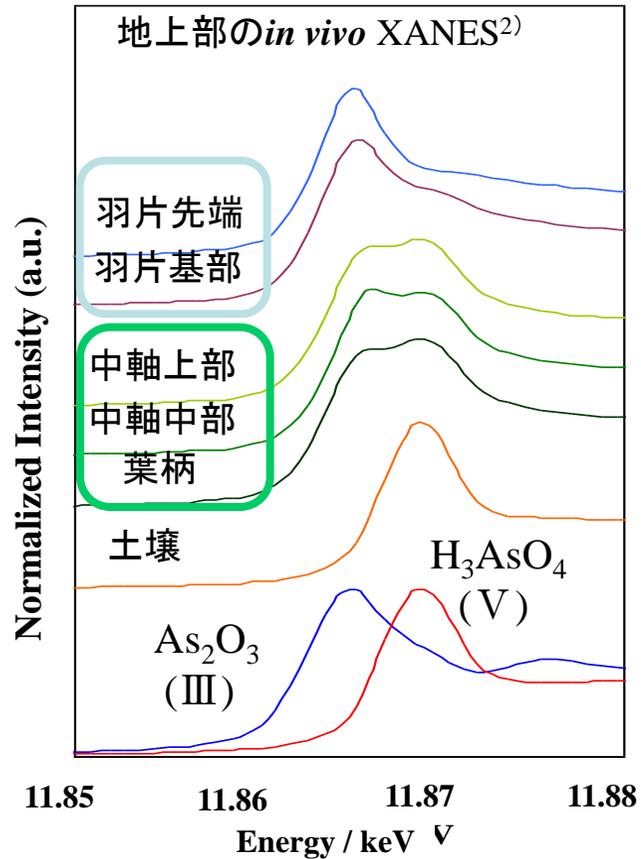
測定方法： 蛍光法

検出器： 19素子-SSD

生きたまま測定

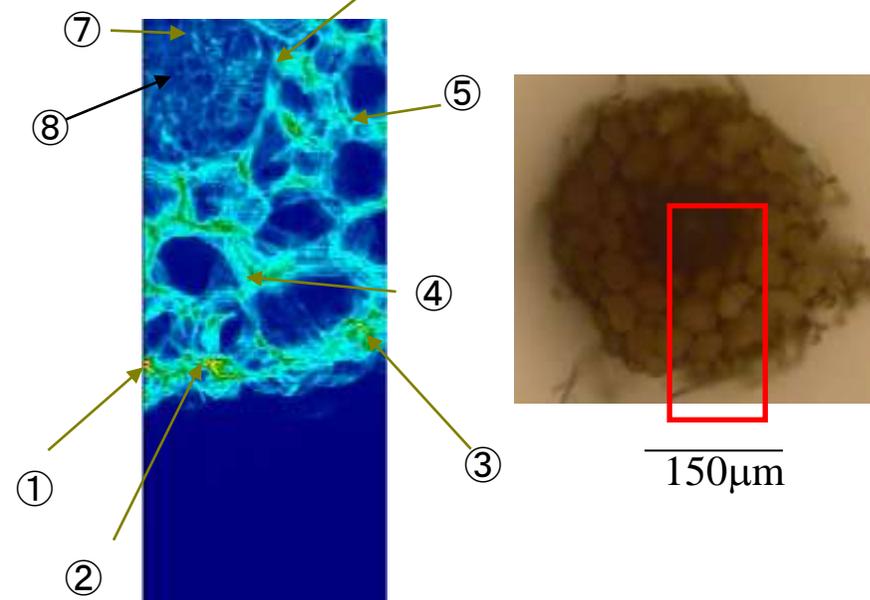


Asの化学形態に関する研究—XANES

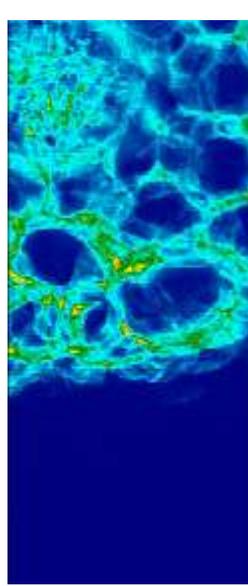


