

連載ミニレビュー

作物の形態研究法：マクロからミクロまで 作物研究における低真空走査電子顕微鏡と X 線微量分析の利用

阿部淳¹⁾・森田茂紀¹⁾・安萍²⁾

(¹⁾ 東京大学大学院農学生命科学研究科, ²⁾ 鳥取大学乾燥地研究センター)

はじめに

電子顕微鏡は、植物の微細構造を明らかにすることで、形態のみならず生理や生化学なども含めた多様な課題について研究の進展に寄与してきた。この連載ではすでに、透過型電子顕微鏡について解説しているが (三宅 2005)、本稿では、低真空走査電子顕微鏡による形態観察をかいつまんで紹介し、さらに X 線微量分析装置と組み合わせた分析法を取り上げる。高価な機器ではあるが、学部や研究所の共用備品として保有している機関も少なくないので、形態を機能と関連づけて検討するための道具のひとつとして活用されたい。

1. 低真空走査電子顕微鏡の利用

表面構造を立体的に観察できる走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope; SEM) は、試料の前処理が比較的簡便なことに加え、コンピューターも含めた工学技術の発達に伴って性能が格段に向上し、操作や調整が容易になったことから、多くの研究者に利用されている。SEM は、試料を真空に近い状態 (高真空) のチャンバー内において電子線を当てた際に発生する 2 次電子を観察するもので、水分を含む試料は、急速な真空乾燥に晒されて発生する水蒸気が観察の妨げとなる。したがって、前処理において、いかに変形が少ないように乾燥させておくかがポイントとなる。生物試料の場合、グルタルアルデヒドなどで固定し、必要に応じてオスmium酸による浸軟処理などを経て、脱水処理後に乾燥する。t-ブタノールで脱水して凍結乾燥したり、エタノールで脱水して臨界点乾燥装置で乾燥することが多い。その後、カーボンまたは白金や金によるコーティングを行う。乾燥やコーティングには専用の装置があり、透過型電子顕微鏡観察やパラフィン包埋による光学顕微鏡観察の前処理に比べると簡便である (日本電子顕微鏡学会関東支部 2000 など)。SEM 本体もコンパクトになり、水冷装置不要で建物内を随時移動して单相 100 V の普通のコンセントで使える機種なども登場している。

SEM がチャンバー内の気圧を数 Pa まで下げた高真空とするのに対して、低真空走査型電子顕微鏡 (environmental scanning electron microscope, 環境制御型電子顕微鏡と訳すこともある; ESEM) は、チャンバー内の気圧を 500 Pa 程度に保持して観察し、画像の鮮明さでは SEM にやや劣るが、試料から発生する水蒸気が問題にならない。植物も堅牢な試料であれば、前処理なしでそのまま観察できる。こ

のことは、初心者でも比較的容易に多数の標本を観察できるという利点をもたらすとともに、コーティングを要しないために後述のような試料の構成元素を分析することも可能にした。ただし、低真空とはいえ ESEM においてもチャンバー内では低気圧のため試料から水分が蒸発し収縮が起こる。成熟した葉や根など比較的堅牢なものであっても徐々に収縮するため、形態観察が主目的であれば、短時間に撮影を済ませることが望ましいし、若い組織などは、凍結乾燥などの前処理が必要である。古い機種では解像度との兼ね合いも問題で、高解像度での撮影には長い時間がかかって 1 画像の撮影中にも試料が変形することが多々あるが、ここ数年の新しい機種では改善されている。逆に、SEM でも、近年では低電圧での鮮明な観察を可能にし、コーティングを不要にした機種がある。こうした機種では、成熟した穎花など堅固な試料は、全く前処理なしで ESEM と同様な手軽さで観察できる。なお、蒸発による収縮の問題を抜本的に解消する手段としては、試料を試料ステージごと液体窒素で冷却し、凍結状態で観察する低温走査電子顕微鏡法 (Cryo-SEM) があるが (Hodson and Sangster, 1990)、そのためには、SEM や ESEM の購入時に、サードパーティ製の専用冷却装置を装着したものを選択する必要がある。

