

放射光源蛍光 X 線分析装置によるカドミウム・ヒ素局在性の可視化

(独) 農業環境技術研究所 土壤環境研究領域 山口紀子

1. はじめに

カドミウムやヒ素などの有害元素が、土壤から根へ、根から地上部、さらに可食部へと移行する経路上において有害元素の流れが停滞すると、可食部の有害元素濃度の上昇が抑えられる。元素の流れが停滞すると、その場所に有害元素が蓄積する。どこに有害元素が蓄積されているかを特定することで、有害元素の吸収抑制メカニズムを解明するヒントを得ることができる。元素の蓄積部位を同定するためには、高感度で微小領域の元素の分布を分析できる手法が必要である。シンクロトロン放射光源 X 線を励起源とする蛍光 X 線分析は、近年ではナノメートルスケールのビームサイズを達成するなど局所分析の強力なツールのひとつである。放射光源蛍光 X 線分析装置を用いて、植物組織や土壤と根の接する部分のカドミウムとヒ素の局在性をマイクロメートルスケールで可視化した最近の研究成果を紹介する。

2. 放射光源蛍光 X 線分析の原理と特徴

あるエネルギー以上の光を励起源として試料に照射すると、励起された元素から蛍光 X 線が放出される。蛍光 X 線は元素固有のエネルギーをもつため、エネルギーから元素の種類が、強度から濃度に関する情報が得られる。細く絞った電子線や X 線を光源として試料上を走査し、1 点 1 点蛍光 X 線を検出することで、試料上の相対的な濃度の高低を示す等高線図である元素マップが得られる。電子線を励起源とする電子線プローブマイクロアナライザー (EPMA) は、カルシウムなどの必須元素や、重金属高集積植物に蓄積した高濃度の重金属の二次元的な濃度分布を可視化できる有効な手法として利用されてきた。しかし、作物のように高集積性を持たない植物体中の有害元素濃度は低く、EPMA では検出できない。励起源を電子線からシンクロトロン放射光源 X 線に変えることで、特に重金属元素の検出感度を飛躍的に向上させることができる。

シンクロトロン放射光とは、光速まで加速した電子を磁場で急速に曲げたときに接線方向に放出される光である。赤外線から X 線まで広い波長範囲の光を含み、極めて明るく、光源から離れても広がって弱まらずにその明るさを保つという特徴を持つ。蛍光 X 線を効率よく放出させるには、元素ごとに最適なエネルギーがある。シンクロトロン放射光を使うと、分析したい元素に最も適したエネルギーの励起 X 線を選ぶことができる。さらに励起 X 線を細く絞っても、試料上の X 線強度密度を高く保つことができることから、 μm スケールの微小な領域でも高感度分析が可能である。さらに、元素の集積部位を特定後に集積部位に X 線照射位置を固定し、X 線エネルギーを変化させながら蛍光 X 線強度を分析すると、X 線吸収スペクトルが得られる。X 線吸収スペクトルから元素の酸化状態や結合原子の種類を解析すれば、元素の集積部位における元素の形態に関する情報を得ることもできる (日本土壤肥料学会、2012)。

3. スズメノナスビの根によるカドミウム移行抑制

スズメノナスビを台木種として用いると、ナス果実のカドミウム濃度を自根栽培に比べ低減することができる(竹田ら、2007)。Mori *et al.* (2009)は、スズメノナスビでは栽培ナスに比べ、根から導管を通して地上部にカドミウムが移行する量が少ないことを示した。根における導管までの元素の輸送の模式図を図1に示す。根から吸収された元素は、細胞外（アポプラスト）または細胞内（シンプラスト）を通して輸送される。アポプラスト経由の輸送は、内皮に存在するカスパー線(a)によってブロックされてしまうため、元素が導管まで到達するためにはまず、細胞内に取り込まれる必要がある。細胞内に取り込まれるためには、その元素に特異的な輸送体(b)が必要である。さらに内皮を通過し内鞘まで到達した後、導管に取り込まれるためにも、元素に特異的な輸送体(c)が必要である。根の表面から導管に達するまでの経路上のどの部位にカドミウムが蓄積し、導管への輸送に影響を及ぼしているのかを明らかにするために、放射光源蛍光 X 線分析による元素マッピングをおこなった。

