

モエジマシダのヒ素吸収特性 -放射光マイクロ蛍光X線分析を用いた As 動態の可視化-

北 島 信 行

概 要

ファイトレメディエーションは、植物を用いて環境汚染を低減・除去する技術である。イノモトソウ科のシダ植物であるモエジマシダ (*Pteris vittata* L.) は、その地上部に As を高濃度で蓄積できる能力を有しており、実際の汚染サイトを対象とした浄化に利用され始めている。

毒性重金属元素である As を高濃度に蓄積しながら胞子を形成し、生活環を完結しうるモエジマシダの高集積能は、きわめて特異的なものであり、それを可能としている機構には未解明の点が多い。筆者の参加する研究グループでは、非破壊分析法としての蛍光 X 線分析を主な研究手法として用いており、放射光マイクロビームを用いた蛍光 X 線イメージングと蛍光 XANES 測定を行っている。この手法を用いることで、植物体内の元素分析と化学状態の評価が位置情報を伴った形で可能となる。ここでは、放射光を X 線源としたマイクロ蛍光 X 線分析によって、As 高集積植物であるモエジマシダの主たる As 蓄積部位である地上部羽片での As 分布と As の価数を調査した結果について報告する。

Measurement of arsenic distribution in a frond of a hyperaccumulator fern Using SR-XRF analysis

Abstract

Phytoremediation, the technology using plants to reduce or remove pollutants from environment, is attractive because of its low cost and low environmental impact. *Pteris vittata* L. is a well known arsenic hyperaccumulating fern. The fern is a strong candidate for use in commercial phytoremediation and has already been used to clean up a number of arsenic-contaminated sites.

It is peculiar that *P. vittata* can complete its lifecycle despite hyperaccumulating arsenic, a toxic heavy metal, in its plant body. To reveal the mechanism of hyperaccumulation, each process of metal accumulation must be understood as a continuous flow of the element between the plant tissues and/or individual cells. For this purpose, synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis is very useful. This report shows the distribution of arsenic in fronds of *P. vittata* examined by SR-XRF imaging, and the valence change in a plant body revealed by the As-K edge μ -XANES spectra.

キーワード: モエジマシダ ヒ素 ファイトレ
メディエーション 放射光蛍光 X
線分析

§1. はじめに

ファイトレメディエーションは、植物を用いて環境汚染を低減・除去する技術である。重金属元素による汚染を対象としたファイトレメディエーションでは、根から吸収された汚染物質が植物体中に蓄積する現象を利用する。すなわち、汚染された土壌、水質で植物を栽培し、重金属を蓄積した植物体を搬出することによって浄化対象の土壌、水質から重金属を除去する手法である。このときの重金属除去量は、植物体生産量と植物体中の重金属濃度との積で表される。したがって、ファイトレメディエーションを効果的に実施するためには、安定した高いバイオマス生産量が確保できる栽培植物の中から重金属吸収能の高い品種を選抜して利用するやり方の他に、特定の重金属を高レベルで吸収・蓄積する能力のある植物種(高集積植物)を探索して汚染浄化に適用する方法がある。

植物それ自体の持つ吸収・蓄積能力を利用するファイトレメディエーションでは、土壌中重金属のうち移動性が大きい化学形態のものが吸収・除去されるため、汚染拡散リスクの低減に有効であると考えられる。重金属吸収能の高い栽培作物を利用する手法では、栽培管理のための体系が確立されており、植物体生産量の予測が立てやすいという利点がある。一方、高集積植物の利用については、その特殊な吸収・蓄積能によって高い効率での汚染除去が期待できるが、現状では野生植物であるものが多く、安定した多収量を得るための栽培手法の確立に多大な努力を要する。