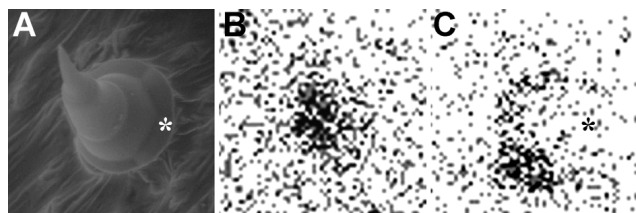
観察に際しては、乾燥による収縮のほかに、電子線を照射することによる試料の損傷と帯電による画質低下が問題となる。高い電圧 (例えば 20 kV) で電子線を照射すると画像は鮮明になるが、ESEM で、ある細胞に着目して高倍率で長時間観察しているとそこに電子線が集中するため、人の肌が水膨れをおこすような感じでその細胞が膨れあがってくる。電圧は必要な範囲で低く抑えるとともに、まず低倍率でこのどういう画像を撮影するか検討し、倍率

をあげたら手早くフォーカスをあわせて撮影を行う。フォーカス合わせは、かつては熟練を要する技術であったが、最近の機種はプログラムが改善されており、初心者でも容易である。試料表面の帯電は、画像を白っぽくざらついた感じにしてしまうが、これも電子線の電圧の高さと照射時間によって発生しやすくなるので、なるべく短時間に低い電圧で観察するのが良い。最新の一部の機種は、帯電を除去する機能を備えている。

2. X線微量分析による元素分析

電子顕微鏡で試料に電子線を照射すると、試料表層に含まれる原子から励起された電子が飛び出して、元素の種類に応じたエネルギー状態の蛍光X線が発生する。X線微量分析(X-ray microanalysis)では、このX線を解析して、試料表層の元素組成を推定する。具体的には、X線のパルスを検出器で捕捉し、一定時間内に生じたパルスをカウントする。とくに、エネルギー分散型検出器をもちいた方式(energy dispersive X-ray microanalysis, 略称EDX)は、一定時間、波高別にパルスをカウントすることでスペクトルを作成し、スペクトル内のピークから複数の主要構成元素を同定できる(吉川1984)。SEMやESEMに装着した場合、観察している微小部位の構成元素を数分間で同定することが可能である。さらに、付属の解析プログラムによっては、測定視野をマトリックスに分けて特定元素が検出された部位をカラーのドットで示す2次元マッピング(第1図)や、主要構成元素の原子数比を推定し、それに原子量に乗じて重量比を推定する定量分析が可能である(Lux et al 2003)。定量分析の機能が無い場合でも、たとえばピーク値とバックグラウンド値の比率などを用いて、特定元素の、観察部位による相対的な多寡を比較することができる。ただし、検出・測定できるのは構成元素であって、それらが組み合わさった化合物の様態は分からない。

ケイ素は、植物体の物理的強度を高めるのみならず、各種の環境ストレスや病害に対する抵抗性を向上させる働きが注目されている元素であるが(Ma and Takahashi 2002)、



第1図 カボチャの葉毛(trichome)におけるカルシウムとケイ素の蓄積。

A. ESEM画像。B. カルシウムの分布。C. ケイ素の分布。B, Cは、黒いドットが対象元素の多い部位を示す。*は毛本体の陰になってX線が検出できない領域。カルシウムは毛の本体に、ケイ素は毛の基部・周縁に多いことが分かる。両元素が少ない毛以外の表皮細胞は低真空による乾燥でいくぶん収縮している。