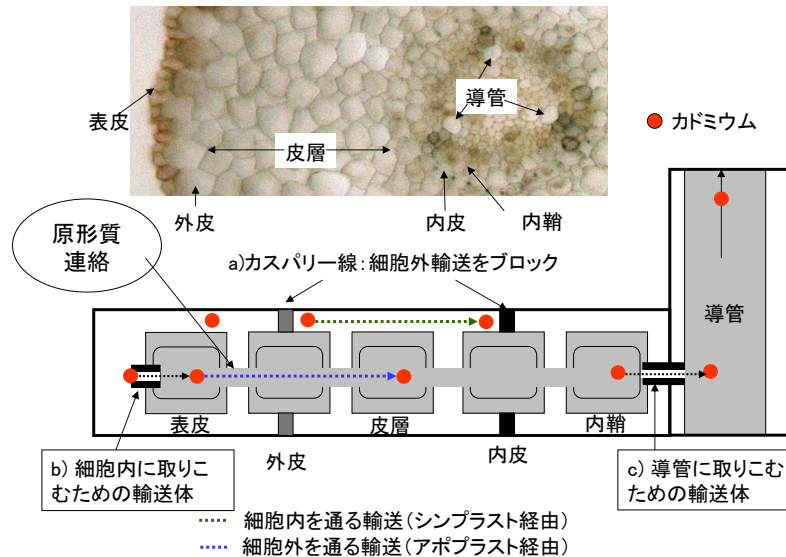


図1 根の表皮から導管までのカドミウムの輸送経路

カドミウム低減効果のあるナス台木品種（スズメノナスビ系統、トルバム・ビガー）と、ナス品種（千両二号）を水耕栽培し、カドミウムを24時間吸収させた。2 μ m径のX線マイクロビームで根の横断切片の表面を3 μ mごとに走査することで、カドミウムの分布を分析した。千両二号ではカドミウムが中心柱、導管まで到達していた。一方、スズメノナスビでは導管まで到達できずに行き場を失ったカドミウムが、内皮近傍に局在していた（図2）。スズメノナスビでは、内皮近傍の細胞によるカドミウムの取り込みが抑制されているため、導管へのカドミウム輸送量が少ないと考えられた（Yamaguchi *et al.*, 2010）。

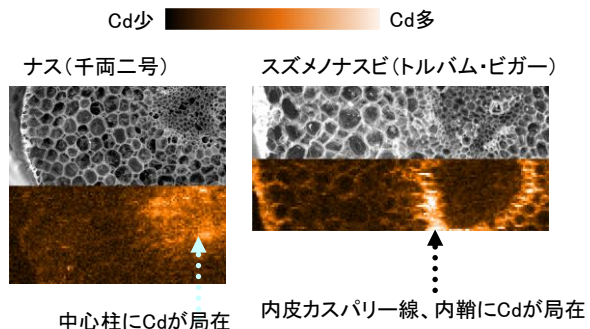


図2 ナスとスズメノナスビの根におけるCd分布のちがい

4. イネの節部におけるカドミウムの移行抑制

イネの第 I 節位は、根から吸収されたさまざまな元素が穂に向かうか、止葉に向かうか、節部に留まるかが決まる分岐点である（図 3）。根から吸収され上昇してきた元素が穂に向かうためには、止葉に向かう維管束（肥大維管束）から穂に向かう維管束（分散維管束）に柔細胞橋を介して輸送される必要がある（図 3）。

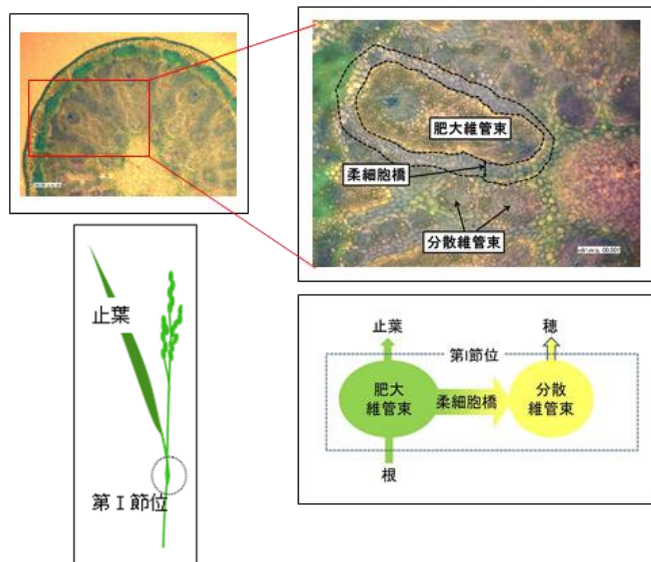


図 3 第 I 節位の位置と維管束における元素の輸送経路

イネを土耕栽培し、出穂から 1 週間後、第 I 節位の横断切片を作成した。放射光源マイクロビーム蛍光 X 線分析装置を利用し、 $2 \mu\text{m}$ 径の X 線マイクロビームで切片の表面を $2 \mu\text{m}$ ごとに走査することで、カドミウムおよびカドミウムと類似の輸送経路が推定されている亜鉛と鉄の分布を可視化し、挙動を比較した。