土壤からシダに取り込まれたヒ素は5価から3価に還元されて、羽片に蓄積

根の凍結乾燥切片の断面

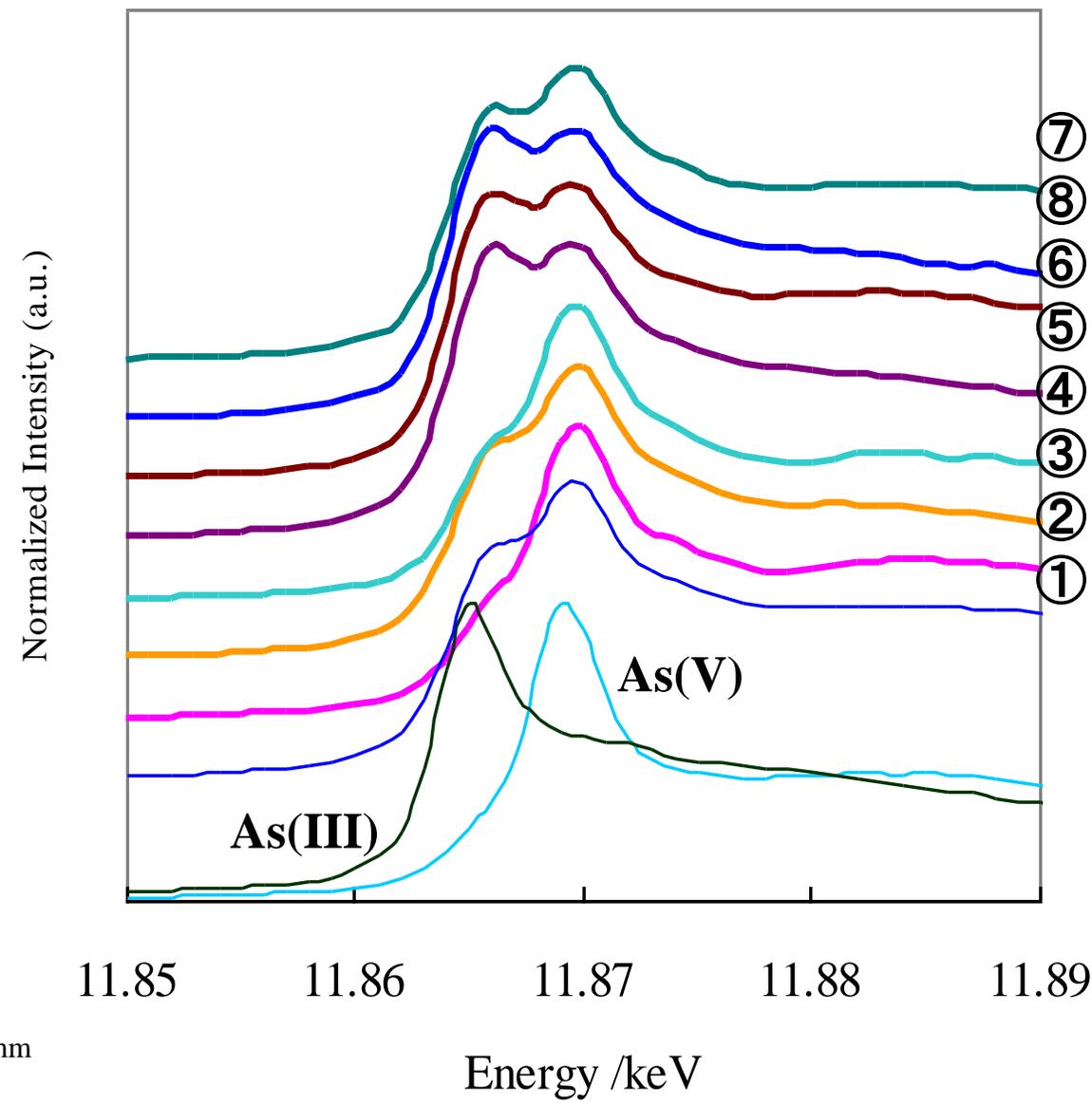


As



K

X線エネルギー: 12.8 keV
ビームサイズ: 縦1.1 μ m \times 横1.3mm
ステップサイズ: 1 μ m \times 1 μ m
測定点数: 501点 \times 201点
測定時間: 0.1秒/点



