

2016B1228, 2017A1196
2018B1175BL37XU
BL05XU

スギ樹幹半径方向のミネラル移動機構の解明に向けた凍結木材試料への放射光マイクロ蛍光エックス線分析の適用

Application of Synchrotron Micro X-Ray Fluorescent Analysis on Frozen-Hydrated Samples for Understanding Radial Mineral Movement in Japanese Cedar Tree Trunk

黒田 克史^a, 大橋 伸太^a, 半 智史^b
Katsushi Kuroda^a, Shinta Ohashi^a, Satoshi Nakaba^b

^a森林総合研究所, ^b東京農工大学大学院農学研究院

^aForestry and Forest Products Research Institute,

^bInstitute of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology.

樹木の幹の半径方向のミネラルの移動機構を解明するために、ミネラル移動のトレーサーとしてスギ樹幹に実験的にセシウムを注入し凍結固定した。この凍結試料を用いて、SPring-8の放射光マイクロ蛍光エックス線分析装置でセシウムの移動部位を可視化する方法を検討した。その結果、スギ凍結試料の細胞レベルのセシウムマッピングが可能で、注入セシウムの分布解析には解像度を高くするために長時間測定が有用なことで、ただし長時間測定中の安定した凍結維持には解決すべき課題があることが明らかになった。

キーワード： スギ、ミネラル、凍結、蛍光エックス線分析

背景と研究目的：

樹木は土壌中のミネラルを根から吸収し太い幹を經由して樹木全体に供給する。幹内でミネラルは上下の移動だけでなく、外から内、あるいは内から外の半径方向の移動も行われている。この半径方向の移動は放射柔細胞の機能によるものと考えられてきた。放射柔細胞は、幹の外側から内側まで半径方向に連続する細胞である。しかしながら、これまでに報告された論文を注意深く読むと、この通説は実験によって直接的に証明されていないことが分かった。そこで我々は、樹木の太い幹の中でミネラルが幹半径方向をどのように動くのかを直接的に証明する実験設計に取り掛かった。

もっとも重要な設計事項の一つは、樹木の内部で起きている現象をそのまま解析する工夫である。幹内部は大気に比べて負圧になっており、解析のために試料を伐採、採取することにより内部の水や溶解している成分が立木の状態から簡単に变化してしまう。そこで筆者らは、幹半径方向のミネラル移動のトレーサーとして安定同位体セシウム(Cs)をスギ立木の幹に一定期間注入し、幹を凍結固定させてから伐採、採取した。この凍結試料を用いて細胞レベルのCs分布をエネルギー分散型エックス線装置付属のクライオ走査電子顕微鏡(クライオSEM/EDX)で解析し、注入したCsが幹半径方向に柔細胞の機能と細胞壁等で起こる拡散の複合で移動することを明らかにした[1-3]。これらの結果は点分析(二次電子像で選定した点におけるCsの有無を判断)により得られたが、一方で、測定した点と点の間の移動をとらえるために元素マッピングを試みた[1]。しかしながら、解析する組織におけるCs濃度が低いためマッピング構築に長時間の測定が必要であり、結果として電子線照射によるダメージで細胞構造が破壊されてしまい解析ができなかった。また、濃度が高い部分ではマッピングが可能であったが、観察面全体にCsが存在しており移動部位の特定はできなかった。そのため、柔細胞間あるいは柔細胞と周囲の細胞間のミネラル移動の実態解明という課題は残されたままである。

高感度の元素マッピングとして放射光マイクロ蛍光エックス線分析が知られている。近年SPring-8のBL37XUビームラインでは植物中の元素分布について凍結試料を用いた解析が報告された[4-6]。この装置では、照査する放射光のサイズを小さくすることで高感度かつ試料ダメージ

が少ない元素マッピングが可能のため、スギの樹幹に注入した Cs の移動部位が凍結試料の元素マッピングにより解明されることが期待される。本報告では、スギ凍結試料を用いた Cs 移動解析を SPring-8 の放射光マイクロ蛍光エックス線分析装置により実施し、その有効性について検証した。