筆者は、高集積植物が重金属元素を根から吸収し、地上部へ移行・蓄積する機構の解明を目的として研究を実施している。本研究で対象とした重金属は As で、イノモトソウ属の植物であるモエジマシダ (*Pteris vittata* L.) がその高集積植物として報告されている¹⁾。筆者の参加する研究グループでは、非破壊分析法としての蛍光 X 線分析を主な研究手法として用いており、放射光マイクロビームを用いた蛍光 X 線イメージングと蛍光 XANES 測定を行っている^{2,3,4,5,6)}。これらの測定によって、植物体内の元素分析と化学状態の評価が位置情報を伴った形で可能となることから、植物組織の構造に対応した生理機能を理解するうえで、極めて有効な研究手段となる。放射光蛍光 X 線分析によって得られる知見は、植物生理の観点から意義深いものであるうえに、実際の浄化サイトにおける栽培管理や浄化予測に資するものと考えている。

ここでは、放射光を X 線源としたマイクロ蛍光 X 線分析によって、As 高集積植物であるモエジマシダの主たる As 蓄積部位である地上部羽片での As 分布と As の価数を調査した結果について報告する。

なお、本研究は、東京理科大学中井研究室と共同で実施したものである。また、今回、報告する試験結果は「第 12 回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会」にて発表したものである。

§2. 試験方法

2.1 モエジマシダの栽培

実汚染土壌(As の全含有量 480mg/kgDW)を 3 号のポリポット(上部直径 9cm)に乾土換算で 250g ずつ充填し、孢子散布から 6 ヶ月を経過したモエジマシダをポット当たり 1 株植えつけた。汚染土壌に移植した後に 3 週間を経過した株を放射光蛍光 X 線イメージングと蛍光 XANES スペクトル測定に供した。

栽培は人工光型ファイトトロン内で行い、照度 5、000lux(照明時間 16 時間)、昼温 27.5℃、夜温 22.5℃にて管理した。相対湿度は、湿度センサー出力に対応した加湿器によって 70~80%に調整した。

2.2 放射光蛍光 X 線イメージング

放射光を X 線源とした 2 次元の蛍光 X 線イメージングは、高エネルギー加速器研究機構(茨城県つくば市)のフotonファクトリー(PF)のビームライン BL-4A にて実施した。イメージングでは、対象とした範囲に応じた解像度を選択し、200 μ m サイズのビームと 5 μ m 程度のマイクロビームを使い分けて段階的に測定を実施した。すなわち小羽片全体を対象とした広範囲の測定では 200 μ m $\times$ 200 μ m サイズの X 線ビームを使用し、羽片断面における細胞レベルのイメージングでは 5.5 μ m $\times$ 3.5 μ m のマイクロビームを用いた。

励起にもちいる X 線は As に対して励起効率の良いエネルギーに設定し、この X 線を試料に照射して発生した蛍光 X 線を Si(Li)半導体検出器を用いて測定した。200 μ m $\times$ 200 μ m のビームサイズを用いた測定では、中軸から切り離れた小羽片をアクリル製ホルダーに貼り付け、ホルダーを X-Y ステージに固定して、パルスモーター制御によって試料表面を XY 方向に走査した。この測定では株元からの出現順に発達ステージの異なる羽片 4 種類を対象とした。具体的には①古い羽片のうち孢子嚢を着生しないもの(Old 孢子なし)、②古い羽片(Old)、③成熟した羽片(Mature)、④新しい羽片(Young)の 4 種類である。

5.5 μ m $\times$ 3.5 μ m サイズのマイクロビームでは、Mature の羽片周縁部にある孢子嚢着生部位を測定対象として、スライサー(HS-1 日本分光)を用いて作成した切片(厚さ約 200 μ m)をアクリル製ホルダーに貼り付けて、試料断