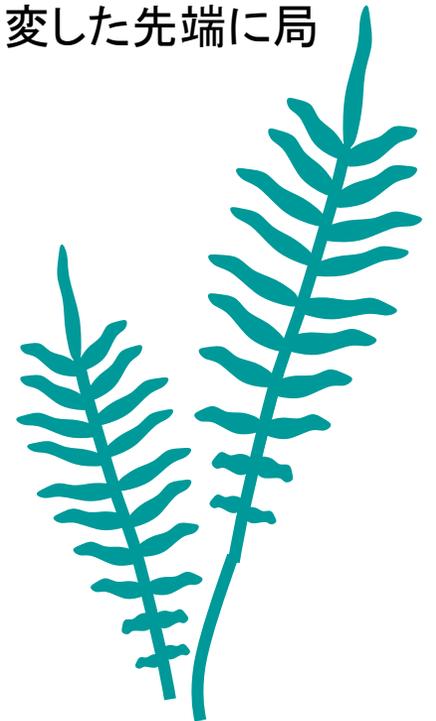
ヒ素を蓄積するモエジマシダ

ヒ素の蓄積部位

- ▶ 羽片の葉齢によって、ヒ素の分布は異なる
- ▶ 羽片に運ばれたAsは、孢子嚢群付近(側糸・通道組織)と、褐変した先端に局在している
- ▶ 根では細胞壁において蓄積がみとめられた

ヒ素の酸化状態

- ▶ 羽片の孢子嚢群付近ではAsが3価に還元されている
- ▶ 中軸ではAs(III)とAs(V)が混在
- ▶ 根ではAs(III)とAs(V)が混在



Cd蓄積植物



ハクサンハタザオ
(*Arabidopsis halleri* ssp.
gemmaifera,)
アブラナ科

200 μ M Cdの培養液で2
週間栽培



タバコ
(*Nicotiana tabacum* L.)
ナス科

100 μ M Cdの培養液で
4週間栽培



ヘビノネゴザ
(*Athyrium yokoscense*)
オシダ科

400 ppm Cd汚染土壌で
4ヶ月栽培

ハクサンハタザオについて



ハクサンハタザオ [*Arabidopsis halleri* ssp. *genmifera*]

土壌中Cd濃度が高い地域の植物百数十種をスクリーニングした結果、Cdを高濃度に蓄積することが見出された。アブラナ科ヤマハタザオ属。葉の表面に毛状突起(トライコーム)がある。

ハクサンハタザオ

日本在来種・CdとZnの超集積植物



欧州：亜種が生育

Znの蓄積機構に関する研究

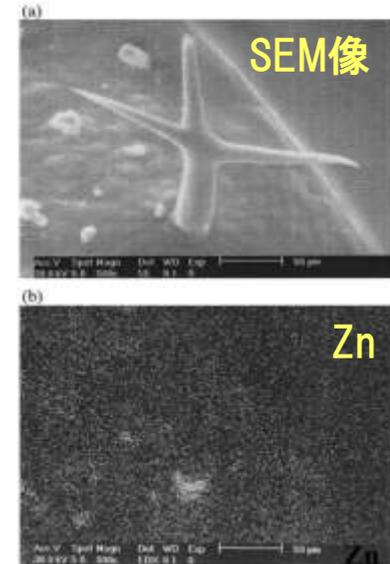
1 mMのZnを含んだ培養液で生育

→ 32,000 mg kg⁻¹ものZnを地上部に蓄積[1]

葉表面のトライコーム(毛状突起)の基部にZnが濃集[1]

トライコームに濃集したZnについてμ-EXAFSを適用

→ Znはカルボキシル基またはヒドロキシル基と配位[2]