実験：

試料は森林総合研究所千代田苗畑に成育する直径約 15 cm のスギ立木を用いた。スギ立木の幹に小穴を開け、ミネラル移動解析のトレーサーとして Cs を含む溶液を注入した。立木の幹を液体窒素で凍結固定してから伐採する立木凍結固定伐採法を用い溶液注入部付近から厚さ 1 cm の凍結円板を採取した (図 1)。この凍結円板試料を細切し、凍結マイクローム (Cryostar NX70, Thermo Fisher Scientific, Tokyo) を用いて厚さ 10 μm の連続切片を作製した。各凍結切片はスライドガラスに挟み -80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。凍結試料の SPring-8 への搬送は、ドライアイスを入れた発泡スチロール箱に試料を入れて行った。一部の凍結切片は、スライドガラスに挟んだ状態で凍結乾燥機 (FD-1000、東京理科機械、東京) を用いて凍結乾燥させドライ測定用試料とした。

蛍光エックス線分析は SPring-8 の BL37XU (2016B1228 と 2017A1196) および BL05XU (2018B1175) で行った。測定切片は中央に穴を開けたアクリル板の試料ホルダーに切片が中央に収まるように載せスコッチテープで固定し、専用試料ホルダーに取り付け、蛍光エックス線装置の自動ステージに設置した。凍結試料の場合、一連の作業はドライアイス上で凍結を維持しながら行い、自動ステージに設置後は専用のクライオジェット (Oxford Instruments, UK) を用いて冷却された液体窒素ガスを試料に噴霧し試料の凍結を維持した。乾燥試料はすべての工程を室温で行い、BL37XU のデジタル顕微鏡で切片を観察し、切片位置を蛍光エックス線分析装置と連動させてから自動ステージに設置した。

蛍光エックス線は、エネルギー 10 keV、ビームサイズ縦 0.8 μm 、横 0.7 μm (BL37XU) あるいは縦 2.0 μm 、横 1.3 μm (BL05XU) の条件で、シリコンドリフト検出器で測定した。



図 1 試料の採取と調整

スギ立木に Cs 溶液を注入し (A, B)、立木凍結固定伐採法により試料を採取 (C)。凍結を維持したまま赤色の注入部から幹中心方向に連続した小ブロックにし (D-F)、凍結マイクロームで凍結切片を作製した。

結果および考察：

1. 測定条件の検討

BL37XU の蛍光エックス線装置では、座標が連動したデジタル顕微鏡システムの利用により凍結乾燥試料の測定では測定部位の特定を容易に行うことができる。しかし、デジタル顕微鏡は凍

結試料には対応していないため、測定ターゲットとなる細胞の位置を決定する予備測定（ラフスキャン）が必要である。そこでまず、凍結乾燥試料を用いて蛍光エックス線の測定条件を検討した。細胞の形態の把握は、スギ細胞に多く含まれるカリウム (K) やカルシウム (Ca) の分布で行った。積算時間が 0.2 秒の条件で測定ステップ幅を変えて測定したところ、細胞形態を把握するためにはステップ幅 $2.5\ \mu\text{m}$ 程度に小さくすることが必要であることが分かった (図 2)。また積算時間 0.2 秒でステップ幅 $2.5\ \mu\text{m}$ の約 2.5 倍となるそれぞれ 0.5 秒と $4.5\ \mu\text{m}$ の測定では同等の細胞形態の把握が可能であった。本装置の測定ではステップ毎の積算時間以外にステップ間の移動に時間を要するため、ラフスキャンに要する時間の縮小にはステップ幅を大きくする条件設定が有効である。