特定の組織にだけ蓄積されるため、器官全体を潰して測定する旧来の化学分析だけでは動態を把握しにくい。このように植物体内での偏在が著しい物質の検出には、X線微量分析装置が特に有用である(Parry and Soni 1972, Sangster and Parry 1976)。著者らは、乾燥地研究センターの共同研究事業の一環として、作物におけるケイ素の蓄積を調べている。葉の表面や、成熟した根の内皮細胞壁など、比較的堅牢な構造に沈着したケイ素を調べているため、ESEMに装着したX線微量分析装置を用い、新鮮な材料をカミソリ刃で切りとり試料ステージに両面テープで固定しただけの、前処理を施さない試料で測定を行っている(Luxら2003)。ESEMの低真空チェンバー内で試料が乾燥し若干の収縮が起こるが、測定部位には大きな影響はないと考えている。乾燥により収縮・変形しやすい試料を用いる場合や、原形質・液胞など水分の多い部分に存在する元素を分析したい場合には、前節で述べた低温装置が必要となる(Hodson and Sangster 1990)。

実際の作業としては、測定したい部位がESEMの視野(測定範囲)全体を占めるように倍率を調整して、ESEM画像を撮影するとともに、付属のプログラムで構成元素の分析やケイ素のマッピングを行う。チェンバー内の気圧や電子線の電圧などは、通常のESEM観察と同様に設定する。異なるのは、電子銃・検出器と試料表面との角度や検出時間を設定する必要があることと、EDX式検出器に事前に液体窒素を注入して冷却しておく必要があることで、初心者でも容易に行える作業である。

注意点を挙げると、この方法はESEMやSEMの利用が前提であり、測定部位がきわめて微小なために、観察可能な試料の大きさや視野の広さは限定される。葉身全体の中からケイ素の多い部分を検出するような目的には、X線微量分析とは別に、軟X線を用いた解析法などがある(Takeokaら1983)。また、X線微量分析装置で検出されるスペクトルには、バックグラウンドのノイズなど誤差の要因がある。解析プログラムが自動的に補正をしてくれるが、必ずしも信頼のおけるものではない。機種にもよるが、著者らの経験では、観察部位における乾物重に対する比率で構成物質の少なくとも0.5%、できれば1%を超えるような元素を対象とするのが良さそうである。このほか、若干の細かい留意点があるが、それらについては、拙著(阿部ら2005)を参照されたい。

引用文献

- 阿部淳・アレクサンダー＝ルックス・服部太一朗・森田茂紀・谷本英一・稲永忍・安萍 2005. X線微量分析を用いた葉や根におけるケイ素の特異的分布の検出。農と園 80(3): 181-186.
- Hodson M. J. and A. G. Sangster 1990. Techniques for the microanalysis of higher plants with particular reference to silicon in cryofixed wheat tissue. Scan. Microsc. 4: 407-418.
- Lux A., M. Luxova, J. Abe, E. Tanimoto, T. Hattori and S. Inanaga 2003.

- The dynamics of silicon deposition in the sorghum root endodermis. *New Phytol.* 158 : 437–441.
- Ma J.F. and E. Takahashi 2002. *Soil, Fertilizer, and Plant Silicon Research in Japan*. Elsevier, Amsterdam.
- 日本電子顕微鏡学会関東支部編 2000. 走査電子顕微鏡. 共立出版, 東京. 447.
- Parry D.W. and S. L. Soni 1972. Electron-probe microanalysis of silicon in the roots of *Oryza sativa* L. *Ann. Bot.* 36 : 781–783.
- Sangster A. G. and D. W. Parry 1976. The ultrastructure and electron probe microassay of silicon deposit in the endodermis of the seminal roots of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Ann. Bot.* 40 : 447–459.
- Takeoka Y., O. Matsumura and P. B. Kaufman 1983. Studies on silicification of epidermal tissues of grasses as investigated by soft X-ray image analysis. I. On the method to detect and calculate frequency of silica bodies in bulliform cells. *Jpn. J. Crop Sci.* 52 : 544–550.
- 吉川年彦 1984. 生理病斑のマイクロビームアナリシス. 日本土壤肥料学会編 作物の栄養診断—理論と応用—. 博友社, 東京. 41–74.