面の走査を行った。

2次元で得られた蛍光 X 線強度を、測定範囲中の最強点を赤、最低点を青とした 256 階調のカラースケールに対応させて元素分布の表示画像とした。

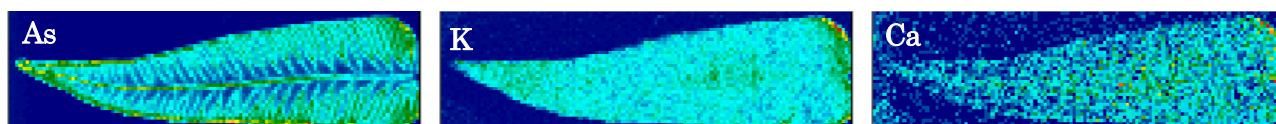
2.3 非破壊分析による As の価数評価

モエジマシダ植物体に含まれる As の価数評価は、PF の BL-12C にて As K-edge(11.867keV)の X 線吸収端近傍構造 (XANES) スペクトルの測定によって行った。各元素の X 線吸収スペクトルは、酸化・還元や近接原子の影響によって起こる電子構造の変化を反映してシフトを生じる。価数評価を行う場合には、価数が既知である化合物を参照試料として X 線吸収スペクトルを測定し、試料から得られたスペクトルにおけるピークのエネルギー値を

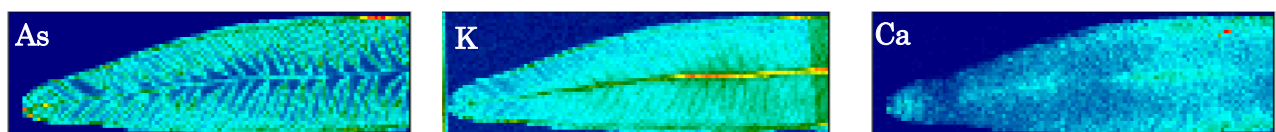
参照試料のピークトップの値と比較する。本報告で対象とした As については、参照試料として 3 価の As には As_2O_3 を 5 価のものとしては H_3AsO_4 をそれぞれ用いて X 線吸収スペクトルを測定した結果、スペクトルのピークトップに 4eV 程度の明瞭なケミカルシフトが認められた。そこで、これらの参照試料と実試料の XANES スペクトルを比較することによって、試料に含まれる As の価数評価を行うこととした。

価数評価に用いた X 線ビームのサイズは約 1mm であり、ポットに植えつけたままの状態のモエジマシダをビームラインの実験ハッチ内に持ち込み、X 線ビームと光軸を合わせたレーザーポインターによって照射位置を設定し XANES スペクトルの測定を行った。

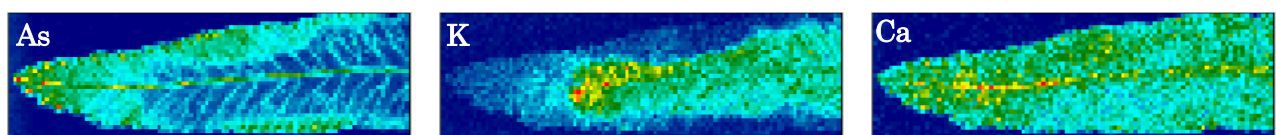
④ Young



③ Mature



② Old



① Old 胞子なし

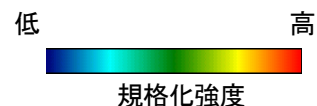
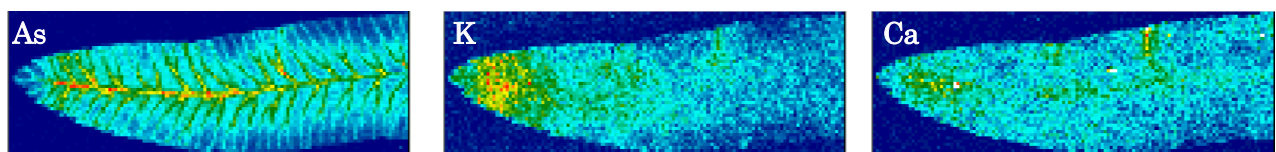