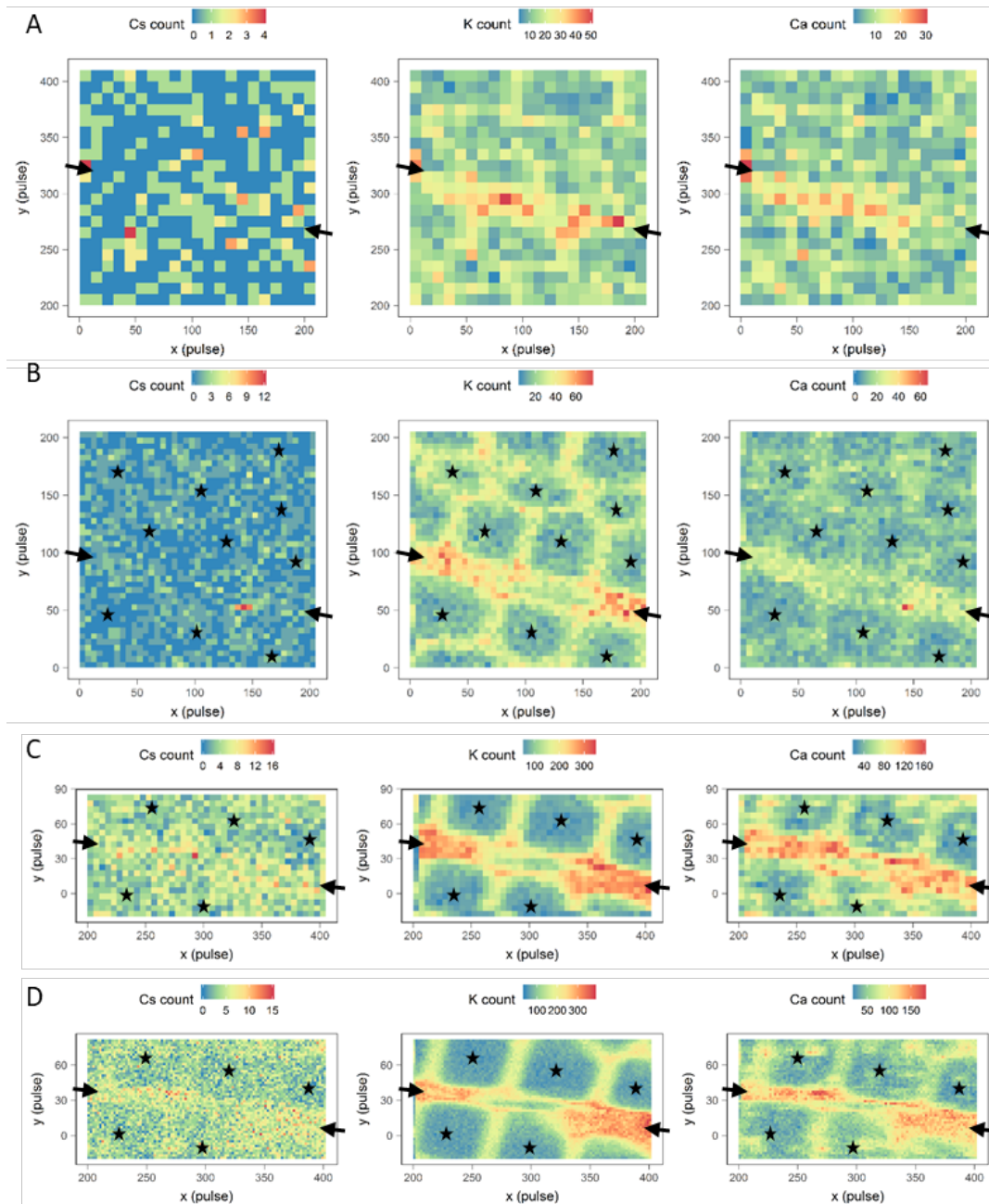


図 2 凍結乾燥試料を用いた測定

BL37XU で幹横断面を解析。ステップ幅/積算時間は (A) $5\ \mu\text{m}/0.2$ 秒、(B) $2.5\ \mu\text{m}/0.2$ 秒、(C) $2.5\ \mu\text{m}/1.0$ 秒、(D) $1.0\ \mu\text{m}/1.0$ 秒。セシウム ; Cs (左)、カリウム ; K (中)、カルシウム ; Ca (右)。矢印は放射柔細胞、星印は仮道管。1 pulse = $0.5\ \mu\text{m}$

ラフスキャンにより測定部位を決定した後、高精細なマッピング像を得るファインスキャンを行う。本装置では、ステップ幅 $1\ \mu\text{m}$ で積算時間 1.0 秒の条件で、高精細な像を得ることができた (図 2)。この条件で縦・横= $100\ \mu\text{m} \cdot 100\ \mu\text{m}$ の範囲を測定するのにおよそ 7 時間かかった。測定時間がおよそ半分であるステップ幅 $2\ \mu\text{m}$ で積算時間 1.0 秒の条件で測定した場合は、細胞ごとの Cs 分布の解析は可能であったが、細胞内容物あるいは細胞壁内の分布を解析するためには前者の条件以上の長時間測定が必要と言える。

BL05XU の蛍光エックス線装置でも同様に条件を検討し、ラフスキャンはステップ幅 $20\text{--}30\ \mu\text{m}$ で積算時間 $0.22\text{--}0.34$ 秒、ファインスキャンはステップ幅 $2\ \mu\text{m}$ で積算時間 0.16 秒の条件で測定した。BL37XU の設定よりもビームサイズが大きいため、エックス線の検出効率は高くなるが、解像度は低くなる。そのため細胞内容物あるいは細胞壁内の分布のような微細構造の解析にはより小さなビームサイズ設定が適すると考えられる。以上の結果は、限られたビームタイムの中で多くの有用なデータを蓄積するために、目的に合わせた各種条件を設定して解析することが重要であることを示している。