第 I 節位の横断面では、亜鉛や鉄が柔細胞橋に多く存在しているのに対し、カドミウムは肥大維管束の木部にとどまっている割合が高い傾向にあった（図 4）。亜鉛や鉄は肥大維管束内に滞留せず、柔細胞橋を通過して効率的に穂に輸送されるのに対し、カドミウムは肥大維管束内部に停滞し、穂への輸送が制限されていることが明らかにな多。また、XANES により肥大維管束に局在するカドミウムは硫黄と結合した形態であることが示された（Yamaguchi *et al.*, 2012）。

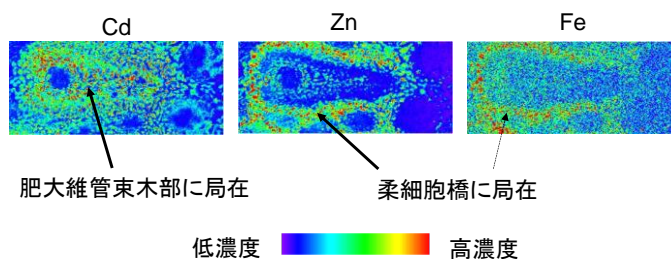


図 4 第 I 節位におけるカドミウム、亜鉛、鉄の分布

5 水稻根の鉄プラークによるヒ素の溶出抑制

イネは、根の通気組織を通して地上部から根に酸素を送り込むことにより還元状態の水田土壌においても生育できる。根の周辺土壌は、イネの根を通して酸素が供給されるため、局所的な酸化状態となる。このため還元環境下で溶存状態にあった 2 価鉄イオンが根の周りに

において酸化し、水酸化鉄として沈着する。根に沈着した水酸化鉄は鉄プラークともよばれる。水酸化鉄がヒ素を吸着しやすいことから、鉄プラークは、根からのヒ素吸収を抑制するバリアとして機能すると考えられてきた。しかし水田の水管理によって変化するヒ素の化学形態によって鉄プラークへの吸着されやすさは異なる。還元状態では、土壌中のヒ素は、還元型の亜ヒ酸が主体である。亜ヒ酸は鉄プラークに吸着するが、酸化型のヒ酸よりも脱離されやすく土壌溶液に溶出しやすい傾向がある。一方、酸化型のヒ酸は鉄プラークに吸着されると容易に脱離しない。酸化還元状態が異なる環境下に存在する根の周辺のヒ素と鉄の分布と化学形態を比較し、鉄プラークが根の近傍でヒ素の不溶化に関与しているかを評価した。

湛水期間中（還元状態）と落水後（還元から酸化への移行時期）の水田から、水稻根を含むよう土壌を採取した。根と土壌の位置関係を保ったまま薄い膜上に加工し、土壌薄片を作成した。放射光源マイクロビーム蛍光 X 線分析装置を利用し、薄片上のヒ素と鉄の分布を分析した。さらにヒ素の蓄積部位において、マイクロビーム X 線吸収スペクトル近傍構造（ μ XANES）により、亜ヒ酸とヒ酸の存在割合を求めた。

湛水期間中、落水後ともに根の周辺では、ヒ素が鉄プラーク上に集積していたが、ヒ素の形態は異なっていた。還元期間中の鉄プラーク上のヒ素の形態は亜ヒ酸が主体だったのに対し、落水後はヒ酸が主体だった(図5)。一方、落水後の土壌バルク中の鉄鉱物上では亜ヒ酸が存在しており、根に近いほどヒ酸の割合が高い傾向にあった。鉄プラーク上では、土壌中にくらべ亜ヒ酸の酸化が早くすすみ、鉄プラークによってヒ素の不溶化が促進されることが明らかになった (Yamaguchi *et al.*, 2014)。