図1 発達ステージの異なる小羽片の2次元蛍光X線イメージング結果

X線エネルギー：16.5keV X線ビームサイズ：200×200 μm

走査幅：200×200 μm 測定時間：3秒/ピクセル

測定領域：100×32 ピクセル

各元素の蛍光X線強度を規格化し、相対的なカラースケールで表示している。赤は強度が強く、青は低いことを示す。

§3. 結果および考察

3.1 小羽片の 2 次元蛍光 X 線イメージング

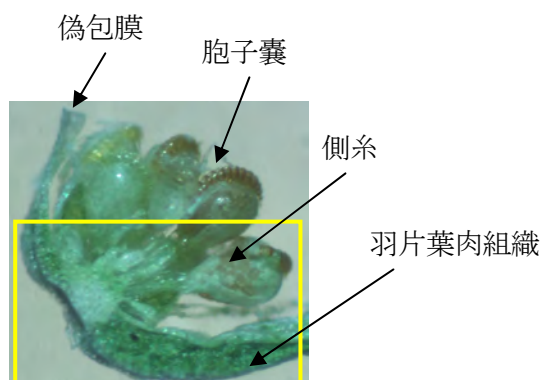
図1にモエジマシダ小羽片の 2 次元蛍光 X 線イメージングの結果を As、K、Ca の各元素について示した。まず、As の分布について、小羽片の発達ステージごとにみると、図中①に示した Old 孢子なしでは葉脈に沿って As が分布し特に主脈で高い蛍光 X 線強度が測定されたのに対して、孢子を着生する Old、小羽片周縁部に As の濃集が認められた。

これらの結果から、As は小羽片の組織全体に一樣に分布するのではなく局在していることが明らかになり、As の濃集する領域が小羽片の発達ステージに応じて異なることが判った。また、K、Ca の必須栄養元素では Old 孢子なし、Old、Mature で葉脈に沿った分布が認められたのに対して、Young では少羽片の組織全体

に一樣に分布していた。

モエジマシダでは、小羽片周縁に沿って孢子囊が着生する。すなわち、Old、Mature、Young で As の局在が認められた領域は、孢子囊を含むかあるいはそのごく近傍の領域である。しかし、As 汚染土壌で栽培したモエジマシダにおいて孢子形成の阻害が認められることはない。そこで、この孢子囊着生部位に着目し、組織切片横断面における As 分布を、X 線マイクロビーム(ビームサイズ $5.5\ \mu\text{m} \times 3.5\ \mu\text{m}$)によって測定した。

図 2 にそのイメージング結果を示した。図中(b)にみられるように As は孢子囊基部に相当する領域に特に高濃度で蓄積されていることが明らかとなった。また、K、Ca といった必須栄養元素が孢子囊にも分布している(図中(c)、(d))のに対して、As では孢子囊への移行が強く抑制されているという極めて興味深い結果が得られた。



(a) 孢子囊周辺の顕微鏡写真
黄色の枠はイメージングを行った領域を示す。

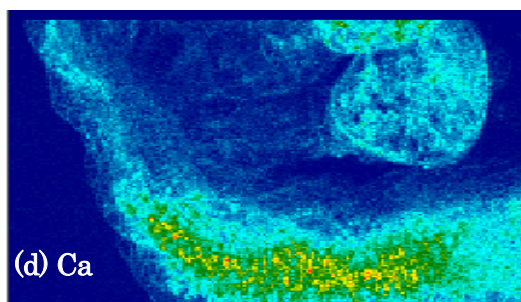
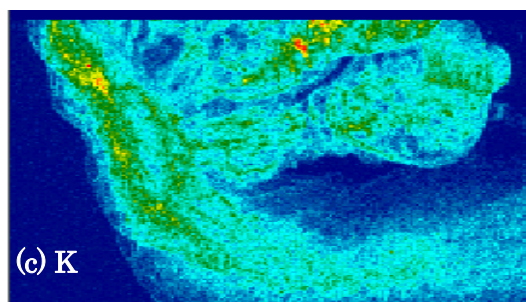
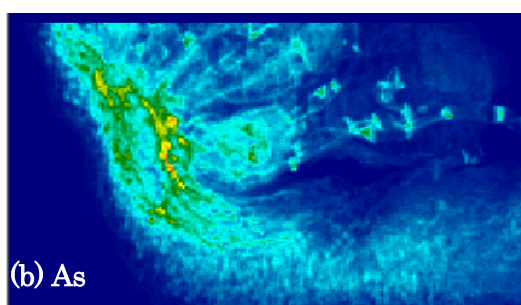