近年Cdも超集積することが知られ、さらに研究が進んでいる。



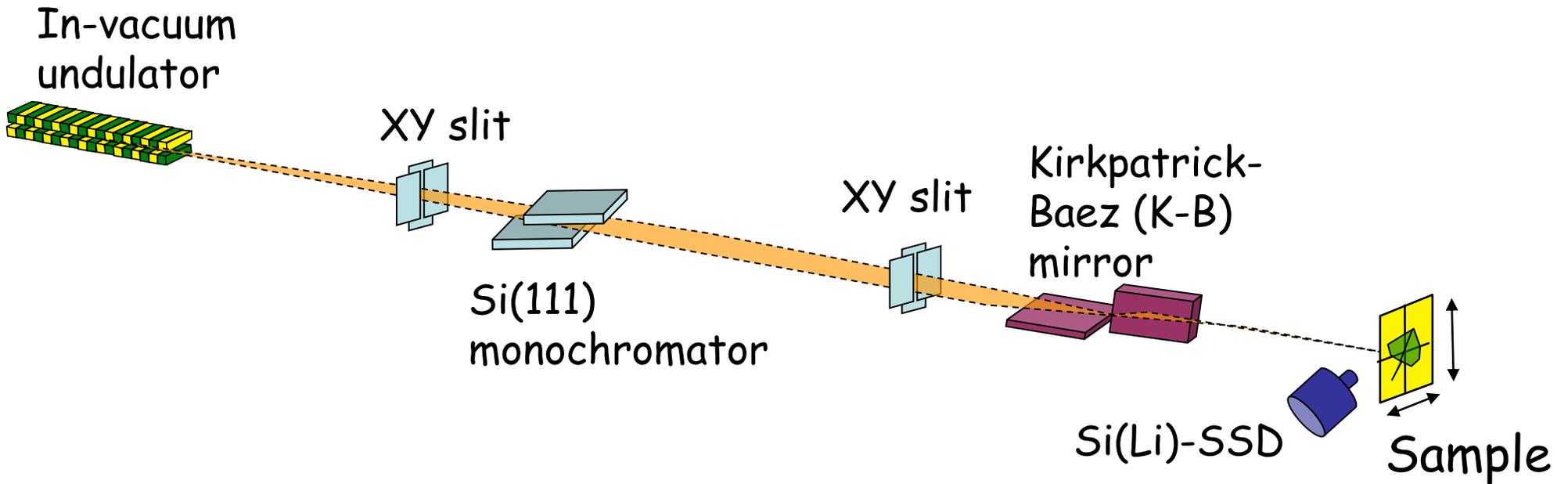
しかし!

CdのL α_1 線(3.13 keV)は
KのK α 線(3.31 keV)が妨害



SEM-EDSを用いる微小部でのCd
の分析が困難である

Micro-XRF imaging system



SR facility: BL37XU, SPring-8 (undulator)

The flux of the photons: ca. 10^8 - 10^9 photon s^{-1} at 37 keV.

Focusing optics: K-B mirror (fused silica coated with Pt)