2. セシウムの分布

事前に行ったクライオ SEM/EDX 分析で Cs が検出された幹試料から、横断面、接線断面、放射断面の 3 方向の切片を作製しマイクロ蛍光エックス線解析を行った。これら 3 方向の断面それぞれで Cs のマッピング像の取得に成功した (図 3)。横断面の測定では、Cs の検出範囲はクライオ SEM/EDX の点分析で得られた結果と同じ傾向を示すことができた。加えて、放射柔細胞と仮道管の細胞壁の両方で Cs が検出された部位において、検出強度は放射柔細胞が周囲の仮道管細胞壁よりも高い傾向をとらえることができた。この傾向は、接線および放射断面の解析でも確認された。以上の結果は、注入された Cs はおもに放射柔細胞を移動し、その一部は周囲の細胞へ滲出している可能性を示唆する。

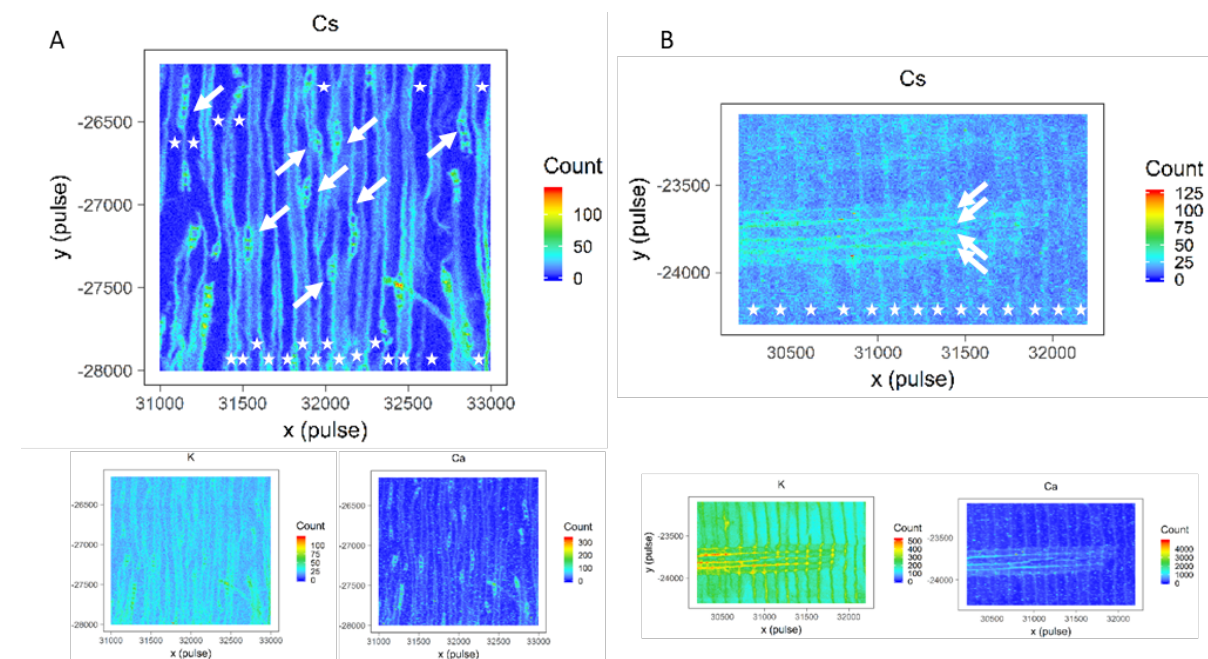


図 3 凍結試料を用いた測定

BL05XU で幹接線断面 (A) と放射断面 (B) を解析。ステップ幅/積算時間は $2\ \mu\text{m}/0.16$ 秒。セシウム ; Cs (上)、カリウム ; K (下左)、カルシウム ; Ca (下右)。矢印は放射柔細胞、星印は仮道管。1 pulse = $0.25\ \mu\text{m}$

マイクロ蛍光エックス線解析の結果は、これまでに得られた横断面のクライオ SEM/EDX の点分析の結果と一致していた [2-3]。加えて、マイクロ蛍光エックス線による幹の 3 方向のマッピングデータは、樹木内のミネラル移動の実態を三次元的に理解するために有用なデータであった。以上のことから、SPing-8 の放射光マイクロ蛍光エックス線分析は凍結試料を用いたミネラルの移