図 2 マイクロ X 線ビームを用いた、孢子囊周縁部の 2 次元蛍光 X 線イメージング
X 線エネルギー：16.5keV X 線ビームサイズ： $3.5 \times 5.5\ \mu\text{m}$
走査幅： $3.5 \times 5.5\ \mu\text{m}$ 測定時間：1 秒/ピクセル
測定領域： 180×125 ピクセル
各元素の蛍光 X 線強度を規格化し、相対的なカラースケールで表示している。赤は強度が強く、青は低いことを示す。

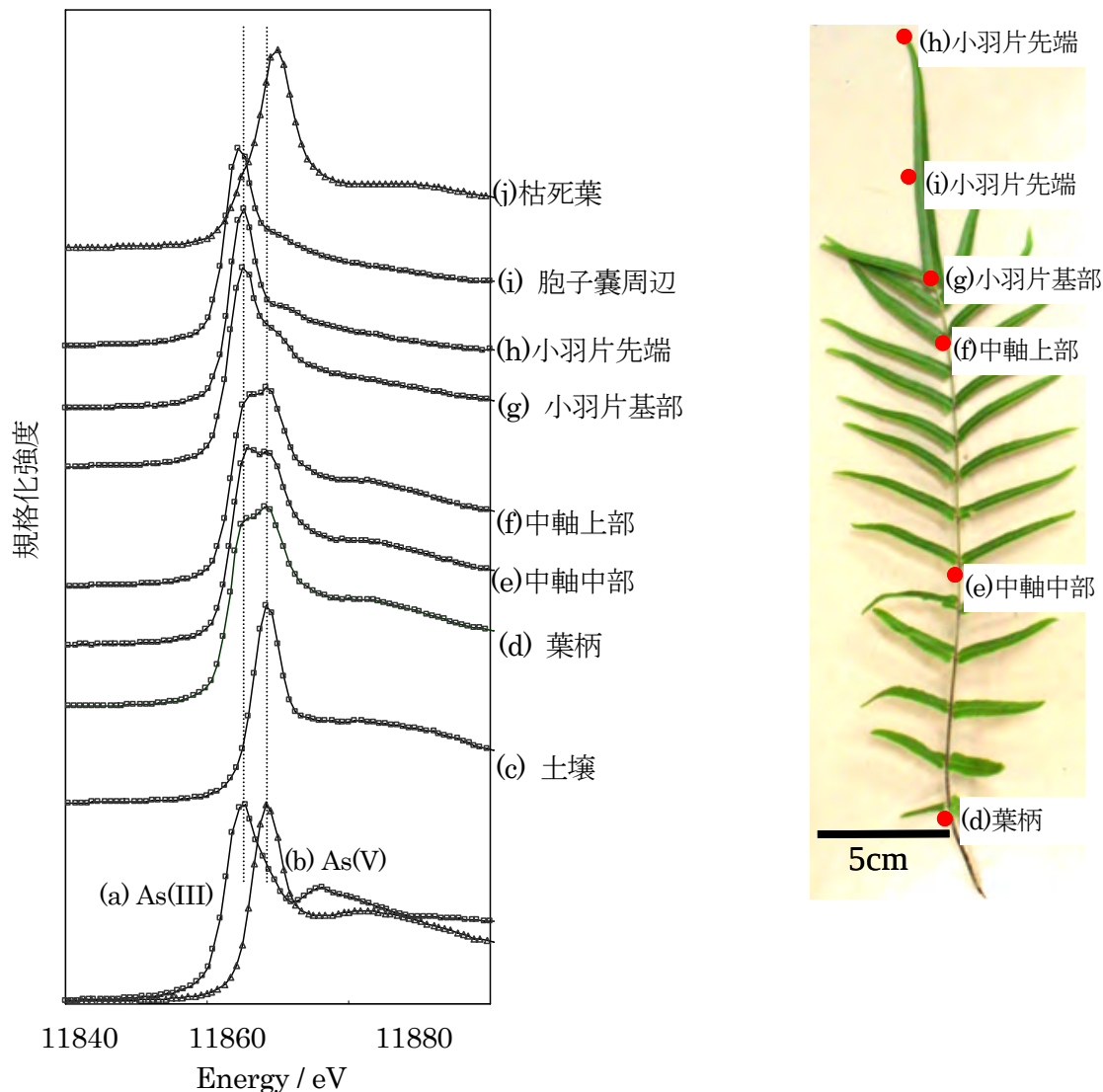


図3 As K-edge XANES スペクトルの測定結果
 (a) As_2O_3 (b) H_3AsO_3
 (c) 栽培土壌
 (d)～ (i)モエジマシダ羽片上の測定結果

3.2 As の価数評価

図3に蛍光法で測定したAs K-edge XANES スペクトルを示した。先に述べたように、価数が既知であるAs化合物(図中(a) As_2O_3 : As III (b) H_3AsO_3 : As V)から得られたXANESスペクトルにおけるピークトップのエネルギー値を基準として、試料から得られたスペクトルと比較することによって試料に含まれるAsの価数評価を行っている。

栽培に用いた実汚染土壌のスペクトル(図中の(C))から、土壌に含まれるAsは5価であると判断された。しかし、植物体に吸収された後のAsでは、XANESスペクトルのピークが低エネルギー側にシフトしており(図中(d)～(i))、Asが3価に還元されたことを示している。また、図中に見られるように(d)葉柄から(f)中軸上部にかけては3価と5価のAsが共存しているのに対して、(g)小羽片基部から(i)胞子嚢では3価のAsが主体であった。一方、

