

二次イオン質量分析法による植物細胞における 生体分子三次元分布の可視化

Direct visualization of the in vivo distribution of
chemical components in plant cells by TOF-SIMS

福島 和彦 (FUKUSHIMA KAZUHIKO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授



研究の概要

生きたままの植物細胞を急速凍結し、飛行時間型二次イオン質量分析 (TOF-SIMS) を用いることによって、細胞や細胞壁内にあるがままに存在するあらゆる構成成分 (細胞質基質、オルガネラ構成成分、細胞壁中の多糖ならびにリグニン、抽出成分) の三次元分布を、化学的な処理を施すことなく選択的に分子レベルで可視化することを目指すものである。

研究分野：生物系・農学・森林学・木質科学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：組織構造・材形成、リグニン、抽出成分・微量成分、保存・木質文化

1. 研究開始当初の背景

これまでに、TOF-SIMS を用いて細胞壁構成高分子であるリグニンや多糖の分析に成功してきた。また、特定抽出成分の分子イオンマッピングを行った結果、抽出成分を有機溶媒などにより抽出せずに、肉眼では識別できない心材と辺材を化学的に識別することに利用できると示した。この方法によって、約 1300 年前に伐採された法隆寺ヒノキ建築古材の心材と辺材の識別に成功し、法隆寺古材の伐採年を推定することができた。

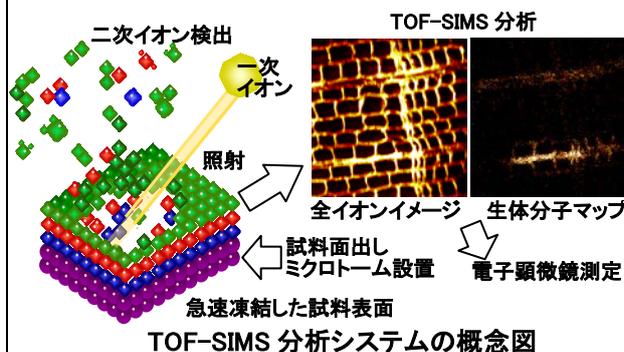
2. 研究の目的

乾燥試料において、十分な分析能力を示してきた TOF-SIMS 機器を、急速凍結した生体細胞でも直接測定できるように、装置の改造をおこなう。これにより、生きた細胞におけるターゲット分子の位置と存在量を、化学的な処理を施すことなく可視化する。

3. 研究の方法

急速凍結した試料でも測定が可能な前処理システムを開発し、現有設備の TOF-SIMS (TRIFT III) 機器に接続し、実際に稼働するようなコンプレックスシステムを構築することが主軸となる。まず、急速凍結した試料を迅速に TOF-SIMS 測定するために、低温かつ窒素雰囲気下で測定室に導入する連

結チャンバーの構築が必要である。チャンバー内の圧力や温度の調節など、機器ハード面での設計をおこなう。次に、凍結試料測定に最適な条件を、実際に急速凍結した植物試料を測定して検討する。このとき、植物細胞壁中のすでに同定した化学成分 (リグニン、多糖、抽出成分等) の分子イオンを用いて測定条件を評価する。また、一次イオンビームの選択・調整をおこない、凍結細胞の高解像度測定の実現を目指す。さらに、試料表面を高解像度で観察できる電子顕微鏡の導入と、測定する凍結試料の平滑面作製が可能なスライディングマイクローム内蔵グローブボックス等の開発をおこない、急速凍結した生体試料に存在する特定分子の三次元ケミカルマッピング構築を目標とする。



4. これまでの成果

1) 三次元ケミカルマッピングを可能とする急速凍結試料前処理装置 (切削・搬送・走査電顕観察コンプレックスシステム) の開発

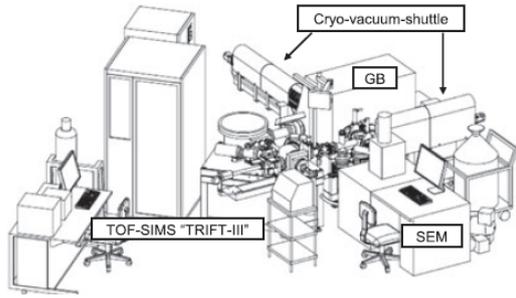


図 1. 完成した前処理システム

GB:グローブボックス (含マイクロトーム)