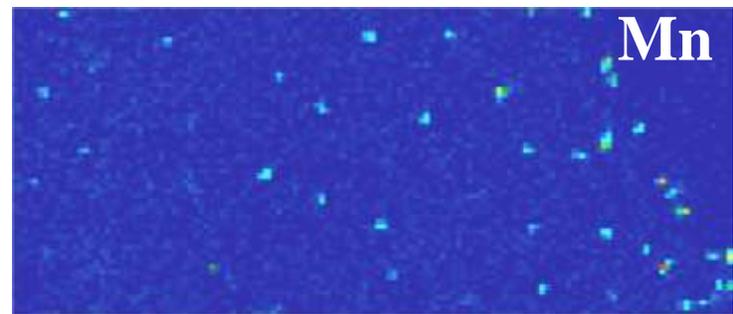
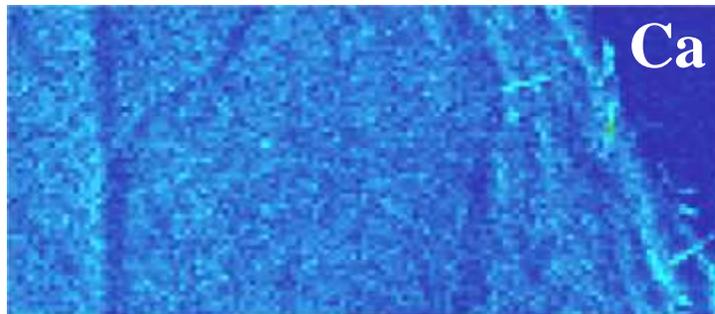
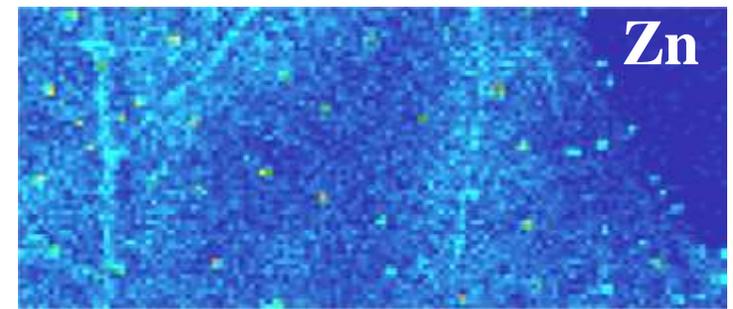
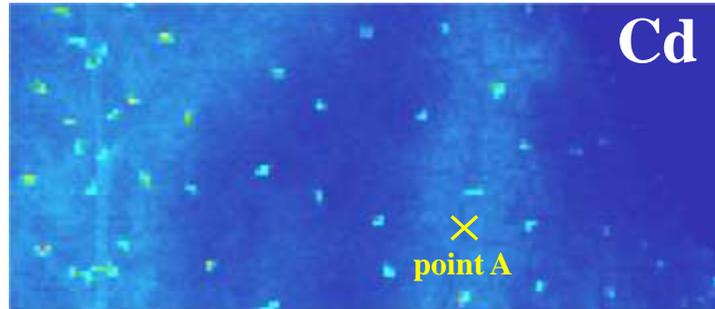
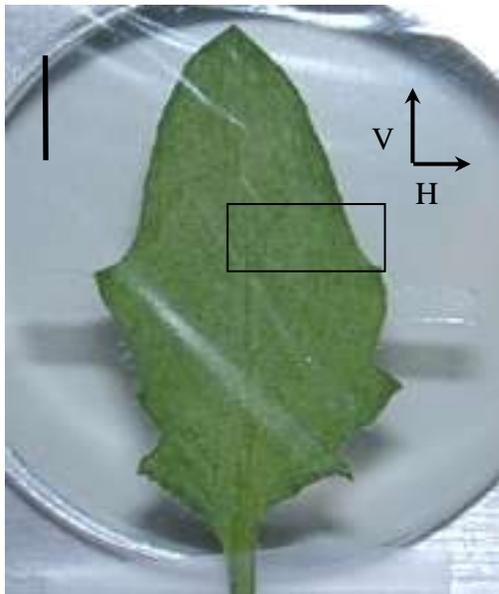
Focal length: 250 mm, 100 mm, Average glancing angle: 0.8 mrad.

Monochromator stabilization (MOSTAB) system

Beam size: ca. $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ with K-B mirror, $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ (non-focused)

ハクサンハタザオのXRFイメージング

5 mm



- Cd, Zn, Mnはトライコームに蓄積されていた.
- 特に主脈と葉脈付近のトライコームにおいてCd強度が高い.