図中(j)に示したように枯死葉に含まれているAsは5価であった。生物に対するAsの毒性はその化学形態によって大きく異なっており、一般に3価のAs化合物における急性毒性は5価の化合物よりも高い⁷⁾。ここに示したモエジマシダ体内でのAs還元は奇妙でかつ興味深い現象である。このAs還元作用とAsの吸収・移行・蓄積の各過程との関連性を解明していくことが、モエジマシダによるAs高集積機構を本質的に理解していく上で重要な事柄であると考えている。

なお、ここではスペースの都合で紹介できなかったが、我々は高輝度光科学研究センター(JASRI) SPring-8(兵庫県佐用郡)のBL-37XUでも1 μ mサイズのマイクロビームを用いて高解像度の測定を行っており、細胞レベルでの元素分布と化学状態の知見が得られつつある。生体におけるヒ素化合物の吸収、輸送に関しては、まだ未解明の部分が多い。植物の生理機能とあわせて理解するためには、できるだけ非破壊測定が望ましいことから、今後も放射光を利用したX線分析の活躍が期待される。

参考文献

- 1) Ma, L.Q. et al., Nature, 409, p.579, 2001
- 2) A. Hokura et al., Journal of Analytical Atomic Spectrometry, pp. 321-328, 2006
- 3) 北島信行ら, X線分析の進歩 37, pp.301-310, 2006
- 4) 保倉明子ら, 日本分析化学会第66回分析化学討論会講演要旨集, p.3, 2005
- 5) N. Kitajima et al., Proceedings of XRM2005, IPAP Conference Series, in press
- 6) R. Onuma et al., Proceedings of XRM2005, IPAP Conference Series, in press
- 7) 藤永太郎 監修:海と湖の化学, 京都大学学術出版会, pp.332-342, 2005



ひとこと

モエジマシダを利用したヒ素汚染
土壌のファイトレメディエーションは、
研究開発から実用化のフェーズに移行し
ています。今後も本技術の普及、拡大に
努めます。

北島 信行