動解析の重要なツールであるといえる。一方で、クライオ SEM/EDX やマイクロ蛍光エックス線解析では細胞内容物や細胞壁内の分布の違いを解析することはできなかった。ミネラル移動機構の解明のためには、さらに高精細な解析が必要である。

3. 課題と解決法

BL37XU で長時間測定を行ったほとんどのマッピング像で画像の乱れが確認された (図 4)。この画像の乱れは、試料を自動ステージに設置してからある程度の時間が経過した後に発生した。このときクライオジェットで冷却している試料周辺に霜が堆積していた。これらの事実から、霜の堆積が影響して画像の乱れが発生したと考えた。同様の画像の乱れは BL05XU の装置でも発生した。BL05XU には試料ステージを写すカメラが設置されており、試料の状態や冷気の流路をモニターできる (図 5)。そこで、モニターを見ながら冷気噴出口と試料との距離や角度の調節を行い、これらの原因について検証した。その結果、自動ステージへの試料設置から時間が経つと、試料ホルダーあるいは試料ステージに霜が付着し、冷気の流路が変わり場合によっては試料の融解につながることで、蓄積された霜の重みで試料が変形すること、霜が落下する際に切片が動くことなどが画像の乱れの要因であることが分かった。

霜付着を防ぐには試料ステージ周囲環境の湿度をできるだけ下げる必要がある。一方で現状の BL37XU、BL05XU ビームラインのシステムでは対応は難しい。ファインスキャンのためには長時間の測定が不可欠なため、長時間測定の直前に霜を取り除く作業を行い霜付着による障害の発生までの時間を長くする工夫が有効であろう。また、取得されたマッピング像のうち画像の乱れない部分は信頼できるデータとして使用することや、画像の乱れが発生した部分から再測定を行うなどの運用が望ましいと考えられる。

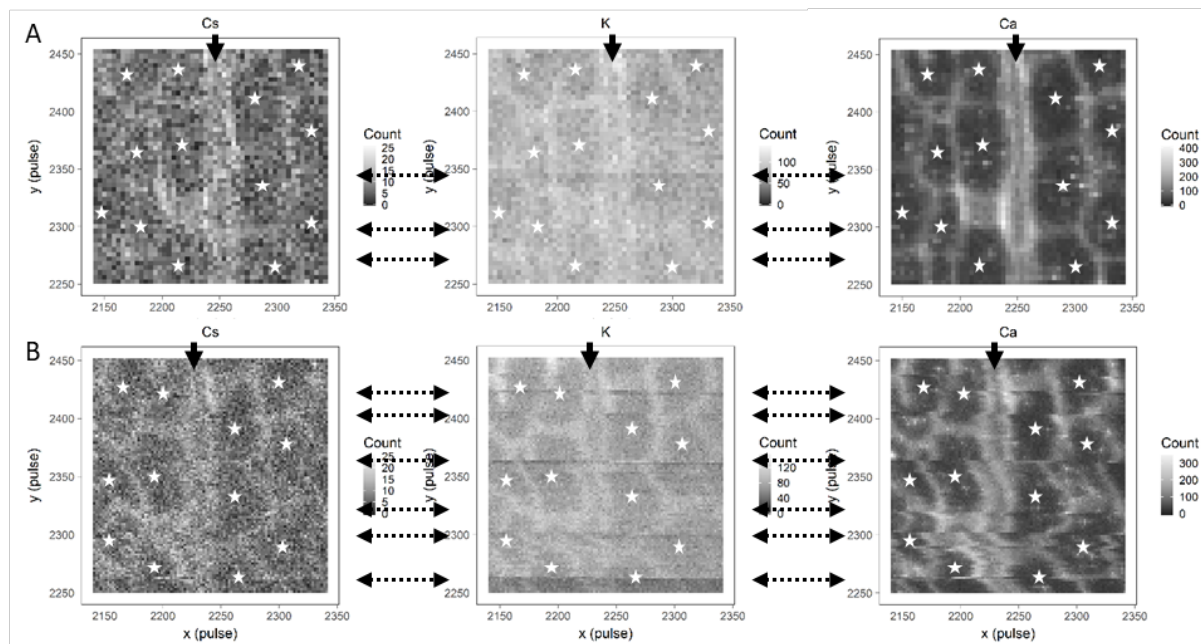


図 4 凍結試料を用いた本測定

BL37XU で幹横断面を解析。高解像の解析ではマッピング像に乱れが生じた (破線両矢印)。ステップ幅/積算時間は (A) $2\ \mu\text{m}/1.0\ \text{秒}$ 、(B) $1\ \mu\text{m}/1.0\ \text{秒}$ 。セシウム ; Cs (左)、カリウム ; K (中)、カルシウム ; Ca (右)。矢印は放射柔細胞、星印は仮道管。1 pulse = $0.5\ \mu\text{m}$