トライコームのSR- μ -XRFイメージングの結果

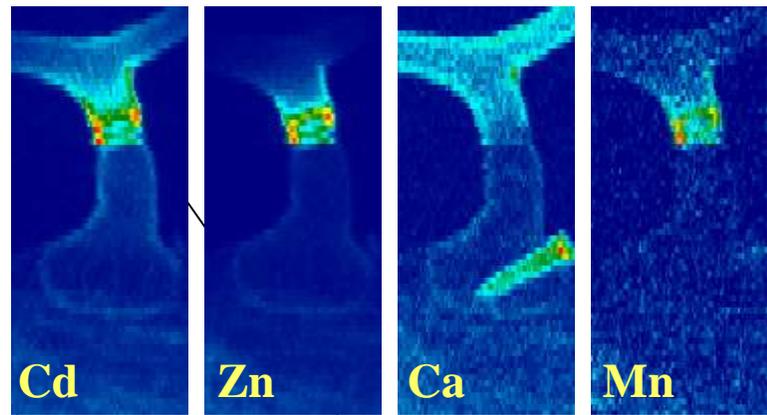
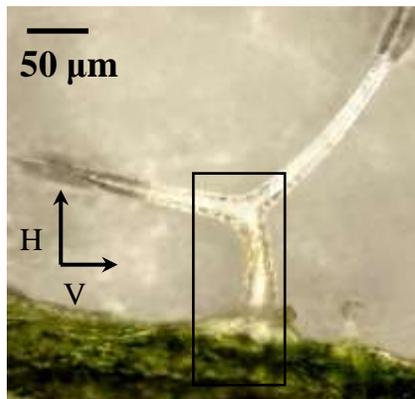
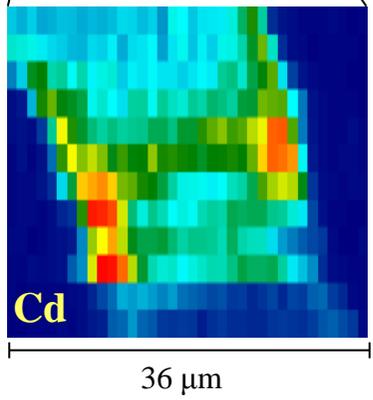
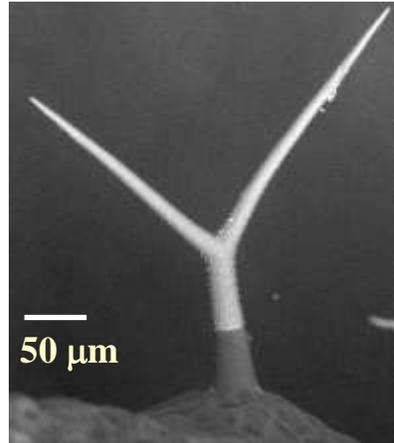


図 葉の表面に生えている
トライコーム(毛状突起)



low high
XRF Intensity

36 μm
X-ray Energy : 37 keV
Beam size : 1.3 μm (V) × 3.8 μm (H)
Step size : 3 μm (V) × 3 μm (H)
Measurement time : 0.1 s/point