SEM:走査電子顕微鏡

TOF-SIMS:飛行時間型二次イオン質量分析計

これまでに、以下の要素技術を開発した。

- ①グローブボックス内での急速凍結試料の切削 (-20°C 、窒素雰囲気下)
- ②表面仕上げ凍結試料を極低温真空シャトルを用いて TOF-SIMS に搬送
- ③Cryo TOF-SIMS 分析 (ステージ温度は -120°C 以下)
- ④TOF-SIMS 測定済試料を極低温真空シャトルを用いて Cryo-SEM に搬送
- ⑤エッチング (昇華) 後、Cryo-SEM で試料表面微細構造観察
- ⑥SEM 観察済試料を極低温真空シャトルを用いてグローブボックスに搬送

この①から⑥までの工程を繰り返し、新生切削面の TOF-SIMS データを連続的に入手し、三次元ケミカルマッピングが可能となった。

本装置を用いて、ミズナラ枝内のスクロースやデンプンのケミカルマッピング (図 2) に成功した。

2) 生体成分の TOF-SIMS による同定と定量

各種生体成分より派生する二次イオンの同定、定量技法の開発をおこない、本法が多くの代謝研究に有効であることを示した。

Cryo-SEM/TOF-SIMS重ね合わせ像

- ミズナラ枝 (6月採取) 樹皮~木部の画像
- 赤色:スクロース (m/z 381; [sucrose + K]⁺) の選択的マッピング

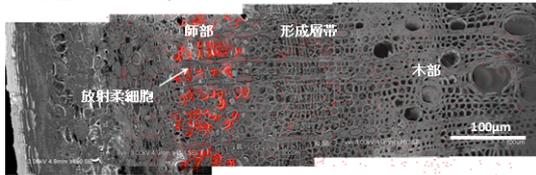


図 2. ミズナラ 2 年生枝内のスクロース分布 (スクロースは師管内部にのみ存在することがわかる。水溶性物質でも顕微レベルで分布を可視化できることを示した。)

5. 今後の計画

現在、深さ方向 $70\mu\text{m}$ 間隔で急速凍結試料の断層画像 (Cryo TOF-SIMS/SEM) を得ることに成功しているが、今後は間隔を半分程度まで狭め、高解像度三次元ケミカルマッピングを構築することを目指す。

凍結試料より派生する二次イオンの中には、乾燥試料から派生する二次イオンと異なっている場合があることがわかった。氷マトリックス効果についてモデル化合物や同位体標識化合物を用い、分子レベルで解析する。

また、生体分子の超分子構造や凝集状態に関する情報も TOF-SIMS を用いて解析する技法を提案する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- ・ 齋藤香織、福島和彦、木質バイオマスの TOF-SIMS による解析、*Cellulose Communications*, **16**(4), 161-165 (2009)
- ・ K. Saito, T. Kishimoto, Y. Matsushita, T. Imai, K. Fukushima, Application of TOF-SIMS to the direct determination of syringyl to guaiacyl (S/G) ratio of lignin. *Surface and Interface Analysis*, **43**, 281-284 (2011)
- ・ K. Saito, Y. Watanabe, M. Shirakawa, Y. Matsushita, T. Imai, T. Koike, Y. Sano, R. Funada, K. Fukazawa, K. Fukushima, Direct mapping of morphological distribution of syringyl and guaiacyl lignin in the xylem of maple by time-of-flight secondary ion mass spectrometry, *The Plant Journal*, **69**, 542-552 (2012)
- ・ K. Kuroda, T. Fujiwara, T. Imai, K. Saito, Y. Matsushita, K. Fukushima, The Cryo-TOF-SIMS/SEM System for analysis of the chemical distribution in freeze-fixed *Cryptomeria japonica* wood, *Surface and Interface Analysis*, DOI 10.1002/sia.4979 (2012)
- ・ S. Aoyagi, K. Kuroda, R. Takama, K. Fukushima, I. Kayano, S. Mochizuki, A. Yano, Evaluation of white radish sprouts growth influenced by magnetic fields using TOF-SIMS and MCR, *Surface and Interface Analysis*, DOI : 10.1002/sia.4893 (2012)
- ・ Y. Matsushita, I.C. Jang, T. Imai, R. Takama, K. Saito, T. Masumi, S.C. Lee, K. Fukushima, Distribution of extracts including 4,8-dihydroxy-5-methoxy-2-naphthaldehyde in *Diospyros kaki* analyzed by GC-MS and ToF-SIMS, *Holzforschung*, in print (2012)

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~lignin/>