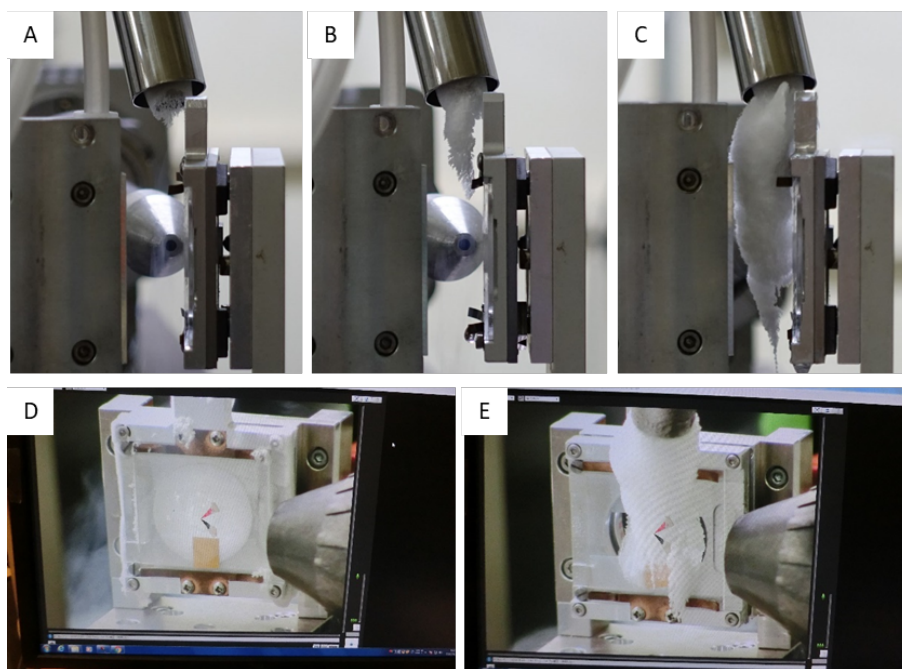


図5 測定中の霜発達の様子

測定時間が長くなると霜が発達し (A→B→C, D→E)、測定の障害となる。BL05XU に設置された試料モニターによる確認 (D, E) で、霜の発達程度を観察し像障害の発生を抑える。

まとめ：

樹木の幹内のミネラルの移動は、前年に吸収した養分を翌年にも効率よく利用するために不可欠な機能であり、そのメカニズムの解明は樹木の長寿命のための戦略を知る手がかりとなる。さらに、樹木内のミネラル移動は、2011年の福島第一原子力発電所事故後に放射性 Cs が樹木内部に蓄積した原因解明や今後の樹木および森林内の放射能汚染の動向の予測にも大きく関係する重要な知見である。

本研究で、S**Spring-8** の放射光マイクロ蛍光エックス線分析は樹木幹内部の放射方向のミネラルの移動機構の研究の有効なツールであることが示された。本報告で示したように、幹の3方向の断面で組織・細胞を解析することはミネラルが移動する様子を理解するうえで有用である。ミネラル移動機構の解明に向けて、限られたビームタイムを有効に活用してデータを蓄積する必要がある。

謝辞：

本研究の一部は科研費 (JP16H04936, JP18H02258) により行われた。

参考文献：

- [1] K. Kuroda, K. Yamane, Y. Itoh, *Trees*, **32**, 1505 (2018).
- [2] K. Kuroda, K. Yamane, Y. Itoh, *Forests*, **11**, 562 (2020).
- [3] K. Kuroda, K. Yamane, Y. Itoh, *Forests*, **12**, 251 (2021).
- [4] 北島信行, S**Spring-8** 利用課題実験報告書, 2006B1619/BL37XU.
- [5] 若林昌嘉, 堤祐司, S**Spring-8** 利用研究成果集, **6**, 212, 2014B1723 (2018).
- [6] T. Kashiwabara *et al.*, *Metallomics*, **13**, mfab009 (2021).

(Received: February 28, 2022; Accepted: April 11, 2022; Published: June 30, 2022)