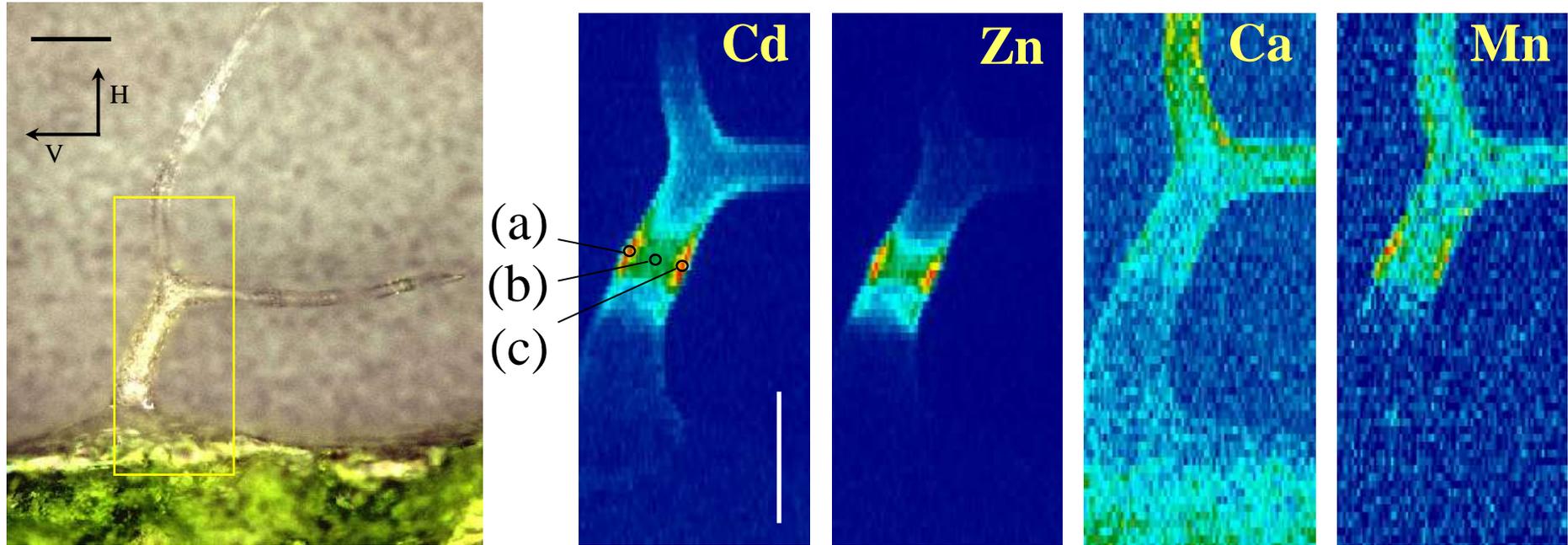
SEM-BSE像

リング状にCdが蓄積

- ・トライコームの上方の節にCdが濃集
- ・Cdの分布はZnやMnと類似している



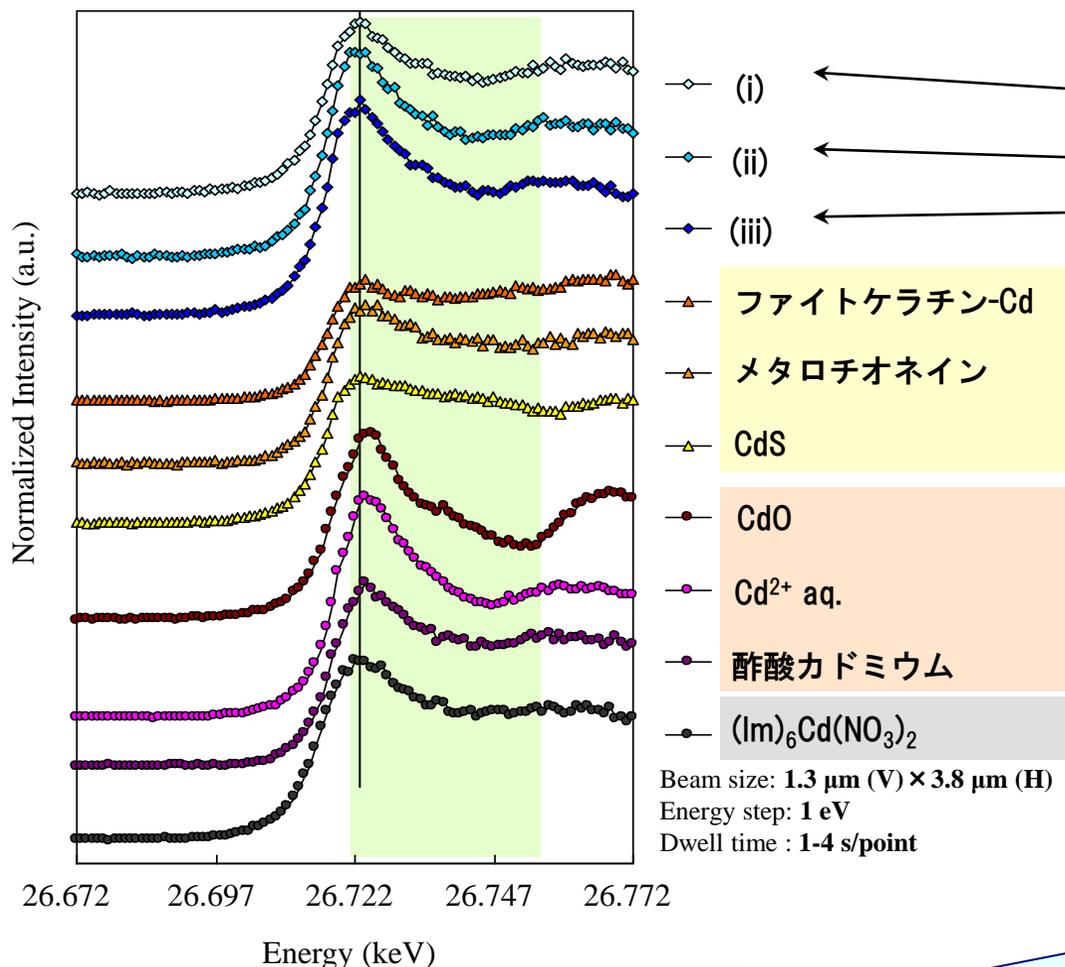
ハクサンハタザオ・トライコームの μ -XRFイメージング



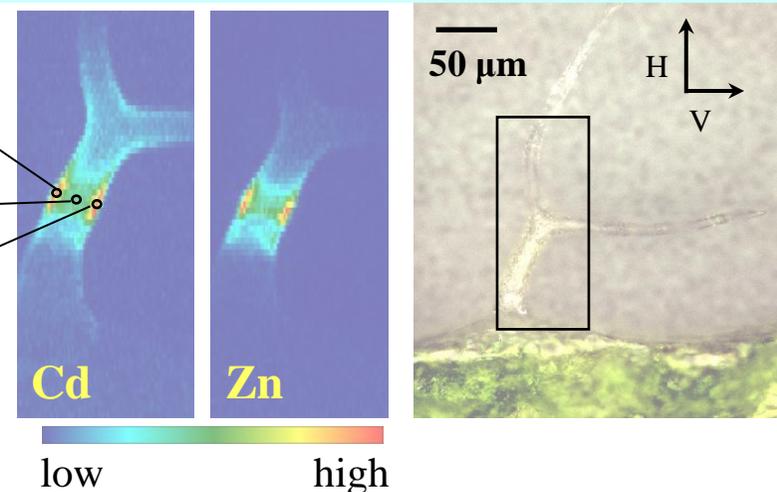
トライコームは一細胞から構成されている。
これらの元素分布は、細胞内におけるコンパートメンテーション。
Cd, ZnとMnはトライコームの中において**リング状**に分布。

Cdの蓄積部位 (a) – (c) で Cd K吸収端 μ -XANESスペクトルを測定。

高エネルギーX線マイクロビームを用いるX線吸収端近傍構造(XANES)解析により植物細胞中Cdの化学形態分析が初めて実現 [Fukuda, et al.: JAAS, 23, 1068 (2008)]



- ◇ (i)
- (ii)
- (iii)
- ▲ ファイトケラチン-Cd
- ▲ メタロチオネイン
- ▲ CdS
- CdO
- Cd²⁺ aq.
- 酢酸カドミウム
- (Im)₆Cd(NO₃)₂



～XANESスペクトルの特徴*～

Cd-S	フラット
Cd-O	勾配
Cd-N	

トライコーム → 勾配 → O/N配位子

トライコームに蓄積したZnはカルボキシル基またはヒドロキシル基で配位されている**

CdはZnと同じようにO配位子と結合している

* I. J. Pickering, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1429**, (1999), 351.
** G. Sarret, et al., *Plant Physiol.*, **130**, (2002), 1815.

まとめ



植物の種類によって、蓄積されたCdの化学形態に違いが見られた。

- ハクサンハタザオの根、葉柄、葉身 : Cd-O

トライコーム(単細胞) Cd-O

- タバコの根、茎、葉 : Cd-S

トライコーム(多細胞) Cd-O

- ヘビノネゴザの根 : Cd-O

地上部の羽片 : Cd-S (7割) と Cd-O (3割)



今後は、根、維管束などの組織や細胞レベルでCdの化学形態を明らかにしていく

- a. 放射光マイクロビームの利用により、植物細胞レベルにおける元素分布と化学状態分析を行なうことが可能となった。
- b. 特に高エネルギーマイクロビームの適用により、Cdを直接分析できるようになった意義は大きい。
- c. 今後、重金属吸収・輸送・蓄積の機構解明を目指す。