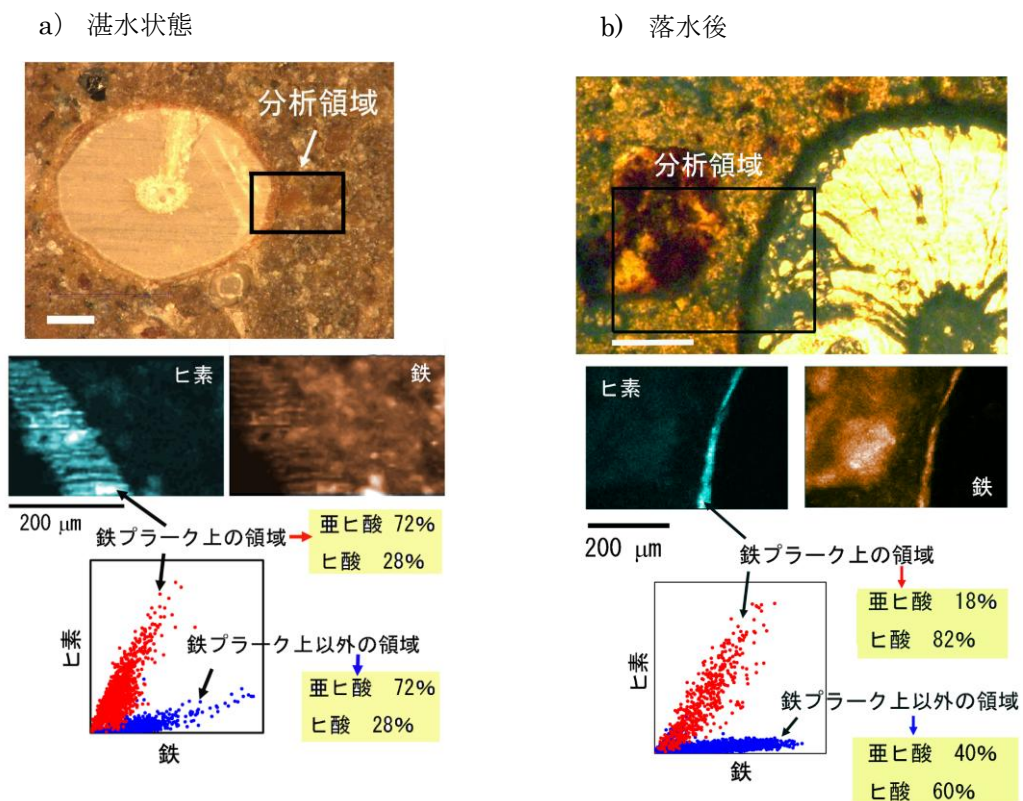


図5 根の周囲におけるヒ素と鉄の分布

6 おわりに

シンクロトロン放射光源マイクロビームを使った局所分析には、微小な領域の限られた瞬間の静止画としての元素マップしか得ることができないという制約がある。植物や土壌のどの場所の、どの瞬間をとらえ、どのようなサンプル調整をすれば知りたい情報を得られるかがわかってくれば、この制約は大きな問題ではないだろう。植物組織や、根と土壌の接する面などの位置関係を維持したままで高感度に元素の分布と形態の分析が可能であるという利点は、抽出や分解を伴う破壊分析法では平均化されて消えてしまう情報を引き出すうえで有用である。

本研究は、生研センター、イノベーション創出基礎的研究推進事業「食の安全を目指した作物のカドミウム低減の分子機構解明」、農水省委託プロジェクト研究「生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発」、放射光施設共同利用研究課題(SPring-8:2008A1087, 2008B1791, 009B1137, 2010A1264, 2011A1639, KEK-PF:2009G595, 2011G016)による成果である。

参考文献

- 1) 日本土壌肥料学会編 (2012) 土壌環境中の有害元素の挙動 放射光源 X線収集分光法による分子スケールスペシエーション, 博友社
- 2) 竹田宏行・佐藤淳・西原英治・荒尾知人 (2007) スズメノナスビ (*Solanum torvum*) を台木とした接ぎ木栽培によるナス果実中カドミウムの低減技術. *土肥誌*, 78, 581-586.
- 3) Mori, S. *et al.* (2009) Xylem loading process is a critical factor in determining Cd accumulation in the shoots of *Solanum melongena* and *Solanum torvum*, *Environ. Exp. Bot.*, 67:127-132.
- 4) Yamaguchi, N. *et al.* (2010) Cadmium distribution in the root tissues of solanaceous plants with contrasting root-to-shoot Cd translocation efficiencies, *Environ. Exp. Bot.* 71:198-206.
- 5) Yamaguchi, N. *et al.* (2012) Role of the node in controlling traffic of cadmium, zinc, and manganese in rice, *J Exp Bot.* 63: 2729-2737.
- 6) Yamaguchi *et al.* (2014) Arsenic distribution and speciation near rice roots influenced by iron plaques and redox conditions of the soil matrix *Environ. Sci. Technol.* DOI: 10.1021/es402739a